

Tesis de Posgrado

"Tricotecenos en cervezas"

Molto, Gustavo Alvaro

Tesis presentada para obtener el grado de Magister de la Universidad de Buenos Aires en el área de Bromatología y Tecnología de la Industrialización de Alimentos 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:

Molto, Gustavo Alvaro. (). "Tricotecenos en cervezas". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3248_Molto.pdf

Cita tipo Chicago:

Molto, Gustavo Alvaro. ""Tricotecenos en cervezas"". Tesis de Magister. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. .
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3248_Molto.pdf

FCE y N BIBLIOTECA

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

"TRICOTECENOS EN CERVEZAS"

Lic. GUSTAVO ALVARO MOLTO

DIRECTORA: Dra. Silvia Liliana Resnik

Tesis presentada para optar al título de
Magister de la Universidad de Buenos Aires en
el área de Bromatología y Tecnología de la
Industrialización de Alimentos

~ 2000 ~

Nº 3248

*A la memoria de mis padres,
a mi hermano, tío y primos.*

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Silvia L. Resnik por su guía científica, orientación, presencia y paciencia volcados, tanto en el desarrollo experimental como en el de redacción para la elaboración de esta tesis.

A las Dras. Ana Pacin y Elena Martínez y a la Magister Margarita Samar por su colaboración en el tratamiento y evaluación de los datos.

A los Dres. Ricardo Comerio y Mónica Haros, a las Lic. Viviana Velazco y Andrea Patriarca y a la Ing. Stella Hurtado Rodríguez por su amistad y fuerzas que me dieron en los malos momentos pasados.

Al Bioq. Marcelo Castillo y a la Sra. María E. Módena por su amistad, atención y ayuda en el uso de la computadora.

A la Dra. Virginia Fernández Pinto por su apoyo incondicional.

A la Dra. Susana Neira y a la Mtra. Leticia Broggi por su amistad.

A los compañeros y docentes de Bromatología por su valiosa ayuda.

Al área de Bromatología, Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, por permitirme utilizar las instalaciones y equipos para el desarrollo del trabajo experimental.

Al apoyo económico recibido, para la realización de esta tesis, de la Universidad de Buenos Aires, del CONICET, de la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CIC) y de la Agencia de Promoción Científica y Tecnológica.

INDICE

I – INTRODUCCIÓN	1
I.1 – Orígenes e historia de la cerveza.	1
I.2 – Consumo de cerveza.	5
I.3 – Elaboración de cerveza.	11
I.3.1 – Materias primas.	11
I.3.1.1 – Cebada.	11
I.3.1.2 – Lúpulo.	13
I.3.1.3 – Agua.	19
I.3.1.4 – Agregado de sucedáneos.	20
I.3.1.4.a – Sucédáneos sólidos.	20
I.3.1.4.b – Sucédáneos líquidos.	21
I.3.1.5 – Levadura de cerveza.	22
I.3.2 – Etapas del proceso de elaboración de la cerveza.	24
I.3.2.1 – Preparación del cereal.	24
I.3.2.2 – Maceración del cereal.	24
I.3.2.3 – Germinación.	25
I.3.2.4 – Secado y tostado.	27
I.3.2.5 – Molienda de la malta.	29
I.3.2.6 – Macerado de la malta.	30
I.3.2.7 – Separación de los residuos insolubles.	35
I.3.2.8 – Cocción del mosto.	35
I.3.2.9 – Fermentación.	37
I.3.2.9.a – Fermentación de alta temperatura o de superficie.	39

I.3.2.9.b – Fermentación de baja temperatura o de fondo.	40
I.3.2.10 – Pasteurización y envasado.	43
I.3.3 – Composición de la cerveza.	44
I.3.4 – Tipos de cervezas.	46
I.4 – Ocurrencia de micotoxinas en cerveza.	53
I.5 – Tricotecenos.	69
I.6 – Metodologías.	72
I.7 – Diferentes métodos de análisis de tricotecenos en muestras líquidas.	80
II – OBJETIVOS.	87
III – MATERIALES Y METODOS	88
III.1 – Reactivos y solventes.	88
III.1.1 – Reactivos.	88
III.1.2 – Solventes.	88
III.2 – Estándares.	88
III.2.1 – Estándar interno.	89
III.2.2 – Estándares de tricotecenos.	89
III.3 – Preparación de las soluciones.	89
III.3.1 – Estándares de tricotecenos.	89
III.3.2 – Estándar Interno.	90
III.3.3 – Solución de neutralización.	91
III.4 – Materiales y equipos.	91
III.5 – Muestras.	92

III.6 – Preparación de las muestras.	93
III.7 – Extracción de las micotoxinas.	98
III.8 – Purificación de las micotoxinas.	99
III.9 – Derivatización de las micotoxinas.	100
III.10 – Condiciones cromatográficas.	106
III.11 – Análisis de los estándares de tricotecenos.	107
III.12 – Curva de calibración.	108
III.13 – Confirmación por cromatografía en placa delgada.	108
IV – RESULTADOS Y DISCUSIÓN	110
IV.1 – Método de análisis de tricotecenos en cerveza.	110
IV.2 – Análisis cromatográfico de las muestras de cervezas.	125
IV.3 – Comparación de frecuencias de contaminación en los diferentes Años.	131
IV.4 – Comparación de medias de contaminación en los diferentes años.	133
IV.5 – Análisis de la distribución de las marcas en los diferentes años.	133
IV.6 – Evaluación del riesgo por ingesta de micotoxinas.	137
V – CONCLUSIONES	140
VI – BIBLIOGRAFIA	141

I. INTRODUCCIÓN

I.1 – Orígenes e historia de la cerveza.

Lo que se describe a continuación fue extraído de las publicaciones de Hough (1990), Alaface (1995), Cerveza (1999) y Orígenes de la cerveza (2000).

La palabra **cerveza** proviene de la voz celta '*cervisia*' (*cera*: grano y *vice*: fuerza).

Los seres humanos hemos creado un verdadero arte en lo que al comer y beber se refiere pero alguna vez nos preguntamos de dónde vienen o surgieron o quiénes inventaron los platos o bebidas que consumimos diariamente.

La cerveza es una de las bebidas de mayor popularidad en el mundo ya que su consumo mundial supera los 1200 millones de hl anuales. Existe una variedad infinita de diferentes sabores, colores y aromas. Volviendo al interrogante inicial de dónde y cómo surgió la cerveza, se puede responder a través de la historia de la misma (Alaface, 1995).

Hace aproximadamente unos diez mil años, cuando los hombres dejaron de ser cazadores nómades nació la agricultura y por lo tanto el comienzo de la civilización, esto tuvo lugar en la antigua Mesopotamia. Así se cultivó una gran variedad de cereales, siendo uno de los más importantes la cebada. Una de las recetas más antiguas que se conoce pertenecía a la civilización Sumeria, establecida en la fértil llanura de la Mesopotamia (entre los ríos Eufrates y Tigris) hace mas de cinco mil años. La antecesora de la 'cerveza' la elaboraban a partir de un pan de cebada que lo disolvían en agua.

El hombre había inventado un alimento de alto valor nutritivo fácil de almacenar, transportar y conservar.

Los Sumerios le atribuyeron tal valor a la bebida que era consumida solamente por los reyes y sacerdotes, los cuales le rindieron culto a Ninkasi, la diosa de la cerveza.

Los Babilonios, al conquistar las tierras de los Sumerios, conocedores del arte de fabricar cerveza, introdujeron cambios en la fabricación y establecieron las primeras diferenciaciones al elaborar unos 20 tipos diferentes de la bebida. Así distinguieron entre aguadas y ligeras, blancas, negras y rojas, finas y superiores.

Hay datos arqueológicos y pruebas, de hace cuatro mil años, donde los chinos producían una clase de cerveza llamada *Kiú*. La fabricaban a partir de los cereales cebada, trigo, mijo y arroz.

Hace siete mil años en América, mas precisamente en México, los amerindios cultivaban el maíz. No se sabe bien cuándo comenzaron a fermentar el grano, pero lo que sí se sabe bien es que cuando Colón llegó a América los indígenas le ofrecieron una bebida fermentada elaborada a partir de maíz. Colón la describe, en sus cartas de viaje, como muy parecida a la cerveza de Inglaterra.

Es en la región del Medio Oriente donde se han encontrado la prueba más contundentes de los orígenes de la cerveza moderna. En Egipto la cerveza la elaboraban originalmente a partir de trigo y luego cambiaron a la cebada, por el mejor gusto que le daba a la bebida. En los antiguos jeroglíficos se hace mención a que Osiris, dios egipcio, le enseñó a su pueblo a fabricar cerveza a partir de la cebada.

El historiador griego Heródoto le encontró a la cerveza egipcia, conocida en el mundo griego como *Zythum*, propiedades medicinales y asegurando que era apropiada para los dolores estomacales.

Recién la cerveza se extendió por todo el continente europeo con la expansión del Imperio Romano (allá por el 60 antes de Cristo), cuando Julio César conquistaba Galia y probó una especie de cerveza a partir de trigo fabricada por los galos.

Durante la Edad Media el poder político, espiritual y cultural quedó concentrado en la Iglesia. Las abadías, monasterios y conventos eran los lugares de producción de cultura y de adelantos. En éstos lugares los monjes, como consumidores, inventores y expertos en la elaboración de cerveza, tuvieron un papel importante para la expansión de la bebida por toda Europa Central. Al principio, los monjes tenían mas dudas que certezas sobre el conocimiento científico de la elaboración y la fabricación de cerveza dependía mas de la intuición. La primera fábrica de cerveza, dirigida por los monjes, se creó en Saint Gallen, Suiza, a comienzos del Siglo IX y lo producido era tanto para los feligreses como para los visitantes, mientras que lo producido en los conventos y monasterios era para consumo interno.

A los monjes se les debe el perfeccionamiento de la cerveza, ya que ellos agregaron el lúpulo en la elaboración de la bebida y sustituyeron así el agregado de una gran cantidad de hierbas. Antes del agregado del lúpulo, la cerveza tenía grandes problemas de putrefacción y sólo se elaboraba en la época de invierno, cuando el frío permitía conservarla, por ello las grandes cervecerías se asentaron en la zona de Europa Oriental donde se cultivaba el lúpulo.

En el año 1040 nació la cervecería comercial más antigua del mundo, en la Abadía de Wiehenstephan (Baviera) en Alemania. Actualmente, éste lugar es considerado como patrimonio histórico del estado Alemán y sirve de sede a la Facultad de Cervecería de la Universidad Técnica de Munich.

Con el Siglo XVI se iniciaba la nueva era de los grandes viajes de exploración de las potencias europeas y es ahí donde la cerveza jugó un papel importante. El agua que llevaban los barcos se volvía no potable con el tiempo y se decidió reemplazarla entonces por la cerveza, que además de mitigar la sed aportaba importantes elementos nutritivos.

Ya en el Siglo XVII se registró un incremento notable en la producción de cerveza, alcanzando las cervecerías del norte de Alemania y de Dinamarca una perfección tal que les permitió exportar sus productos.

La llegada de la cerveza, como producto comercial, a Hispanoamérica fue tardía debido a medidas proteccionistas que España imponía a sus colonias. La primera cervecería comercial en el Nuevo Mundo se estableció en México, en 1542, construida por Alfonso de Herrera y autorizada por el Rey Carlos V.

En los Estados Unidos, en 1612, fue fundada la primera cervecería en la localidad de Nueva Holanda por Adrián Bolck y Hans Christiansen.

El Siglo XIX hubo un nuevo apogeo para la industria cervecera con nuevas técnicas y conocimientos científicos para su elaboración. América Latina no se quedó ajena al proceso y se construyeron las bases para una de las industrias cerveceras más importantes del mundo.

Las nuevas reglas económicas imperantes en el globo, en el Siglo XX, facilitaron el intercambio mundial y las mas variadas clases de cervezas se expandieron por todo el mundo, desarrollandose nuevos estilos. Actualmente la industria cervecera responde a los requerimientos de mercado, ofreciendo los mas variados estilos como por ejemplo los producidos a partir de cebada, de trigo, de sorgo, de frutas (negras o rojas).

I.2 – Consumo de cerveza.

En Argentina, Gallo y col. (1992) realizaron una encuesta de 24 horas en la localidad de Nueve de Julio, un pueblo de 41726 habitantes en el centro de la provincia de Buenos Aires, para estimar el consumo de productos derivados de los cereales, entre ellos la cerveza. Tomaron al azar y de diferentes lugares (escuelas, casas, trabajo y centros sociales), una muestra de 1901 personas, el 50,6 % de varones, entre el 1 de Marzo de 1988 y el 1 de Marzo de 1989. La encuesta incluía preguntas sobre la consumición de varios tipos de alimentos, entre ellos las bebidas alcohólicas (Tabla I.1). El consumo de bebidas alcohólicas comienza a edad temprana, el vino y otras bebidas alcohólicas en el grupo de 6 a 10 años y la cerveza en el grupo de 11 a 14 años. Además, el consumo de bebidas alcohólicas es mayor en los varones que en las mujeres, en los grupos con que se cuenta con el mayor número de encuestados.

Pacin y col. (1998) en la ciudad de Luján a 60 km al oeste de Buenos Aires, también realizaron una encuesta dietética de recordatorio de 24 hs. para evaluar, por medio de la ingesta de alimentos, el aporte de energía y de proteínas. La muestra fue de 827 encuestados tomados al azar entre los estudiantes, docentes y no docentes de la Universidad Nacional de Luján (UNLu) (5637 personas mayores de 18 años). Los individuos fueron encuestados entre el 1 de Noviembre de 1991 y el 31 de Octubre de 1992 y debido a las variaciones estacionales se tomó una muestra del 4 % en cada una de las estaciones del año, totalizando un 16 % de la población de la Universidad. En la Tabla I.2 se observaron los datos correspondientes a las bebidas alcohólicas y se calculó en base a los mismos el consumo en litros “per cápita”/año. También, como en el caso anterior de la ciudad de Nueve de Julio, el consumo mayor entre las bebidas alcohólicas por el grupo de 18 a 24

TABLA I.1 – Frecuencia de consumo de bebidas alcohólicas en la población encuestada de Nueve de Julio.

Bebidas	Frecuencia de Consumo													
	1 a 5 (años)		6 a 10 (años)		11 a 14 (años)		15 a 25 (años)		26 a 55 (años)		Más de 55 años			
	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M		
Cerveza			1,4	8,1	4,0	26,8	3,5	4,2	4,3					
Vino			4,3	13,9	13,3	37,4	29,0	55,6	37,0	45,0				
Otras bebidas alcohólicas		1,8	1,7	3,1	1,6	9,7	3,0	4,2		20,0				
N	7	12	57	63	349	454	248	231	72	46	20			

Tabla obtenida de Gallo y col. (1992)

F: femenino

M: masculino

N: tamaño de la muestra

TABLA I.2 – Frecuencia de consumo e ingesta promedio y el consumo “per cápita” de bebidas alcohólicas.

Alimentos	Edades de los diferentes Grupos																	
	18 a 24 años						25 a 50 años											
	Mujeres (G1 F)			Varones (G1 M)			Mujeres (G2 F)			Varones (G2 M)								
	N = 209 individuos						N = 189 individuos						N = 189 individuos					
	Frec.	ml / día	lpc/año	Frec.	ml / día	lpc/año	Frec.	ml / día	lpc/año	Frec.	ml / día	lpc/año	%	ml / día	lpc/año			
Cervezas	10,6	(29,9)	10,9	17,7	(80,6)	29,4	2,9	(5,9)	2,2	2,6	(4,7)	1,7		0 - 180	3,4			
		0 - 540			0 - 540			0 - 360			0 - 180			0 - 450				
Vinos	8,8	(21,4)	7,8	14,1	(36,7)	13,4	10,2	(18,4)	6,7	4,7	(9,3)	3,4		0 - 450				
		0 - 450			0 - 450			0 - 450			0 - 450			0 - 450				
Otras bebidas alcohólicas	7,4	(13,8)	5,0	5,7	(16,4)	6,0	1,6	(2,4)	0,9	0,5	(0,8)	0,3		0 - 150				
		0 - 300			0 - 450			0 - 150			0 - 150			0 - 150				

Tabla derivada del trabajo de Pacin y col. (1998)

lpc/año: litros ‘per cápita’ / año

(): valores promedio entre paréntesis

Frec.: frecuencia

F: femenino

M: masculino

años, es la cerveza, el vino es consumido en mayor cantidad que la cerveza por el grupo de 25 a 50 años. Además, el consumo de bebidas alcohólicas (tanto de cerveza como de vino) es mayor en los varones jóvenes, de 18 a 24 años, que en los otros grupos.

El consumo promedio de cerveza, en litros “per cápita”, según la Cámara de la Industria Cervecera (CICA, 1999), de cada década, desde 1901 hasta 1999, se observa en la Figura I.1:

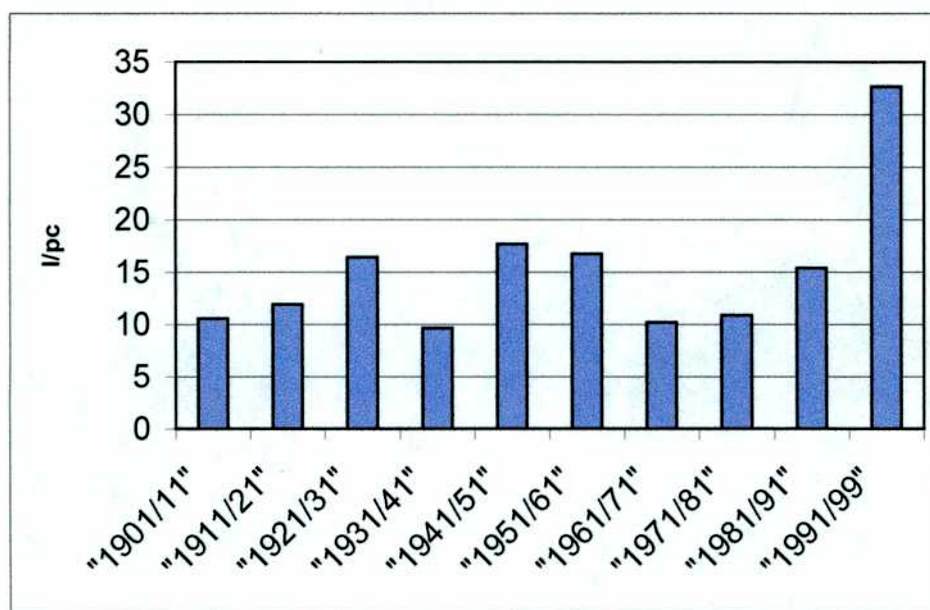


Fig. I.1 – Consumo promedio de cerveza por década (en l "per cápita")

El consumo de cerveza se ha incrementado fuertemente en la última década, del casi 120 % con respecto a la década anterior.

Se recolectaron datos de ventas a nivel Nacional y del porcentaje de participación en el mercado (CICA, 1999), de vinos, del Instituto Nacional de Vitivinicultura (INV, 1999) y de la Cámara Argentina de Destiladores Licoristas (1999), que junto a los datos publicados por el Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (INDEC, 1999 a y b), se enlistan en la Tabla I.3.

Entre los años 1990 a 1999 hubo un aumento de las ventas y participación en el mercado de cervezas a expensas de la disminución de los mismos parámetros para el vino. Se observa que las otras bebidas alcohólicas han mantenido su participación en el mercado.

TABLA I.3 – Comparación de ventas anuales, % de participación en el mercado y consumo “per cápita” de cervezas, vinos y

licores (1990 – 1999)

Año	Población (3)	Ventas Anuales (miles de hls)				%Participación en el mercado			
		cervezas (2-3)	licores (1, 3)	vinos (3-4)	TOTAL	cervezas	licores	vinos	
1990	32527095	6170	572	17131	23873	25,84	2,40	71,76	
1991	32973923	7979	716	17111	25806	30,92	2,77	66,31	
1992	33424393	9518	745	16193	26456	35,98	2,82	61,21	
1993	33874864	10305	792	14558	25655	40,17	3,09	56,74	
1994	34325335	11272	777	14179	26228	42,98	2,96	54,06	
1995	34768455	10913	677	13491	25081	43,51	2,70	53,70	
1996	35226277	11615	657	13542	25814	45,00	2,55	52,46	
1997	35676748	12687	764	13435	26886	47,19	2,84	49,97	
1998	36127218	12395	731	12928	26054	47,57	2,81	49,62	
1999 (*)	36577689	12888	678	12575	26141	49,30	2,59	48,10	

(*) datos estimados

(1)– Cámara Argentina de Destiladores Licoristas

(2)– Cámara de la Industria Cervecera Argentina (CICA)

(3)– Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (INDEC)

(4)– Instituto Nacional de Vitivinicultura (INV)

En la Figura I.2 queda reflejado el incremento del consumo de cerveza (litros por habitante por año o litros “per cápita”, l/pc) en detrimento del consumo de vino. Este consumo se estimó con los valores de la Tabla I.3.

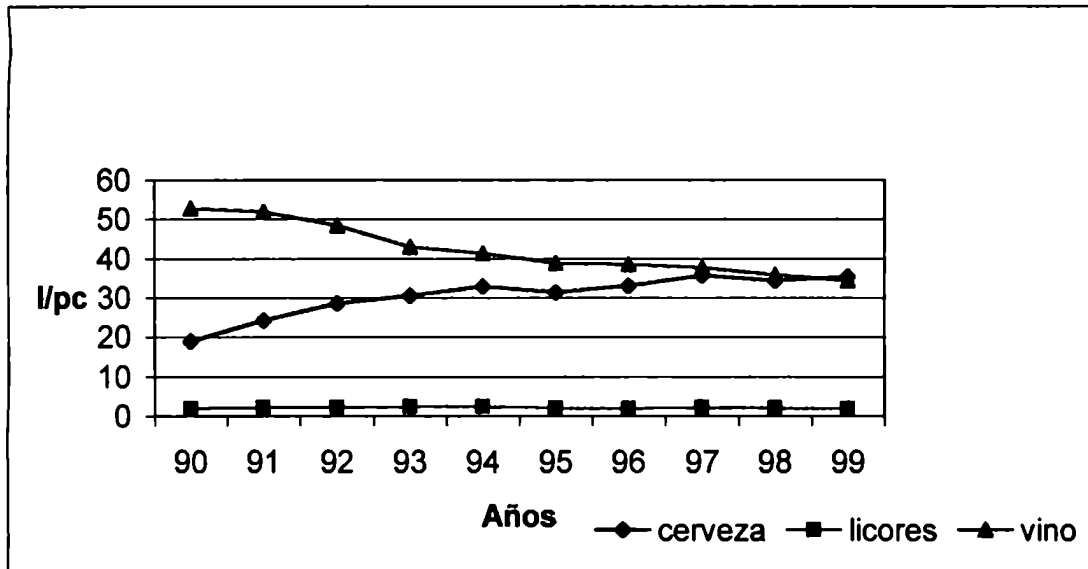


Figura I.2 – Consumo de bebidas alcohólicas en los años 1990 – 1999 (en l/pc)

A pesar que estas estimaciones de consumo de cerveza utilizan metodologías diferentes con respecto a los datos obtenidos de las encuestas (Gallo y col., 1992; Pacin y col., 1998) los resultados son similares.

I.3 – Elaboración de cerveza.

El proceso de elaboración de la cerveza que se describe a continuación fue extraído de las obras correspondientes a Montes (1981), Belitz y Grosch (1986), Potter y Hotchkiss (1999), C.I.C.A. (1999) y Cerveza (1999).

1.3.1 – Materias primas.

Las principales materias primas para la fabricación de una cerveza “genuina” son la cebada, lúpulo y agua. En muchos casos se agregan cereales no malteados o adjuntos (arroz, trigo y/o maíz) como fuentes adicionales de carbohidratos, con el fin de que sean fermentados por las levaduras. Estas se agregan para producir dióxido de carbono y alcohol etílico, mientras que, el lúpulo se agrega para dar el “flavor” característico que tienen la mayoría de las cervezas. Se puede agregar dióxido de carbono adicional además del producido por la fermentación, colorantes y sustancias que actúan como estabilizantes y antioxidantes.

I.3.1.1 – Cebada.

La cebada corresponde a la familia *Hordeum* sp. de las que se conocen muchas variedades, la más común es la *Hordeum vulgare* L. Para la elaboración de la malta se emplea esta variedad conocida como “cebada cervecera”, ya que tiene un alto rendimiento en extracto seco. La capacidad de germinación de los granos debe ser como mínimo del 95 %, tener un alto poder diastásico y carecer de sustancias que afecten el color, aroma y sabor.

El grano de este cereal, de blanco a amarillo dorado brillante, está constituido por tres partes fundamentales:

- (a) – **salvado**: rico en celulosa, contiene glutelina, hordeína, taninos y antocianógenos (resina amarga); éstas últimas se eliminan por extracción de las cáscaras, con soluciones alcalinas, pues se les atribuye sabor amargo y desagradable que altera el producto final.
- (b) – **endosperma**: rico en almidón y contiene entre un 9 a 10 % de proteínas que están compuestas mayoritariamente por leucosina (coagula), edestina (se solubiliza durante el macerado de la malta y coagula) y prolaminas (la hordeína queda retenida en la filtración).
- (c) – **germen**: rico en lípidos y particularmente en lecitina.

La composición aproximada de los constituyentes del grano de cebada entera se muestra en la TABLA I.4.

TABLA I.4 – Porcentajes de los constituyentes principales del grano de cebada.

CONSTITUYENTES	PROMEDIO (%)	RANGO (%)
Agua	11,70	10,50 – 12,80
Proteínas	9,84	9,00 – 10,49
Lípidos	2,10	1,80 – 2,25
Carbohidratos (*)	63,31	----
Fibra dietaria total	9,80	----
Minerales	2,25	2,15 – 2,39

Souci y col., (1989)

(*) – estimado por diferencia: $100 - (\text{agua} + \text{proteína} + \text{grasa} + \text{minerales} + \text{fibra})$

La cebada se la suele secar hasta un contenido de humedad del 12 % en base húmeda, para que se mantenga estable durante el almacenamiento. Cuando la humedad inicial es igual al 15 % el proceso de secado dura aproximadamente 2 horas y el aire caliente utilizado tiene

inicialmente una temperatura de 54°C y se lo lleva gradualmente a 66°C, para tratar que el interior del grano no sobrepase los 52°C; luego se almacena a 25°C entre 7 – 14 días. Este procedimiento mantiene la viabilidad del grano.

1.3.1.2. – Lúpulo.

El lúpulo (*Humulus lupulus L.*) es una planta aromática y trepadora de la familia *Moraceae*. Las flores femeninas o “conos” que se desarrollan en plantas diferentes a las que producen las flores masculinas, son las que se utilizan en cervecería. Los conos contienen entre un 0,3 a 1 % de resinas, aceites esenciales y aportan el “flavor” amargo con el agradable aroma característico. Se cosechan cuando las flores femeninas han alcanzado su madurez, en la segunda mitad del verano y otoño. Las distintas variedades de lúpulo difieren en la forma, en el vigor de su desarrollo, en la producción de los conos, en la riqueza de los α -ácidos, en la abundancia y composición de los aceites esenciales y en la resistencia a las diferentes enfermedades. A los cerveceros les interesa las variedades: ricas en los α -ácidos, que ofrezcan aromas atractivos y resistentes a las enfermedades.

Se secan en hornos especiales con aire caliente (50° – 65°C, durante unas 10 horas) hasta llegar a un 8 a 12 % de humedad residual y se embolsan, previo sulfitado. En la cocción del lúpulo gran parte de los aceites esenciales volátiles se pierden junto al vapor de agua. El agregado de lúpulo, poco antes de que termine el proceso de cocción, o de la esencia de lúpulo al producto terminado, refuerzan el aroma de la cerveza.

Es el aditivo más importante e indispensable de la cerveza, cumple las funciones de:

- (1) – **clarificar** pues provoca la precipitación de las sustancias proteicas del mosto de cebada.
- (2) – **modificar** el carácter del mosto hacia un aroma específico y un sabor amargo.

(3) – **conservar**, pues tiene sustancias antibióticas, que junto al etanol y al dióxido de carbono contribuyen a la estabilidad de la cerveza.

(4) – **estabilizar** la espuma, debido a su contenido en pectina, ya que favorece la formación y estabilización de la misma.

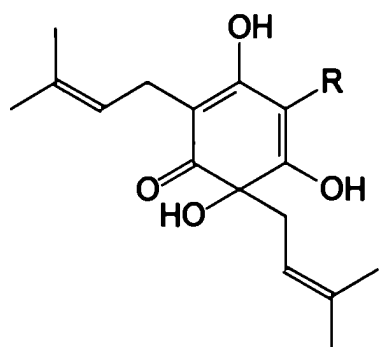
El lúpulo está compuesto, aproximadamente por 15,0 % de resinas totales, 0,5 % de aceites esenciales, 4,0 % de taninos, 2,0 % de monosacáridos, 2,0 % de pectinas, 0,1 % de aminoácidos libres, 15,0 % de proteínas, 3,0 % de lípidos, 8,0 % de cenizas, 40,4 % de fibra (celulosa, hemicelulosa, lignina, etc.) y el 10,0 % de agua.

El lúpulo fresco contiene principalmente “**resinas blandas**” (sustancias amargas, solubles en éter de petróleo o en hexano), compuestas por (Fig. I.3) los α -ácidos (humulona (I) o α -ácido lupúlico, cohumulona (II) y adhumulona (III)) más importantes en cervecería y los β -ácidos (lupulona (IV) o β -ácido lupúlico, colupulona (V) y adlupulona (VI)) menos importantes. Estos compuestos son muy reactivos ya sea durante el secado, almacenado o con otros tratamientos a los que son sometidos, produciendo por reacciones de isomerización y polimerización un gran número de subproductos que le dan a la cerveza un particular carácter e intensidad del sabor amargo.

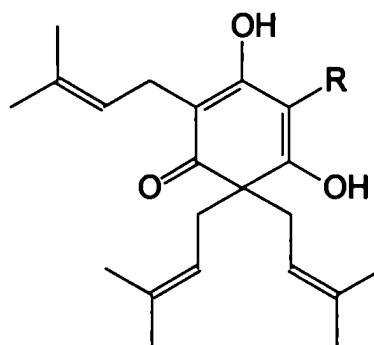
En la cocción se isomerizan las humulonas en los α -isoácidos o isohumulonas (compuestos “cis” (VII) y los compuestos “trans” (VIII)), que son más solubles y amargos que los compuestos de partida. Las isohumulonas reaccionan con los compuestos (IX) y (X), que son un 30 % menos amargos que aquellas.

Los productos derivados de la lupulona tienden a oxidarse para formar la hulupona (XI) y la luputrióna (XII), que tienen un suave y agradable sabor amargo. Pero el sabor amargo característico de la cerveza, se lo confiere principalmente la humulona (I).

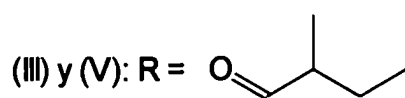
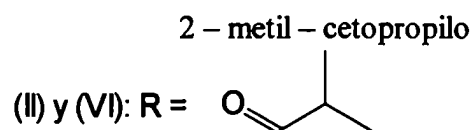
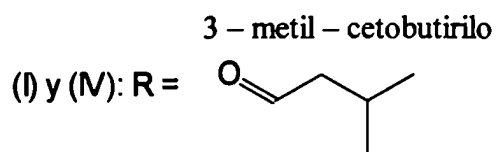
Fig. I.3 – Estructuras químicas de los componentes del lúpulo



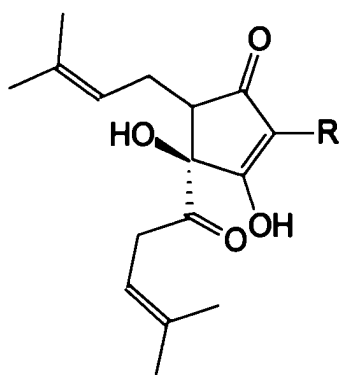
(I) - (II) - (III)



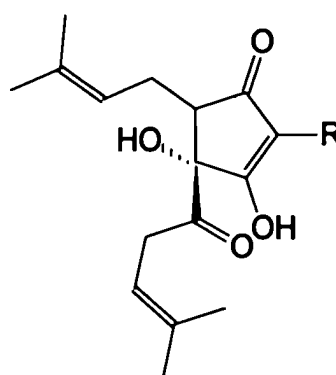
(IV) - (V) - (VI)



2 - metil - cetobutirilo

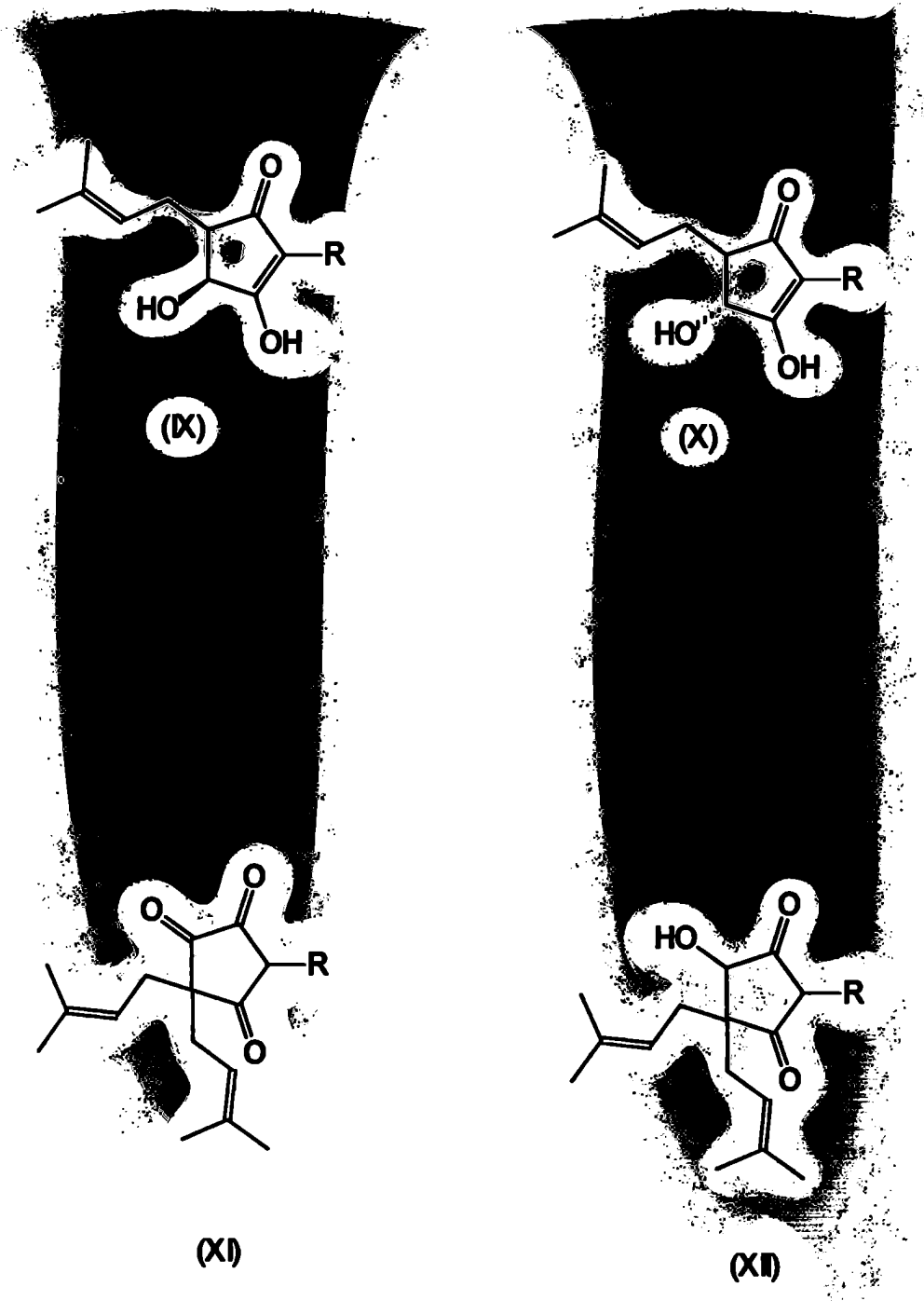


(VII)



(VIII)

Fig. L3 – Estructuras químicas de los componentes del lúpulo (continuación)



En la TABLA I.5 se muestran los porcentajes de humulonas y lupulonas de diferentes orígenes (Belitz y Grosch, 1988). Según se puede observar en esta Tabla, la variedad Saaz daría la cerveza mas amarga.

Además, los componentes fenólicos (taninos), contenidos en el lúpulo, contribuyen durante la cocción del mosto de cebada a la precipitación de las proteínas. A veces éstos componentes se separan a bajas temperaturas, por lo que se producen enturbiamientos. Este proceso suele ocurrir durante el almacenado de la cerveza.

TABLA I.5 – Porcentajes de α - y β -ácidos del lúpulo de diferentes orígenes.

Lúpulo	% de α -ácidos			% de β -ácidos		
	humulona	cohumulona	adhumulona	lupulona	colupulona	adlupulona
Japón	46	41	13	21	68	11
América	54	34	12	32	57	11
Hallertau	59	27	14	45	43	12
Brewer	64	24	12	46	43	11
Saaz	67	21	12	51	37	12

Belitz y Grosch, (1988)

Durante el envejecimiento, a lo largo del almacenamiento, los α - y β -ácidos generan productos de oxidación llamados “resinas duras” (compuestos insolubles en el éter de petróleo o hexano), algunos de los cuales son amargos y otros no. Los cambios que tienden a producirse son: (I) oxidación de cadenas laterales, (II) pérdida de cadenas laterales y (III) transformación de los anillos hexagonales en pentagonales.

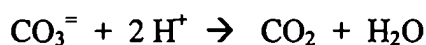
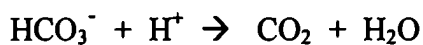
Los aceites esenciales de los conos del lúpulo son una mezcla de varios componentes, los solubles en hexano son los hidrocarburos terpenoides y los solubles en el éter de petróleo son

los ésteres, aldehídos, cetonas y alcoholes. Estos aceites influyen tanto en el sabor como en el aroma, aunque la mayor parte de ellos se pierde por arrastre por vapor en un proceso posterior (cocción por ebullición).

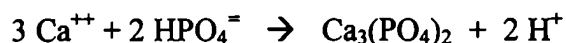
Muchos productores de cervezas utilizan los conos de lúpulo deshidratados pero tienen problemas de oxidación. Una elevada cantidad de fabricantes utiliza pastillas, preparadas a partir de los conos, o un extracto líquido de lúpulo. Las pastillas tienen una forma cilíndrica de 1 cm. de diámetro por 2 cm. de altura, son de color verde oscuro y se envasan al vacío o en atmósfera inerte. Los extractos de lúpulo se obtienen por la extracción con solventes orgánicos o, actualmente, con dióxido de carbono de los conos. Los solventes orgánicos empleados son el diclorometano y el etanol, que extraen resinas y aceites esenciales. Aunque el solvente se recupera por destilación, siempre pueden quedar restos o trazas (unas pocas partes por millón) que, por ejemplo, está prohibido en la Legislación de los Estados Unidos de Norteamérica, especialmente cuando son solventes clorados. Desde 1982, se han descrito dos procesos de extracción de aceites esenciales del lúpulo con dióxido de carbono. Uno de los procesos, denominado **extracción por fluido supercrítico**, utiliza una temperatura de 50°C y presiones de cerca de 400 bares; el otro proceso denominado **extracción por fluido subcrítico**, utiliza el dióxido de carbono líquido a temperaturas de 7°C y presiones de 40 bares (punto crítico del dióxido de carbono, 31°C y 74 bares). Este último proceso es selectivo y el dióxido de carbono no extrae las resinas duras ni los taninos; además, extrae menos cantidad de agua y de lípidos comparado con el proceso supercrítico. Los extractos, así obtenidos, ocupan menos espacio y son estables a temperatura ambiente durante el almacenamiento.

I.3.1.3. – Agua.

Su composición es de gran importancia para preparar los mostos (producto obtenido de una maceración de cebada germinada, tostada y molida en agua) y obtener una cerveza de calidad. Las sales del agua modifican el pH de la malta y el mosto. El ión bicarbonato aumenta el pH y los iones calcio y magnesio lo disminuyen. Al calentar a ebullición el mosto que tiene los iones bicarbonato (o carbonato), se produce un aumento de la alcalinidad (aumento del pH) debido al desprendimiento de dióxido de carbono, según las reacciones:



Los iones calcio y magnesio reaccionan con los fosfatos diácidos y carbonatos ácidos del mosto, formando los orto-fosfatos de calcio (magnesio) y carbonato de calcio insolubles, pues el carbonato de magnesio es un poco más soluble que el de calcio, según las reacciones:



El sulfato de magnesio en alta concentración le da a la cerveza un sabor amargo desagradable, las sales de manganeso y de hierro producen enturbiamientos, decoloraciones y alteraciones en el sabor. Los nitratos y silicatos producen trastornos durante la fermentación.

El agua con alcalinidad residual y dureza baja es indicada para preparar cervezas claras y con mucho lúpulo o cervezas del tipo «*Pilsen*». El agua de alcalinidad residual y dureza alta (200 – 300 mg CaCO₃/l.) proporciona cervezas más oscuras. Por lo general, las aguas se corrigen

con el agregado de sulfato de sodio o de hidróxido de calcio en caliente (descarbonatación). El agregado de una solución de hidróxido de calcio, en frío, se utiliza para disminuir la dureza de la misma. La dureza del agua, para la elaboración de la cerveza, debe ser menor o igual a 25 mg CaCO₃/l.

Cuando hay una alta concentración salina en el agua, a ésta se la hace pasar a través de columnas que contienen unas resinas de intercambio iónico, disminuyendo así la concentración de las sales.

La malta, por contener *fitina* (hexafosfato de inositol) y por la acción de las fitasas sobre ésta, proporciona una considerable cantidad de ácido fosfórico al medio, que se ioniza, y por la reacción con los iones calcio precipita en forma de fosfato cálcico (muy insoluble), se obtiene finalmente una solución con alta acidez.

Los iones calcio estabilizan las α - y β -amilasas, importantes en la degradación del almidón; la α -amilasa no actúa si no hay calcio presente.

I.3.1.4 – Agregados de sucedáneos.

I.3.1.4.a – Sucédáneos sólidos.

Se agregan entre un 15 – 30 % de cereales que no sufren el proceso de malteado, como por ejemplo cebada, trigo, maíz, sorgo y/o arroz, que pueden estar enteros, fragmentados o en forma de sémola o harina. El fin de este agregado es el aporte de azúcares suplementarios y sobre todo almidón, para convertirse en azúcar, y ser el sustrato nutritivo para las levaduras; sin éstos, el factor nutricional serían las proteínas. Con el agregado de los adjuntos, en el proceso de cocción, se obtiene una cerveza más liviana o ligera; si no se fermentaran los carbohidratos y sí las proteínas, se obtendría un tipo de cerveza mas fuerte. Existe en esos

casos un exceso de sustancias nitrogenadas de alto peso molecular que producirían cervezas turbias después del envasado.

Estos adjuntos desarrollan poca actividad enzimática y exigen, cuando se los utiliza, la incorporación de preparados de enzimas microbianas con actividad α -amilásica. Además, el agregado de los adjuntos puede mejorar la estabilidad del aroma y de la vida útil de la cerveza; como así también, puede disminuir o aumentar el color del producto final envasado; proporcionan un extracto barato y mejoran la capacidad espumante, dado su elevado contenido en glicoproteínas.

Los granos de estos cereales se lavan, se ablandan con el vapor de agua y se someten a procesos abrasivos para descascarillarlos y eliminar la aleurona y el embrión. El resto, el endosperma, se muele para obtener partículas de un tamaño adecuado (para hacerlas más susceptibles al ataque enzimático). Generalmente, las sémolas o harinas de estos cereales se cuecen en una caldera junto a un poco de malta. Esta última puede ser sustituida o suplementada por una enzima industrial (α -amilasa bacteriana) que se usa para disminuir la viscosidad de la papilla («*maish*»).

I.3.1.4.b – Sucedáneos líquidos.

En los métodos antiguos se producía el jarabe de glucosa por la hidrólisis ácida del almidón, obtenida a partir de la sémola de maíz. Los procesos modernos emplean enzimas industriales, como la α -amilasa bacteriana obtenida a partir del *Bacillus subtilis*, para realizar la hidrólisis enzimática del almidón. Las papillas de almidón se licuan mediante la adición de la α -amilasa bacteriana y un calentamiento a 85°C. Tanto la amilosa como la amilopectina se convierten en un conjunto de productos de degradación que van desde la glucosa hasta las dextrinas. Enfriando el jarabe obtenido y ajustándolo a una temperatura y pH adecuados para

la actuación de una segunda enzima, se logra una mayor conversión del mismo. Si la enzima es la amilasa de la malta, se ajusta el pH a 5,0 y la temperatura entre los 55° – 60°C. Se obtiene así, un jarabe rico en maltosa. Si la enzima es la amilo–glucosidasa fúngica, se utilizará un pH de 4,5 y una temperatura de 50° – 55°C, obteniéndose solamente glucosa.

Estos jarabes de glucosa preparados a partir de almidón compiten, en el proceso de fabricación de cerveza, con los obtenidos a partir del azúcar de caña y de la remolacha azucarera, que contienen un alto porcentaje de sacarosa y de una mezcla de glucosa y fructosa (azúcar invertido). Los jarabes de azúcar invertido cristalizan cuando la concentración es mayor al 83 % (p/p) y, por lo tanto, deben mantenerse a una temperatura de 40° – 50°C; por lo que, generalmente se almacenan a una temperatura de 50°C con el objeto de disminuir la viscosidad y facilitar la circulación por las tuberías.

Estos jarabes se añaden durante la cocción del mosto o en los procesos posteriores a la fermentación. Se usan para incrementar la concentración de azúcares en el mosto o para elaborar las cervezas denominadas de «*alta densidad*».

Además, con el agregado de un catalizador, por ejemplo de una sal de amonio, en los jarabes, se obtiene por calentamiento un caramelo (mezcla de azúcar y melanoïdinas) que se agrega a los mostos para darle mas color.

I.3.1.5 – Levadura de cerveza.

Para la fermentación se utilizan exclusivamente los de la especie *Saccharomyces*, distinguiéndose dos tipos:

(1)– **levaduras de fermentación de alta temperatura:** actúan a temperaturas mayores a 10°C. Por ejemplo, una de las levaduras es la *Saccharomyces cerevisiae Hansen* que se separan durante la fermentación formando grandes cúmulos de levaduras en la superficie

de la cerveza (por eso es de alta). Son capaces de fermentar la rafinosa (trisacárido de fructosa–galactosa–glucosa o β -D-fructofuranosil-O- α -D-galactopiranosil-(1,6)- α -D-glucopiranosido) hasta un tercio de la estructura, hidrolizando la unión fructosa–galactosa; pues, carecen de la enzima melibiasa que hidroliza la unión del azúcar melibiosa (galactosa–glucosa).

(2)– **levaduras de fermentación de baja temperatura:** actúan hasta temperaturas de 0°C.

Estas levaduras son de la especie *Saccharomyces carlsbergensis Hansen* que, durante la fermentación se depositan en el fondo, fermentan la mayoría de los azúcares como la rafinosa, pues tiene la enzima melibiasa.

Ambas levaduras fermentan la galactosa y la maltosa.

Procedimiento: se parte, por lo general, de una célula de levadura para producir el “starter” inicial; concluida la fermentación se retira parte de la levadura que se vuelve a utilizar para una próxima fermentación, hasta que la misma se haya contaminado o haya sufrido alguna degeneración. Se utiliza mosto de cerveza (2 l.) para propagar las levaduras y preparar el inóculo. Una vez multiplicadas las levaduras en este medio, se inocula el mosto colocado en un tanque (50 Hl.) de fermentación aireado y libre de microorganismos para evitar competencias. Cuando las levaduras se hallan en la fase de crecimiento logarítmico y la fermentación todavía no se ha completado se cambia de escala y se inoculan tanques de mayor volumen (500 Hl.). Se alcanza este objetivo con una baja concentración de nutrientes (< 0,1 %) y un suministro, en exceso, de aire estéril. Se calcula que 200 gramos de sacarosa y 10 g de levadura (en peso seco) rinden aproximadamente unos 100 g de etanol.

En la fermentación se agrega la enzima amilo–glucosidasa para degradar a las gomas, constituidas por los β -glucanos, que traen problemas durante la clarificación de la cerveza.

Estas enzimas se encuentran en hongos y bacterias. También, las levaduras de cerveza, poseen

una actividad proteolítica lo que le permite degradar las proteínas causantes de la turbidez en las cervezas frías.

I.3.2 – Etapas del proceso de elaboración de la cerveza.

I.3.2.1 – Preparación del cereal.

El cereal (con un contenido del 12 – 13 % de humedad) se lo somete a un proceso de limpieza por zarandas y separadores magnéticos para eliminar la tierra, piedras, pajas, cuerpos extraños metálicos, etc. Luego, por una máquina especial llamada “Trieur” (es un tambor cilíndrico que gira a alta velocidad que por la fuerza centrífuga mantiene a los granos enteros contra las paredes) se separan los granos partidos que caen por gravedad. Otras zarandas seleccionan los granos para obtener tamaños uniformes. Con el almacenamiento del grano, se produce la maduración fisiológica del mismo.

I.3.2.2 – Maceración del cereal.

Esta operación, en tanques de remojo, cilíndricos, de fondo plano y con 3 brazos giratorios denominados “giracleur” y que forman entre ellos un ángulo de 120°, tiene por objeto incorporar agua (de pH y composición definidos) a las semillas para su germinación. Además se solubilizan ciertos componentes del grano. Se alcaliniza el agua de maceración (con óxido de calcio o hidróxido de sodio) hasta un pH = 10 que permite lavar los granos, eliminar los taninos, posibles hongos de la masa de fermentación y ablandar las cáscaras. El contenido final de agua es del 42 – 44 % para la malta clara y del 44 – 46 % para la malta oscura. Se humedece el grano para acortar el tiempo de maceración, mejorar la germinación y formar las

enzimas necesarias. Se estaciona durante unas 5 horas y es importante procurar una buena ventilación (insuflando aire a través del agua), para eliminar el dióxido de carbono generado por la respiración en el medio e incorporar oxígeno y así tener una buena estimulación en la germinación, además de remover los granos. El grano respira y el germen se nutre fácilmente por la solubilización de sustancias como la sacarosa.

La temperatura normal de maceración es de 10° – 15°C; pero hay procesos en los que se utiliza el agua de maceración a 20° – 30°C (templada) o 35° – 38°C (caliente) para acortar el tiempo de maceración, llevándolo por lo general a 12 – 24 horas. Después de este tiempo, se deja descansar unas pocas horas y se vuelve a remojar por otras 12 – 24 hs., en las mismas condiciones. El macerado suele completarse en 2 días y los granos ya muestran un principio de germinación.

I.3.2.3 – Germinación.

Cuando las semillas han alcanzado el grado óptimo de humedad y están en condiciones de germinar, se las colocan en tambores especiales rotatorios o bandejas de doble fondo con agujeros, que permiten el paso del aire (éste último es una germinación neumática y se la conoce como el “método del saladín”). Las bandejas están provistas de un equipo removedor que voltea toda la masa en germinación para homogeneizarla, igualar la temperatura en toda la capa y proporcionar aire fresco para la misma. La remoción de los granos se hace los dos primeros días cada 7 hs. y luego cada 12 hs. Las bandejas permiten escurrir el exceso de agua por los agujeros de las mismas.

Tanto en tambores, como en cámaras con bandejas, se debe controlar:

- a) **aireación:** ya que también durante la germinación se produce dióxido de carbono. Se lo debe eliminar pues una alta concentración del mismo puede producir la fermentación y detenerse la germinación.
- b) **temperatura:** debe estar comprendida entre los 20° – 25°C (óptima 15° - 20°C). Para preparar **malta clara** se necesitan unos **7 días** y para obtener **malta oscura** requiere de unos **9 días** de germinación. En equipos de germinación neumática donde se insufla aire saturado con agua a 10° – 15°C a través de la masa de granos, la temperatura sube a unos 20°C con desprendimiento de dióxido de carbono. Se reduce en este proceso el tiempo entre 3 a 4 días y se puede utilizar un mayor espesor de lecho que en el caso de las bandejas.
- c) **humedad ambiente:** constante y del 42 %, para que las semillas no se sequen y permitan el desarrollo de las enzimas indispensables para el proceso de sacarificación.

Durante la germinación aparece la plúmula (brote) y las raicillas; es el nacimiento de la planta de cebada, desaparecen las paredes celulares, se degradan las proteínas a compuestos más simples y no se degrada el almidón. El almidón de cebada está compuesto por amilosa (1.000 – 4.000 unidades, peso molecular de 200.000 – 800.000, enlaces α -1,4 y conformación helicoidal) y amilopectina (peso molecular > 500.000, enlaces α -1,4 y ocasionalmente α -1,6 y molécula ramificada). Un 15 – 18 % (p/p) del almidón del endosperma es solubilizado, un 11 – 13 % (p/p) es utilizado por el embrión y un 4 – 6 % (p/p) es convertido en azúcares y dextrinas.

Si se parte de cebada con 100 partes de sustancias nitrogenadas (en peso), en la malta verde puede haber 94 partes y en las raicillas 6 partes. Cuando la malta se extrae con agua a 65°C unas 40 partes se solubilizan y las otras 54 permanecerán en el grano agotado. De las 40 partes solubilizadas aproximadamente unas 0,8 se encuentran como aminoácidos libres, 0,3 como prolina y el resto son utilizados por la levadura para el crecimiento.

Los lípidos, que se encuentran en la capa de aleurona y en el embrión, representan el 3,5 % (p/p) del grano y el 10 % de ellos es utilizado por el embrión en los procesos respiratorios. Las 2/3 partes son triacilgliceroles, 1/4 parte son fosfolípidos y el resto son glucolípidos. Para la fabricación de la cerveza interesa solamente los lípidos neutros (triacilgliceroles) pues son importantes para la síntesis de la membrana de las levaduras y para el “flavor” de la cerveza. Los tres grupos de lípidos son degradados por las estearasas, fosfatasas y glicosidasas y los ácidos grasos presentes originalmente en la cebada o los formados por el ataque de las enzimas son oxidados por las peroxidasas y oxigenasas.

El objetivo de la germinación es producir y aumentar la cantidad de enzimas para hidrolizar con ellas las sustancias contenidas en el grano para que durante el paso de cocción se puedan solubilizar correctamente. Cuando el cotiledón alcanzó una longitud de 0,6 a 0,75 de la longitud del grano, se estima que ya se han formado las enzimas necesarias; la “malta verde” así obtenida debe poseer un olor fresco y agradable. Esta malta todavía no es apta para la fabricación de la cerveza.

I.3.2.4 – Secado y tostado.

El objetivo del secado y tostado es el de detener la germinación de los granos, inactivar gérmenes y eliminar el exceso de humedad para asegurar una buena conservación y producir aroma y color adecuados a través de la reacción de Maillard. A esta operación se la denomina **malteado**. Se lleva a cabo en torres de calefacción indirecta (de 2 – 3 pisos de altura), provistas de pisos o chapas de metal perforados, a través de los cuales pasa un flujo alto de aire caliente al que se le suele agregar dióxido de azufre para contrarrestar la acción de las nitrosaminas (cancerígenas).

La “**malta verde**” obtenida en el paso anterior tiene una humedad entre 42 – 45 % (p/p) y con ésta operación se obtiene una “**malta seca**” con un contenido final de humedad de 2 – 5 % (p/p).

La malta verde entra al primer piso y se comienza con una etapa de secado a 35° - 40°C, reduciéndose el contenido de humedad del 43 % al 10 %, con esta humedad entra al segundo piso y sale del tercer piso con un 3,5 % de humedad; permaneciendo en cada piso unas 10 a 15 horas. En estas condiciones se obtiene una “**malta clara**” (tipo «*Pilsen*» para preparar cerveza blanca); mientras que, la obtención de la “**malta oscura**” (tipo «*Munich*» para preparar cerveza negra) se debe calentar a temperaturas mayores de 20°C y durante más tiempo incrementándose la hidrólisis. Después, se calienta gradualmente y en 2 horas hasta la temperatura de tostado que es de 80°C (75° a 100°C), manteniéndose en esta temperatura por 4 a 5 horas (para la malta clara) o a 105°C (para la malta oscura).

Maltas típicas del tipo «*Lager*» tienen un contenido de humedad del 4 al 5 % (p/p) y las maltas «*ale*» se deshidratan hasta el 2 al 3 % (p/p) de humedad.

También, se puede utilizar un equipo deshidratador con intercambiadores de calor. Se comienza con una entrada de aire a 50° – 60°C que inicialmente calienta el secadero y se ajusta el flujo de manera que la humedad relativa del aire, a la salida del secadero, sea del 90 al 95 %. Cuando se eliminó el 60 % del agua, se sube la temperatura y se reduce el flujo del aire de entrada para sacar el agua residual. Se repite este paso, o sea se disminuye aún más el flujo de aire hasta que al llegar a un 12 % de humedad, la temperatura aumentó a 65° – 75°C. Al llegar al 5 – 8 % de humedad, se reduce aún más el flujo y se eleva la temperatura a 80° – 100°C para obtener el color y humedad requeridos.

La malta seca se limpia, para separar las raicillas, en cilindros rotatorios en los cuales se deslizan los granos limpiándose por frotamiento, se enfría y se procede a almacenarla en los

silos o depósitos de acero inoxidable a 10° – 15°C y con un 2 a 5 % de humedad, con este paso se logra que la malta adquiriera la madurez adecuada.

El almidón se degrada a mezclas de polímeros de glucosa de bajo peso molecular y pocos azúcares simples, siendo degradada más rápidamente la amilopectina que la amilosa. Se tiene una estabilidad enzimática mayor que cuando la malta contenía un 45 % de agua, destruyéndose en esta etapa otras enzimas que podrían interferir en la fermentación. Las enzimas sacarificantes se mantienen sólo en la cantidad suficiente para producir la sacarificación en el proceso de cocción. Hay mayor destrucción de diastasas en las maltas oscuras que en las claras, por estar aquellas sometidas a mayores temperaturas.

I.3.2.5 – Molienda de la malta.

Los tegumentos que recubren al grano todavía continúan intactos, la rotura de los mismos se hace en forma mecánica para permitir la liberación de almidón y enzimas. A este paso se lo conoce también con el nombre de *mashing*. El endosperma se muele a un tamaño adecuado de partícula que facilite la hidratación de los gránulos de almidón y la liberación de sus enzimas. Se debe tener un especial cuidado para que la cascarilla permanezca intacta, sin partículas de harina adheridas, pues se dificulta la filtración posterior si las cascarillas resultan dañadas y esto se reflejará posteriormente en la extracción de sustancias amargas y taninos que provocará en la cerveza un gusto desagradable y una menor estabilidad coloidal. La acción de las amilasas es superficial y el mayor grado de molienda favorece dicha acción, pero no conviene un molido excesivamente fino, pues se pueden producir grumos que obstruyen los poros de los filtros.

Para la molienda se utilizan 2 procedimientos: **molienda seca** y **molienda húmeda**.

En la **molienda seca** la malta con un contenido de humedad del 3,5 – 5 % se fragmenta, haciéndola pasar por un equipo constituido por 2 ó 3 pares de rodillos cilíndricos trituradores con tamices o zarandas de diferentes mallas intermedias, y se separan las cáscaras en el primer tamiz y el almidón en el último. El producto molido resultante, compuesto por las glumas, sémolas y harina, se combina en la forma adecuada para el próximo paso.

Muchas veces se prefiere la **molienda húmeda**, que consiste en rociar la malta seca con agua o someterla a la acción del vapor de agua inmediatamente antes que entre en el molino, que produce una cascarilla más flexible pero resistente al molido.

I.3.2.6 – Macerado de la malta.

El proceso de maceración es una extracción a ebullición que consiste en mezclar proporciones adecuadas de malta con agua caliente (100 Kg. de malta y 8 Hl de agua) y un 20 a 40 % (p/p) como máximo de cereales adjuntos (harina o copos de arroz, maíz y/o trigo) según el C.A.A. (1998). Luego de una serie de ciclos de calentamiento y reposo se logra que el almidón de todos los componentes gelatinice y también se extraigan sustancias solubles, permitiendo una mayor actividad enzimática para que se transforme todo el almidón en un 80 % de azúcares fermentables (maltosa, glucosa y fructosa) y un 20 % de polisacáridos no fermentables (dextrinas) como productos principales. Con esta cocción también se liberan de los granos malteados las proteínas, que sufren la hidrólisis enzimática para transformarse en compuestos de menor peso molecular y que pueden dar lugar a una posterior turbidez. A todo este conjunto de componentes solubles en agua se lo llama **extracto**.

Parte de los pentosanos y β -glucanos, de las paredes celulares del endosperma de la malta, son solubles, aunque la gran mayoría no lo son. Los β -glucanos, a medida que van siendo progresivamente degradados durante el malteado y extracción, generan polímeros de menor

tamaño (solubles en el agua y mosto caliente) y luego, polímeros más chicos que los anteriores (solubles en agua y mosto fríos). Los polímeros solubles en el mosto frío traen aparejado un aumento en la viscosidad durante el enfriamiento del mosto, lo que dificulta la separación del mismo y puede producir una insolubilización de material gelatinoso. En esos casos, se agrega al mosto la enzima *β -glucanasa* (procedente de hongos y bacterias) para obtener productos solubles en el mosto frío.

El proceso se realiza en cubas o tinas (calderas) de maceración calefaccionadas y que están diseñadas de tal forma que permiten, cuando se completa el proceso de maceración, que se separe fácilmente la fracción líquida o **mosto sacarificado** (rica en azúcares fermentables por las levaduras) de los granos malteados agotados.

Los factores que influyen en el proceso de maceración son: el tiempo de duración de las operaciones, la temperatura, el pH y la concentración de la mezcla. El control del pH y de la temperatura durante el macerado de la malta es de vital importancia para la obtención de las sustancias aromáticas, que le van a dar la calidad a la cerveza. El mosto debe tener, aproximadamente, un pH = 6,0 por lo cual, a veces, se debe hacer correcciones.

En el mosto se encuentran las siguientes enzimas:

- 1) ***amilo-fosfatasa***: destruye los puentes fosfóricos con reducción de la viscosidad del producto.
- 2) ***α -amilasa***: hidroliza al azar las uniones α -1,4 de las macromoléculas de almidón, excepto cerca de las uniones α -1,6 y en los extremos de la cadena, convirtiéndolo en polímeros más chicos de 30 unidades de glucosa, produciendo así dextrinas lineales de amilosa y ramificadas de amilopectina. Tienen su acción óptima a 72° – 76°C y a un pH de 5,3 – 5,8; es más termoestable que la β -amilasa. También se la denomina enzima dextrinizante. Tiene el efecto de disminuir la viscosidad del almidón gelatinizado, para que luego pueda actuar la β -amilasa.

- 3) *β -amilasa*: degrada las moléculas de dextrina de 17 a 3 moléculas de glucosa, las dextrinas a maltosa en un 60 %, también se producen amilodextrina y eritrogranulosa. Tienen su acción óptima a una temperatura comprendida entre los 60° – 65°C y un pH de 4,5 – 4,7.
- 4) *proteínasa*: hidroliza las proteínas a compuestos solubles, actúan a una temperatura de 50° – 65°C y a un pH de 5,3 – 5,7.
- 5) *citasa*: degrada la celulosa, los xilanos, la pectina, los mananos, etc.
- 6) *fosforilasa*: ataca los extremos reductores de la molécula de almidón y fosforila las moléculas de glucosa a glucosa-1-fosfato, que luego es utilizada por el embrión.
- 7) *α -glucosidasa*: ataca los extremos no reductores de la cadena de almidón para dar glucosa facilitando el trabajo de las α - y β -amilasas sobre el almidón crudo.

Los métodos de control de la temperatura de maceración se dividen en dos grupos: **método de ebullición y método de infusión.**

En el **método de ebullición**, utilizado en Argentina, se incrementa la temperatura de la totalidad del sustrato de la siguiente manera: porciones de sustrato se las cocina a ebullición por separado y luego se mezclan con el sustrato que quedó en la tina de maceración. De acuerdo con el número de tales porciones hervidas, se pueden distinguir los *métodos de una, dos o tres fracciones*; la *primera fracción* sirve para preparar cervezas de cualquier clase (blanca o negra), de la *segunda fracción* se obtiene la cerveza blanca y de la *tercera fracción* se obtiene la cerveza negra.

Se describirá brevemente el método de las *tres fracciones* (utilizado en Alemania): se comienza a extraer por calentamiento en la tina de maceración la papilla, preparada con sémola o harina y agua (2 – 4 Hl de agua/ 100 Kg), a 37° – 40°C y se retira una primera

fracción (1/3 de la masa inicial de la papilla o maish) para su cocción en una caldera que se calienta hasta ebullición durante 20 – 30 min. después de lo cual se mezcla con lo remanente de la tina, con lo que la temperatura de la masa alcanza aproximadamente los 52° – 54°C. Se repite este procedimiento dos veces más, por lo cual las temperaturas aproximadas de la masa del sustrato principal son de 64°C (segunda fracción) con una relación de maltosa – dextrina de 100 – 37 y de 75°C (tercera fracción) con una relación de maltosa – dextrina de 100 – 57. El proceso se da por terminado cuando la masa alcanzó una temperatura de 78°C, en donde se inactivaron o destruyeron la mayoría de las enzimas, después de lo cual se filtra.

Si la cerveza “no fuera genuina”, los granos crudos o adjuntos se hierven en forma separada. Este calentamiento por fracciones (o etapas) se lleva a cabo con períodos de descanso de 30 min. entre cada aumento de temperatura; la finalidad de estos períodos es para darle tiempo a actuar a las amilasas y a las proteinasas específicas antes de que sean inactivadas por el calor; así a 40° – 54°C se tiene la proteólisis, a 54° – 65°C la hidrólisis del almidón y a 73°C la inactivación enzimática y separación del mosto. La temperatura alta favorece un contenido final alto en dextrinas y la temperatura baja favorece una mayor producción de alcohol, por la mayor producción de azúcares durante la sacarificación.

Para la elaboración de cervezas bajas en alcohol se puede iniciar la maceración a 37°C y, luego, por medio del agregado de masas de agua hirviendo, se puede alcanzar inmediatamente la temperatura de 70°C, y con ella el aumento de la actividad enzimática.

El método de infusión (o extracción por infusión), utilizado especialmente en Inglaterra, es para obtener cervezas sobre-fermentadas con alto contenido de alcohol. Se trabaja con una caldera de empastado (llamada *caldera de Steel*), que es un tubo cilíndrico con forma de “L”, en el que la sémola o harina de malta se hidrata mediante una aspersion con agua caliente (2,7 Hl/ 100 Kg) en la porción vertical del tubo y se mezcla, con un tornillo sin fin, en la porción

horizontal del mismo, de manera que lo que se vierte a la caldera de empastado es una papilla espesa y algo aireada. La temperatura de la masa es crítica en esta etapa, siendo muy difícil modificarla sin agregarle demasiada agua caliente. La temperatura mas adecuada es de 62° – 67°C (óptima 65°C) y para lograr esto se utiliza agua por aspersión entre 68° – 72°C. Con esta temperatura se prolonga la actividad de las amilasas que dan un mayor porcentaje de maltosa y de poder fermentativo. Antes de agregar la papilla (maish) a la caldera, ésta se calienta con agua; luego, a medida que el endosperma se hidrata, las enzimas actúan sobre las reservas nutricionales de la malta ya degradada. Los cerveceros trabajan a temperaturas que están cerca de la temperatura de inactivación de las amilasas, pero nunca llegan a la ebullición para lograr una velocidad cercana a la de máxima operación de la enzima. Lo hacen en tiempos que van de 30 – 120 min. También hay actividad proteolítica desde los 50°C (óptima) hasta los 65°C. El proceso, en total, dura 3 – 5 horas.

En estas calderas se pueden agregar copos o harinas de otros cereales en cantidades del 10 % (p/p) de los productos obtenidos de la molienda de la malta; por lo que el almidón de éstos debe estar predispuesto al ataque enzimático por las amilasas de la malta, que deben estar en una concentración elevada para que la degradación sea rápida y eficaz. Este ataque enzimático, en la caldera de extracción, produce la solubilización de ciertas partículas de la malta dejando un resto de material no degradable por las enzimas. El agua no sólo solubiliza las sustancias extraíbles de la malta, sino que, permea a través del lecho que forman las cascarillas (resto no degradable), resultando en un líquido acuoso rico en carbohidratos y sustancias nitrogenadas solubles. El mosto (denso) sacarificado se comienza a drenar cuando alcanzó una densidad relativa entre 1,060 – 1,100 y se deja de lavar cuando las aguas de lavado tienen una densidad relativa de 1,005.

I.3.2.7 – Separación de los residuos insolubles.

La separación de los residuos insolubles (heces de malta o bagazo, taninos y proteínas coaguladas) del mosto sacarificado, se realiza por el procedimiento clásico de filtración en un tanque o cuba preparada para tal efecto. Es semejante a una caldera de extracción pero tiene en el fondo unas placas filtrantes. Se bombea el mosto fluido desde el tanque de maceración hasta el tanque-filtro. Se trata que las mismas heces formen una capa filtrante de unos 35 cm. de espesor, pero no superior a los 50 cm. pues la filtración sería muy lenta. El mosto sacarificado, filtrado y turbio, obtenido al principio (contiene alrededor de un 16 – 20 % de extracto seco), se vuelve a bombear a la cuba de maceración y se repite el proceso anterior. Esto sirve para obtener una mayor cantidad de jugo, a partir de la capa de heces, por lo que se lavan éstas 3 ó 4 veces más con el mosto sacarificado.

También se pueden utilizar filtros-prensa automáticos conocidos con el nombre de «filtros de mosto», que son bastidores de acero inoxidable con capas filtrantes de polipropileno y ocupan menos espacio que las cubas-filtro. Los residuos insolubles quedan retenidos en esta etapa de filtración y en ambos casos se obtiene un **mosto sacarificado filtrado** que se utilizará para el proceso de cocción con lúpulo.

I.3.2.8 – Cocción del mosto.

La cocción del mosto sacarificado filtrado es un proceso de oxidación que se lleva a cabo en calderas de cocción a presión atmosférica. A los jugos obtenidos de la filtración del mosto (ajustado al pH = 5,2 con ácido fosfórico) se les agrega el lúpulo en forma de flores, pastillas o extracto, sí el lúpulo es muy aromático y con un aroma delicado se agrega 20 min. antes que termine la ebullición). Luego a la mezcla se la somete a una ebullición intensa durante 1 – 2,5

horas para eliminar el oxígeno que inhibe la coagulación, favorecer la oxidación y aumentar el color. El lúpulo se agrega en 3 porciones, la primera (1/4 del total) se agrega entre 15 – 20 min. después de haber comenzado la ebullición, es la más amarga y de peor calidad. La segunda porción (1/2 del total) se agrega después de los 30 min. del comienzo de la ebullición y es la que le da el sabor amargo a la cerveza. La última porción (1/4 del total) se agrega entre los 15 – 30 min. antes de terminar la ebullición y es un lúpulo de muy buena calidad. Además, en este punto de la cocción el pH final debe ser de 5,0.

Otra forma de cocción, que se ha desarrollado en los últimos años, es trabajar a presión por arriba de la atmosférica y a 140°C (4 min.), que no sólo ahorra tiempo sino que es más económico por el uso de los intercambiadores de calor.

Después de la cocción se deja que el residuo de lúpulo, conocido como “trub”, sedimente formando un lecho, a través del cual se filtra parcialmente el mosto con el lúpulo, para retirarlo de la caldera. Luego este mosto, que entra al tanque de filtración a 65°C, se enfría por intercambiadores de calor de placas de acero inoxidable y en contracorriente hasta los 15°C. Se deja que precipiten los sólidos, se filtra o centrifuga y se airea hasta llegar a una concentración de oxígeno disuelto en el mosto de 5 – 15 mg/l, para el crecimiento de las levaduras en el paso de fermentación. Después se enfría entre los 0° – 6°C preparándolo así para el próximo paso, tratando de evitar la recontaminación por microorganismos.

La cocción del mosto con el lúpulo cumple varios fines:

- (a) – detención de la actividad enzimática.
- (b) – esterilización del mosto.
- (c) – coagulación de las proteínas y precipitación de los taninos.
- (d) – precipitación del fosfato cálcico y disminución del pH.
- (e) – destilación de productos volátiles.
- (f) – evaporación del agua y concentración adecuada del mosto.

- (g) – producción de color por caramelización de azúcares, formación de melanoidinas y oxidación de los taninos.
- (h) – adquisición de un sabor amargo a consecuencia de las resinas del lúpulo.
- (i) – reducción de la tensión superficial por la influencia de los aceites y resinas.
- (j) – adición de aceites esenciales por el agregado de lúpulo.
- (k) – formación de espumas adecuadas por agregado de los α -isoácidos del lúpulo.

La composición del mosto con lúpulo tiene aproximadamente (en g/l.): 2,1 de fructosa, 9,1 de glucosa, 2,3 de sacarosa, 52,4 de maltosa, 12,8 de maltotriosa, 23,9 de carbohidratos no fermentables, 0,8 de nitrógeno total, 1,65 de aminoácidos libres totales, 0,25 de compuestos fenólicos (taninos), 0,035 de α -isoácidos y 0,065 de iones calcio. Hay además iones magnesio, sodio, potasio, hierro, zinc, cobre, manganeso, cloruros, sulfatos, carbonatos y fosfatos. Contiene vitaminas tales como la biotina, ácido pantoténico, inositol, tiamina, riboflavina y ácido nicotínico.

La concentración de lúpulo agregado determina la clase y calidad de la cerveza. Por ejemplo, la adición de conos secos de lúpulo en g. de piñas de lúpulo / Hl de cerveza es para la cerveza de malta y cerveza «*bock*» (oscura) de 50 – 90 g., para una cerveza «lager» (clara) es de 130 – 150 g., para la cerveza del tipo Munich (oscura) es de 130 – 170 g., para la cerveza del tipo Dortmund (clara) es de 180 – 220 g. y para la cerveza del tipo «*Pilsen*» (clara) es de 250 – 400 g.

I.3.2.9 – Fermentación.

Las levaduras necesitan para el crecimiento de azúcares simples, aminoácidos libres, sales y vitaminas, como así también de esteroides, ácidos grasos no saturados y oxígeno disuelto. Salvo el oxígeno y algunas sales, la malta y los sucedáneos satisfacen los requerimientos de

las levaduras. Los azúcares proporcionan la energía y son utilizados en las diferentes rutas biosintéticas y los aminoácidos se precisan para los procesos metabólicos.

La mayoría de las sustancias del mosto difunden a través de la pared de membrana de la levadura, otras (resinas, proteínas y taninos) se adsorben sólo en la superficie externa de ella.

La atraviesan fácilmente los componentes liposolubles y muy lentamente los hidrosolubles.

Existen tres métodos de acceso:

- 1) – **difusión simple** (ácidos orgánicos no disociados).
- 2) – **difusión catalizada** (algunos azúcares).
- 3) – **transporte activo** (aminoácidos).

Las dos primeras dependen de la presencia de un gradiente de concentración; pero la segunda tiene una velocidad de penetración mayor a la que impone el simple gradiente, debido a la catálisis enzimática. El transporte activo necesita de la presencia de adenosil-trifosfato (ATP), pues hay un importante consumo de energía por los mecanismos de acción en que participan las enzimas permeasas. Las sustancias, ya en el interior de la célula de levadura, no son utilizadas de inmediato sino que algunas forman “pools” de almacenamiento por cortos períodos de tiempo. Los azúcares son metabolizados secuencialmente: glucosa y fructosa lo hacen rápidamente, la sacarosa es hidrolizada por la invertasa (que está en la pared celular de la levadura), maltosa más lentamente y finalmente la maltotriosa (estas dos últimas son hidrolizadas a glucosa). Los aminoácidos también se absorben secuencialmente en 3 grupos: (i) grupo del glutamato, asparagina y serina; (ii) histidina y leucina y (iii) glicocola y triptofano.

En esta etapa se produce la fermentación de los azúcares, en el mosto con lúpulo, transformándolos en etanol y dióxido de carbono. Ocurre en dos fases, la primera es aeróbica (para la multiplicación de las levaduras) y la segunda es anaeróbica (la fermentación

propriadamente dicha). El proceso se realiza en tanques de fermentación que están provistos de camisas especiales, lo que facilita regular la temperatura. Son de gran capacidad y totalmente herméticos, lo que permite recuperar el dióxido de carbono generado para luego inyectarlo durante el envasado. Durante la fermentación el pH desciende de 5,2 a 4,2.

Hay dos tipos de fermentación: **fermentación de alta (temperatura o de superficie)** y la **fermentación de baja (temperatura o de fondo)**.

I.3.2.9.a – Fermentación de alta temperatura o de superficie.

La **fermentación de alta temperatura (15° – 22°C)** sólo tiene una etapa de **fermentación**. Se realiza en tanques cilindro-cónicos que pueden ser de acero inoxidable (o cobre), de cemento impermeabilizado con acero esmaltado, aluminio o acero inoxidable. Son cerrados y herméticos, de 150 – 500 Hl de capacidad y con camisa de refrigeración. El proceso se realiza en varias etapas y dura de 2 a 7 días. La levadura utilizada es la *Saccharomyces cerevisiae* Hansen. Forma una espesa capa superficial, que se separa en varias fracciones. No se realiza una post-fermentación, aunque, tanto en los depósitos como en las botellas podría llegar a producirse. Se acostumbra a bombear la **cerveza**, cuando aparece sobre la superficie un anillo de espuma, a otro tanque, dejando en el primer tanque las células de levaduras, proteínas precipitadas, resinas de lúpulo, etc.

La fermentación de alta temperatura ya no se utiliza mucho, pero es importante en Inglaterra, Escocia, Canadá y Bélgica para la elaboración de las cervezas «ale»; en Alemania, sólo se la utiliza para las **cervezas blancas**.

En la fermentación de las «ale», el mosto se lleva a una temperatura de 15° – 16°C que luego va subiendo lenta y controladamente, por medio de los serpentines o camisas de calefacción, hasta los 20° – 25°C (en 36 hs.). La actividad de la levadura se evidencia por el cúmulo de

espuma en la superficie y por el desprendimiento de dióxido de carbono. Luego, se refrigera para bajar la temperatura a unos 17°C (a las 72 hs.). En las últimas 10 hs. apenas hay fermentación y la levadura asciende hacia la superficie.

I.3.2.9.b – Fermentación de baja temperatura o de fondo.

En la fermentación de baja temperatura (4°– 15°C) se distingue la fermentación principal y la post-fermentación (clarificación y maduración). Se usa en la elaboración de las cervezas «lager».

En la fermentación principal el mosto con lúpulo (que contiene alrededor del 6,5 – 18 % de sustancias extractivas de la malta) se lleva enfriado a tanques de fermentación, que son de la misma forma y material que en el caso anterior, que se encuentran en los sótanos de las cervecerías, donde se puede mantener una temperatura constante entre los 5° – 6°C. Al principio, se debe airear, para permitir una buena multiplicación de las levaduras y luego se deja transcurrir la fermentación. Al mosto se le añade la levadura *Saccharomyces carlsbergensis* Hansen, en forma de una pasta espesa, normalmente en la cantidad de 0,5 – 1 g/litro; en otras fábricas utilizan, 1,5 – 2,5 g/l. Se inicia la fermentación cuando llega al fermentador el mosto aireado a 7° – 11°C, se inocula con la levadura en las mismas tuberías o en el tanque. Como la temperatura es muy baja, la fermentación es más lenta y puede llegar a durar entre 8 a 10 días. Se comienza con una ligera y controlada elevación de la temperatura del mosto hasta un máximo de 10° – 15°C (este proceso tarda entre 3 a 6 días). La fermentación se evidencia por la formación y cúmulo de espuma que toma el aspecto de coliflor («kräusen») y con desprendimiento de dióxido de carbono. Luego, se sigue reduciendo la temperatura mediante la camisa o serpentines de enfriamiento. El kräusen se hunde y las levaduras (de baja) se acumulan en el fondo del fermentador. Hasta aquí, se ha

transformado solamente un 85 a 90 % del extracto total fermentable. Se obtiene así una “**cerveza joven**” (todavía no apta para el consumo) que se transfiere a tanques o recipientes de depósito frío (5°C) para el reposo. Se recupera parte de la levadura sedimentada en el fondo del tanque de fermentación, se tamiza, se lava y se la utiliza para fermentaciones posteriores.

En la **post-fermentación** que es una **clarificación y maduración**, se efectúan en la cerveza joven, las siguientes operaciones (no precisamente pueden ocurrir en este orden):

- I. carbonatación
- II. modificación del sabor y del aroma
- III. estandarización del color
- IV. estabilización para evitar la formación de turbidez y los cambios de aroma por orígenes no biológicos
- V. clarificación
- VI. estabilización biológica

Esta “cerveza joven” debe tener azúcares fermentables, presentes originariamente en la cerveza o, más frecuentemente añadidos en forma de jarabe (0,35 – 2 l. jarabe / Hl de cerveza). Este jarabe contiene caramelo, azúcar (de remolacha o de caña) e hidrolizados de almidón ricos en maltosa. Esto da el sustrato necesario para la fermentación secundaria, además de la edulcoración y el color. A esta cerveza, se la deja reposar (esta operación se conoce con el nombre de *lagering*), en tanques o recipientes cilíndricos de grandes dimensiones durante 2 semanas a 4 meses a una temperatura entre -1,5°C y +2,0°C, con el objeto de eliminar el diacetilo (2,3-butanodiona) y sustancias que comunican el sabor a

“**cerveza verde**”. Durante el almacenamiento precipitan proteínas inestables, resinas, levaduras y otras sustancias indeseables que le dan turbidez; se continúa la fermentación de los azúcares residuales produciendo alcohol, glicerol, ácido acético y una sobresaturación de dióxido de carbono y se obtienen alcoholes superiores y ácidos a partir de lípidos y proteínas. El dióxido de carbono se acumula hasta llegar al valor óptimo de 0,4 % (p/p) ó 4000 ppm, el oxígeno no debe ser mayor a 0,2 ppm y también disminuye el pH del mosto hasta un valor aproximado de 4,0. Durante la maduración se producen reacciones entre los ácidos y alcoholes para dar los ésteres, que junto a las sustancias del lúpulo y de la malta, son importantes para el aroma de la cerveza. Entre estos ésteres predominan el acetato de etilo y el de amilo. Ahora tenemos la **cerveza madura** pero todavía falta clarificarla.

Al cabo de esas 2 semanas a 4 meses la cerveza madura se trasvasa a tanques cilíndricos llamados centrales, desde donde se envía a centrífugas que separan en gran medida todas las impurezas remanentes, especialmente la levadura. Después, esta **cerveza clarificada** se la pasa por filtros de tierras diatomeas que adsorben sustancias coloidales (complejos insolubles de proteínas – taninos, donde las proteínas tienen puntos isoelectrónicos entre pH = 3,0 – 5,5 y pesos moleculares entre 10.000 – 60.000 y los taninos son dímeros y trímeros de pro-antocianinas y antocianógenos), obteniéndose una cerveza de un grado de brillantez y claridad adecuados. Se completa con la incorporación de alginatos, que estabilizan la espuma, y un burbujeo de dióxido de carbono a la temperatura de 0°C para garantizar su fijación y eliminar el oxígeno residual presente, que afectaría negativamente la vida útil del producto. A ésta operación se llama *kräusening*. El burbujeo continúa hasta llegar a una concentración del 0,45 al 0,52 % (v/v). Ahora sí ya podemos hablar de **CERVEZA**. Con estas condiciones, la cerveza se deja reposar unas 24 horas, quedando luego lista para ser envasada para lo cual se la lleva a un “tanque de envasado o embotellado”.

I.3.2.10 – Pasteurización y envasado.

La distribución en botellas o latas de aluminio se hace a partir del «tanque de embotellado» en instalaciones de funcionamiento automático.

La pasteurización se realiza con las cervezas que son de larga conservación (cervezas de exportación o de ultramar) embotelladas o enlatadas, para evitar los enturbiamientos proteicos y alteraciones en el sabor. Se pasteuriza entre los 60° – 85°C en un baño de agua o al vapor; que, con mucha frecuencia se lo hace a 62°C durante 20 minutos. A la salida se enfrían las botellas lentamente rociando con agua fría de 2 a 4°C, para evitar los choques térmicos que provocan ruptura de los envases. Además se agregan, durante el proceso de clarificación, agentes adsorbentes o preparados enzimáticos proteolíticos para eliminar las sustancias proteicas que, cuando son de alto peso molecular, las desdoblan en productos solubles; con lo cual, las cervezas así tratadas pueden someterse a largos periodos de transporte o a la acción del frío sin que se enturbien.

Para el envasado estéril la cerveza se calienta a 70°C y 30 segundos, con un flujo continuo por intercambiadores de calor. O se la pasa por un sistema de microfiltros con un diámetro de poro menor al tamaño de las bacterias (microfiltración), y con ella se llenan las botellas o latas estériles. Este proceso se lo conoce como «pasteurización en frío».

La cerveza envasada en barriles, denominada “cerveza de barril” o mejor conocida como «*chopp*», por ser un producto perecedero está destinada para un consumo rápido, se mantiene bajo refrigeración y no necesita de la pasteurización. Esta cerveza es apreciada por tener un mejor “flavor” que la cerveza pasteurizada en botella o lata. La vida útil de la cerveza es de aproximadamente de 6 – 9 meses.

I.3.3 – Composición de la cerveza.

El contenido en **etanol** (p/p) de las cervezas con un alto contenido en extracto seco y fermentadas con levaduras de baja temperatura es del 1,0 – 1,5 % (p/p), en la “cerveza joven” del 1,5 – 2,0 % (p/p), en las fuertes del 3,5 – 4,5 % (p/p) y en las muy fuertes (bock) es del 4,8 – 8,0 % (p/p). Además, hay pequeñas cantidades de alcoholes superiores (68 mg/l), que vienen de la fermentación, como el 2–metilbutanol, 3–metilbutanol, 2–metilpropanol y 2–feniletanol.

El **extracto seco** (residuo que queda luego de evaporar el alcohol y otros componentes volátiles) va desde el 2 – 3 % (p/p) en las cervezas light hasta el 8 –10 % (p/p) en las cervezas muy fuertes. Se compone de un 80 % de hidratos de carbono, principalmente dextrinas. A partir del extracto, de la concentración de alcohol y de que 2 partes de azúcar producen 1 parte de alcohol en peso, se puede calcular la masa de extracto seco (A.O.A.C., 1995) contenido en el mosto original y que entró en fermentación, o sea:

$$St = 100 (E + 2,0665 A) / (100 + 1,0665 A)$$

donde

- **St:** contenido de extracto seco en el mosto original (% p/p)
- **E:** extracto seco final (% p/p)
- **A:** concentración de etanol (% p/p)

Con respecto a la presencia de **ácidos** en la cerveza, el dióxido de carbono tiene esencial importancia sobre las características organolépticas y la capacidad de conservación. En las cervezas fermentadas con levaduras de baja temperatura la concentración de dióxido de carbono es de 0,36 – 0,44 % (p/p) y en las cervezas blancas (fermentación de alta

temperatura) es de 0,6 – 0,7 % (p/p). También, se pueden encontrar pequeñas cantidades de los ácidos fórmico, acético, propiónico, láctico y succínico en una concentración que va del 0,1 – 0,4 % (p/p). El valor del pH puede oscilar entre 4,1 en una cerveza blanca hasta 4,7 en una cerveza negra fuerte.

Las sustancias **nitrogenadas** de la cerveza varían entre el 0,15 – 0,75 % (p/p). Proviene principalmente del material de partida y de las levaduras y se componen esencialmente de proteínas y de sus productos de hidrólisis (peptonas y aminoácidos) y son los responsables del enturbiamiento en frío. En la cerveza se encuentran los mismos aminoácidos que en la malta, siendo el ácido glutámico el de mayor importancia debido a que es uno de los responsables del sabor de la cerveza.

La concentración (% p/p) de **hidratos de carbono** oscila entre los 3 – 5 % (p/p), pero hay cervezas fuertes que tienen valores considerablemente mayores. Se tienen, además, dextrinas (3,0 – 6,0 % p/p), monosacáridos (glucosa en muy pequeña cantidad), disacáridos (maltosa, 0,5 – 1,0 %p/p) y oligosacáridos (maltotriosa, rafinosa, etc). También se encuentra el glicerol en una concentración del 0,2 – 0,3 % (p/p).

Las **sales minerales** se encuentran en la cerveza en una concentración del 0,3 – 0,4 % (p/p) y están formadas principalmente por fosfatos alcalinos (sodio y potasio) y alcalino – térreos (calcio y magnesio), hierro, cobre, cloruros, sulfatos y silicatos.

Las **vitaminas** que se encuentran en las diversas clases de cerveza son principalmente las del complejo B y están en el orden de los $\mu\text{g}/100\text{ml}$.

El aroma de la cerveza se debe a la presencia de **sustancias aromáticas** tales como alcoholes superiores, ácidos orgánicos volátiles, ésteres y compuestos carbonílicos (aldehídos y cetonas). La concentración total de los ésteres es de 40 – 50 mg/l, de los cuales 10 – 20 mg/l corresponden al acetato de etilo y el resto a los ésteres de acetato de isobutilo, de isoamilo, de feniletilo y caprilato de etilo.

Como compuestos carbonílicos se hallan: el etanal de 3 – 14 mg/l (concentraciones superiores a los 25 mg/l dan aromas deficientes), la 2,3–butanodiona y sus productos de reducción 3–hidroxi–2–butanona y el 2,3–butanodiol, y 2,4–pentanodiona. La 2,3–butanodiona en concentraciones superiores a los 0,35 mg/l da aromas anómalos, pero con una levadura bien activa se favorece su reducción al 3–hidroxi–2–butanona. Todos estos compuestos carbonílicos afectan negativamente el sabor de la cerveza cuando están juntos y en concentraciones superiores a los: 0,13 mg/l la 2,3–butanodiona, 1,5 – 1,7 mg/l el 3–hidroxi–2–butanona y 140 – 165 mg/l el 2,3–butanodiol. Estos productos se forman, principalmente, cuando se quiere acelerar la fermentación por medio de la agitación del caldo; esto incrementa la concentración de alcoholes superiores y de 2,3–butanodiona y disminuye el contenido de ésteres y de ácidos.

En la formación de la espuma participan ciertas **sustancias espumantes** tales como las proteínas, polisacáridos y sustancias amargas. Los β –glucanos ejercen una acción estabilizadora de la espuma aumentando la viscosidad. La adición de polisacáridos semisintéticos, como el alginato de propilenglicol, en una concentración de 4 g/Hl., produce espumas muy estables.

I.3.4 – Tipos de cervezas.

Debido a las diferentes variaciones en la preparación de la malta y del mosto, proporción de lúpulo, cepas de levaduras y la forma de conducir la fermentación y la maduración, se obtienen distintos tipos de cervezas que según Montes (1981) se dividen en:

tipo **Lager**: significa cerveza estacionada y es del tipo de la Pilsen (blanca); producida por fermentación con levaduras de baja, tiene un alto contenido de etanol y de extracto seco y bajo contenido de lúpulo.

- tipo **Bock**: es una cerveza oscura (negra), muy fuerte, espesa y con un alto contenido en etanol y extracto seco (16 %).
- tipo **Ale**: es una cerveza blanca de fermentación con levaduras de alta, de alto contenido en etanol y lúpulo, gusto fuerte. En los países de habla inglesa, se la conoce como la “cerveza de jengibre”.
- tipo **Porter**: es del tipo Ale pero más oscura, con mas extracto seco y más dulce.
- tipo **Stout**: es del tipo Porter pero más fuerte, con mas extracto seco (25 % p/p) y etanol (6,5 % p/p); es más oscura, de gusto dulce y con un fuerte olor a malta.
- tipo **Weiss**: está producida con trigo y por fermentación con levaduras de alta, es una cerveza mas bien clara, con un aroma fuerte a malta y a lúpulo, es ligeramente turbia.
- tipo **Pilsen**: es una cerveza blanca estacionada, tiene un alto contenido de lúpulo y de extracto seco (12 % p/p) en el mosto de partida.
- Tipo **Light**: es una cerveza blanca, con bajo contenido de etanol (3,5 % p/p) y con alto contenido de extracto seco.

Los constituyentes de algunas de las cervezas mencionadas anteriormente se muestran en las Tablas I.6 y I.7:

TABLA I.6 – Porcentajes, en peso, de los constituyentes principales de algunas cervezas.

Constituyentes (% en peso)	Tipos de Cervezas			
	LAGER	BOCK	ALE	PORTER
Alcohol	3,93	4,69	4,75	4,70
Extracto seco	5,79	7,21	5,65	6,59
Ácido láctico	0,15	0,17	0,28	0,28
Glicerol	0,17	0,18	---	---
Cenizas	0,23	0,26	0,31	0,36
Maltosa	0,88	1,81	1,87	2,62
Subst. Nitro.	0,71	0,73	0,61	0,65

Montes, L.(1981)

TABLA I.7 – Concentración de los constituyentes de cervezas bock, light y lager.

Constit.	Dim.	Cerveza bock		Cerveza light		Cerveza lager	
		Promedio	Rango	Promedio	Rango	Promedio	Rango
Agua	g	91,10	---	90,60	90 – 91,1	93,70	---
Proteína	g	0,40	---	0,50	---	0,25	---
Grasa	g	0,0	---	0,0	---	0,0	---
H. de C.	g	2,80	---	2,90	---	2,80	---
Mineral.	g	---	---	0,20	---	0,14	---
Sodio	mg	3,00	0,3 – 7,0	5,00	2 – 6	4,00	3 – 4
Potasio	mg	50,00	40 – 57	38,00	32 – 44	21,00	19 – 25
Calcio	mg	3,00	2 – 4	4,00	2 – 5	1,00	0 – 2

Constit.	Dim.	Cerveza bock	Cerveza light	Cerveza lager	Constit.	Dim.	Cerveza bock
		Promedio	Rango	Promedio			Promedio
Magnesio	mg	---	---	9,00	7 – 12	---	---
Fósforo	mg	25,00	---	28,00	25 – 30	13,00	---
Selenio	µg	19,00	---	---	0,1 – 19	19,00	---
Hierro	µg	---	---	42,00	10 – 200	---	---
Cobre	µg	---	---	40,00	20 – 50	---	---
Zinc	µg	---	---	20,00	10 – 20	---	---
Níquel	µg	---	---	---	1 – 200	---	---
Cromo	µg	---	---	0,70	0,2 – 2	---	---
Cloruro	mg	---	---	35,00	---	---	---
Fluoruro	µg	---	---	50,00	20 – 80	---	---
Ioduro	µg	---	---	0,70	0,5 – 0,9	---	---
Boro	µg	---	---	5,00	0,0 – 17	---	---
Mn	µg	---	---	29,00	200 – 300	---	---
Mo	µg	---	---	0,20	0,1 – 0,3	---	---
Caroteno	µg	5,40	---	---	---	---	---
Vit. B1	µg	4,00	3 – 6	4,00	3 – 6	---	---
Vit. B2	µg	30,00	20 – 40	30,00	20 – 40	---	---
Nicotin.	mg	0,88	0,7 – 1,1	0,88	0,7 – 1,1	---	---
A. pant.	µg	80,00	50 – 110	80,00	50 – 110	---	---
Vit. B6	µg	50,00	30 – 80	50,00	30 – 80	---	---
Biotina	µg	0,50	0,3 – 0,8	0,50	0,3 – 0,8	---	---

Constit.	Dim.	Cerveza	Cerveza	Cerveza	Constit.	Dim.	Cerveza
		bock	light	lager			bock
		Promedio	Rango	Promedio			Promedio
A. fólico	µg	---	---	5,00	4 – 8	---	---
Tir	mg	---	0,2 – 1,2	---	0,2 – 1,2	---	---
His	mg	---	---	0,63	0,3 – 1,1	0,46	0,4 – 0,5
Almidón	---	0,0	---	0,0	---	0,0	---
Dextrina	g	2,80	2,2 – 3,5	2,50	1,8 – 3,4	2,60	1,7 – 3,2
A.málico	mg	---	---	5,50	---	4,60	---
A.cítrico	mg	---	---	11,90	---	17,40	---
A.láctico	mg	---	---	3,20	---	18,10	---
A.oxálico	mg	---	---	1,60	0,6 – 2,7	1,50	---
A.succín.	mg	---	---	2,20	---	1,60	---
A.fumár.	mg	---	---	1,20	---	1,20	---
A.glicól.	mg	---	---	1,80	---	1,50	---
A.pirúv.	mg	---	---	0,25	---	4,00	---
A.glucón.	mg	---	---	4,80	---	1,70	---
A.galact.	mg	---	---	4,90	---	---	---
Glu	mg	---	---	13,30	---	21,50	---
Fru	mg	---	---	---	---	11,20	---
Mal	mg	---	---	187,50	---	207,00	---
Ara	mg	---	---	7,20	---	4,20	---
Xil	mg	---	---	---	---	1,40	---
Gal	mg	---	---	1,40	---	1,90	---

Constit.	Dim.	Cerveza bock	Cerveza light	Cerveza lager	Constit.	Dim.	Cerveza bock
		Promedio	Rango	Promedio			Promedio
Sorbitol	mg	---	---	1,70	---	2,30	---
Manitol	mg	---	---	2,00	---	2,10	---
Etanol	g	3,50	2,9 – 4,1	3,61	3,0 – 4,6	3,53	3,1 – 4,0
Extracto	g	5,40	4,2 – 6,7	4,80	3,5 – 6,6	5,02	4,1 – 6,2
Glicerol	mg	---	---	200,00	---	201,00	---

Souci y col., (1989). Nicotin.:Nicotinamida; A.:Acido; Pant.:Pantoténico; Vit.:Vitamina; Tir.:Tirosina; Succin.:Succínico; Fumár.:Fumárico; Glicol.:glicólico; Pirúv.:Prúvico; Glucón.:Glucónico; Galact.:Galáctico; Glu:Glucosa

El C.A.A. actualizado (1998), clasifica a las cervezas:

1) De acuerdo a los cereales utilizados.

- a) **Cerveza genuina:** cuando se elabora exclusivamente con un mosto proveniente de cebada germinada.
- b) **Cerveza:** cuando se elabora con mosto de cebada germinada y hasta un 40 % de....
- c) **Cerveza de....,** indicando el/los cereales empleados distintos de cebada: cuando se elabora con mosto de cebada germinada y más de un 40 % y hasta un máximo de 80 % de otras fuentes amiláceas. La denominación del o los cereales distintos de la cebada deberán indicarse en el rotulado con caracteres iguales a la palabra “cerveza”. Deberá indicarse la composición porcentual de la mezcla de cereales y en caso de utilizarse derivados de hidratos de carbono, éstos deberán declararse en el rótulo con su denominación.

2) De acuerdo al contenido de extracto del mosto original.

Para las cervezas claras:

- i. **Cerveza liviana:** cuando el contenido de extracto en el mosto original (extracto primitivo calculado) sea mayor o igual a 6 % (p/p) y menor o igual a 10,5 5 (p/p).

- ii. **Cerveza común o cerveza:** cuando el contenido de extracto en el mosto original (extracto primitivo calculado) sea mayor a 10,5 % (p/p).
 - iii. **Cerveza especial** (denominación optativa): cuando el contenido de extracto en el mosto original (extracto primitivo calculado) sea mayor a 11,5 % (p/p).
 - iv. **Cerveza extra** (denominación optativa): cuando el contenido de extracto en el mosto original (extracto primitivo calculado) sea mayor a 13,5 % (p/p).
- a) **Para las cervezas oscuras:**
- i. **Cerveza negra (tipo Munich):** se elaborarán con un mosto original que tenga un extracto (extracto primitivo calculado) mayor de 12 % (p/p). Si el extracto supera el valor de 13,5 % p/p podrán denominarse **Extra**.

3) **De acuerdo al contenido de alcohol:**

- i. **Cerveza sin alcohol:** cuando el contenido de alcohol sea inferior a 0,7 % (p/p).

Con la denominación siguiente se define al producto de cervecería:

Malta líquida: bebida fabricada exclusivamente con un mosto de cebada germinada, poco o nada fermentada, aromatizada o no, con lúpulo. Su contenido de alcohol deberá ser inferior a 1,2 % (p/p).

Canadá estableció requisitos cuantitativos para algunos de los ingredientes de las cervezas de los tipos «ale», «lager», «porter» y «stout» las cuales deben tener un contenido mínimo de etanol del 3,0 % (v/v) y de cenizas y extracto según se muestra en la Tabla I.8:

TABLA I.8 – Mínimos de cenizas y extracto de cervezas ale, lager, porter y stout.

Constituyentes	«Ale»	«Lager»	«Porter»	«Stout»
Cenizas (%v/v)	0,12	0,12	0,13	0,15
Extracto (%v/v)	3,5	3,5	4,0	4,0

Hart y Fisher, (1977)

I.4 – Ocurrencia de micotoxinas en cerveza

Algunas especies fúngicas pueden llegar a ser toxicogénicas bajo condiciones de desarrollo favorables. Entre los factores que influyen cabe destacar los meteorológicos durante el cultivo y cosecha (Jelinek, 1987, Gareis y col., 1989, Lacicowa y Kilcana, 1991, Gonzalez y col., 1997, Beattie y col., 1998) y la temperatura y humedad durante el almacenamiento y transporte (Scott, 1984, Resnik y col., 1995, Resnik, 1998). Estos hongos pueden producir *metabolitos secundarios* llamados **micotoxinas**, que son compuestos orgánicos tóxicos de diferentes estructuras químicas. Estas especies toxicogénicas pertenecen mayoritariamente a los géneros *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*. Las toxinas pueden estar presentes en toda la cadena alimentaria (Quiroga y col., 1995). La ingestión de estos alimentos contaminados con micotoxinas puede producir manifestaciones clínicas, tanto en animales como en humanos, llamadas **micotoxicosis** (Pacin, 1988 y 1990, Kuiper-Goodman, 1994).

Se han realizado diversos estudios de ocurrencia natural de micotoxinas y se han hallado tanto en las materias primas como en los alimentos procesados. Esto último permite inferir que algunas micotoxinas no son degradadas durante las etapas de procesamiento o que sólo pueden reducir parcialmente la contaminación inicial (Bennett y col., 1981, Lee y col. 1992, Glenn y Richard, 1994, Bennett y col., 1996, Neira y col., 1997).

Fischbach y Rodricks (1973) analizaron cervezas americanas y hallaron contaminación con ocratoxina A; Cook y Collis (1972), Peers y Linsell (1973) y Scott y Lawrence (1997) hallaron aflatoxinas en cervezas locales. Hlywka y Bullerman (1999) estudiaron la presencia de fumonisinas B1 y B2 en la misma bebida. Ruprich y Ostry (1995) y Shim y col. (1997) determinaron la presencia de DON y NIV en cervezas.

Mannio y Enari (1973) hicieron las primeras investigaciones sobre la estabilidad de toxinas de *Fusarium* en la elaboración de la cerveza. Con respecto al proceso de fabricación de la

cerveza los pocos estudios encontrados muestran una dependencia de la reducción con respecto al tipo de proceso realizado y confirman la posibilidad de transmisión de micotoxinas a la cerveza (Flannigan y col., 1985).

En la malta procesada a escala de laboratorio a partir de cebada contaminada naturalmente con ocratoxina A (OA) entre 420 – 830 ng/g, Krogh y col. (1974) no detectaron OA en el producto final. Sin embargo se detectó de 8 a 31 ng/g de OA en el producto final cuando la malta libre de esta toxina fue inoculada con 2 cepas de *Penicillium viridicatum*. Cuando se inoculó con *Aspergillus ochraceus* productor de esta toxina, no se detectó OA en el producto final. Esto permite suponer que la contaminación por micotoxinas producidas por las especies fúngicas provenientes de los cereales usados, puede incrementarse durante los diversos pasos de la producción de la malta y la cerveza (Flannigan, 1986, 1987, 1989, Jorgensen, 1998).

La ocurrencia natural de ocratoxina A en la malta fue determinada por varios autores con valores superiores a los 28 ng/g (Tressl y col., 1989; Majerus y col., 1993; Jiao y col., 1994).

Gjertsen y col. (1973) inocularon cebada con cepas de *Penicillium viridicatum* y *Aspergillus niveus*, productoras de citrinina, luego del proceso de malteado esta toxina no se halló en la malta, pero cuando se agregó citrinina pura a la cebada macerada en una concentración de 2 µg/g después de los 5 días de germinación se encontró el 6,4 % de la cantidad inicial de toxina (El-Banna, 1987). Harwig y col. (1977) determinaron que la velocidad de desaparición de la citrinina de la cebada aumentaba con el aumento de la actividad acuosa: a $a_w = 0,70$ el tiempo de vida media era de 7,8 días y a $a_w = 0,90$ era de 1,8 días.

En los experimentos realizados por Flannigan y col. (1985) y El-Banna (1987) con toxinas agregadas de *Fusarium* a la malta se observaron que los tricotecenos y la zearalenona (ZEA) son destruidos en gran parte durante el proceso de malteado. Cuando la toxina T-2 se agregó en una concentración de 10 µg/g a la cebada luego del primer macerado sólo se encontraba del 32 al 42 % inicial de toxina y del 7 al 12 % luego del segundo macerado. El proceso de

tostado reduce a niveles de trazas la contaminación con T-2 (Flannigan y col., 1984). En un experimento similar con ZEA en concentraciones entre 20 – 200 µg/g, se obtuvieron recuperaciones del 4 al 11 % y del 4 al 7 % con el primer y el segundo macerado respectivamente; mientras que del 9 al 13 % de esta toxina permanecía en la malta luego de tostada (Flannigan y col., 1985).

Sólo el 23 % del deoxinivalenol (DON) agregado a la cebada macerada no se destruye en el proceso de germinación (El-Banna, 1987). Muestras de cebada contaminadas con DON en una concentración de 4,8 a 22,5 µg/g, tuvieron una reducción como mínimo del 89 % de la toxina durante el macerado, pero los niveles de DON en la malta verde después de 5 días de germinación se incrementaron por arriba de 12,3 µg/g, 18 a 114 % mayor con respecto a los niveles de concentración en la cebada original (Schwarz y col., 1995).

El 3-acetildeoxinivalenol (3-ADON) también sobrevive al malteado (Scott, 1996).

La concentración de ZEA se ve incrementada entre el 233 – 4900 % cuando la cebada fue inoculada con *Fusarium culmorum*, luego del proceso de malteado (Haikara, 1983).

Schwarz y col. (1995), determinaron en 2 muestras de cebada inoculadas con *Fusarium graminearum* que durante la maceración se reducen los niveles de ZEA de 0,4 y 1,5 µg/g a 0 y 0,5 µg/g respectivamente, mientras que en la germinación se incrementan a los 5 días los niveles a 1,3 y 4 µg/g respectivamente.

Los trabajos publicados sobre la ocurrencia natural de DON en cebada y en malta de cebada (Lee y col., 1985; Lee y col., 1986; Niessen y Donhauser, 1993; Weddeling y col., 1994; Perkowsky y col., 1997) y de ZEA en maltas de cebada y de maíz (Lovelace y Nyathi, 1977; Weddeling y col., 1994) junto con la evidencia de los experimentos del proceso de malteado anteriormente mencionados, sugieren que éstas micotoxinas entran al proceso de fabricación de cerveza como contaminantes de la cebada, además de incrementarse en el proceso de malteado.

Aunque los experimentos de malteado no se han llevado a cabo con granos contaminados con aflatoxinas, se sabe que estas micotoxinas han sido halladas en maltas de cebada (Fukal y col., 1990), en maltas de maíz (Lovelace y Nyathi, 1977) y en maltas de sorgo (Trinder, 1988).

La malta de cebada transmite las micotoxinas a la cerveza; pero también lo pueden hacer los cereales adjuntos cuando se encuentran contaminados (Canales, 1979; Stewart, 1995; Hardwick, 1979; Gilbert y col., 1983; Hosene, 1994). El lúpulo raramente ha sido investigado como una posible fuente de micotoxinas (Woller y Majerus, 1982; Majerus y col., 1993).

Cuando la OA está presente en una concentración de 0,23 µg/ml en la cerveza, es estable al proceso de ebullición después de 20 min de este proceso (Tomova, 1977); el 94 % de OA después de la cocción a ebullición durante 30 min permaneció en la malta a la que se agregó trigo con una contaminación inicial de 125 ng/g (El-Banna y Scott, 1984). Por lo tanto, esta parte del proceso de malteado no reduce la contaminación de OA en la cerveza (TABLA I.9). Krogh y col. (1974), encontraron una significativa pérdida, mayor del 89 % durante la molienda. Solo del 2 al 7 % de OA fue hallado en la cerveza terminada. Por otro lado, Chu y col. (1975), obtuvieron entre el 48 – 54 % de OA en el mosto de cerveza luego de la ebullición y detectaron concentraciones mayores en cerveza que las obtenidas por otros autores (TABLA I.9).

En el paso final de la fermentación final se obtiene una reducción del 67 al 79 % de OA del mosto de cerveza (Krogh y col., 1974); del 48 al 71 % según los experimentos de Chu y col. (1975); pero solamente del 2 al 13 % en las fermentaciones del mosto de cerveza llevadas a cabo por Scott y col. (1995) quienes usaron 3 cepas diferentes de *Saccharomyces cerevisiae*. La levadura de cervecería, obtenida como un subproducto de la fabricación de cerveza es poco probable que contenga ocratoxina A, pues es tratada con una solución alcalina de pH = 9 (Nagodawithana, 1991).

TABLA I.9 – Efectos del malteado sobre la ocratoxina A.

Sustrato	Concentración Inicial (µg/g)	% de recuperación de ocratoxina A			Referencias
		Residuos insolubles	Mosto	Mosto fermentado	
Primera maceración	10		54		Chu y col., (1975)
	1		48		
Segunda maceración	10	39		20	Nip y col. (1975)
	1	28		8	
Cebada (no malteada)	27,5	6	11		Gjertsen y col. (1973). Krogh y col. (1974)
	2,1	10	19		
Malta	1	10	16		
Mosto	0,19			21	87 – 98 Scott y col. (1995)

Hasta la década del '90, la ocurrencia natural de OA en cerveza no había sido reportada, excepto por Payen y col. (1983) que determinaron una contaminación por esta toxina en 4 cervezas sobre un total de 37 cervezas europeas analizadas con niveles de 5 – 110 ng/ml (media de 56 ng/ml). Otros 5 estudios sobre 282 muestras de cervezas europeas analizadas antes de 1990, por métodos de cromatografía en capa delgada (TLC) o cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con límites de detección entre 1 – 5 ng/ml, dieron negativas para ocratoxina A (Majerus y Woller, 1983; Vecchio y col., 1985; Cerutti y col., 1987; Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, 1987; Tressl y col., 1989).

Fischbach y Rodricks (1973) no hallaron OA en las 130 muestras de cervezas de Estados Unidos analizadas con un límite de detección de 10 ng/ml probablemente por utilizar metodologías analíticas menos sensibles.

Desde 1990, el límite de detección ha ido mejorando a valores menores o iguales a 0,1 ng/ml (Gilbert, 1996), con lo que actualmente se encuentra frecuentemente cervezas contaminadas con bajos niveles de ocratoxina A según lo indica la TABLA I.10.

TABLA I.10 – Ocurrencia de ocratoxina A en cerveza (1992 – 1995).

Origen de la cerveza	Ocurrencia (+ / totales)	Límite de detección (ppb)	Muestras positivas		Referencias
			Media (ppb)	Rango (ppb)	
Alemania	0 / 93 52 importadas	1,0 – 2,0	---	---	Majerus y Woller (1983)
Alemania	12 / 56	0,1	0,85	< 0,13 – 1,53	El-Dessouki (1992)
Alemania	19 / 108	0,1	No detectado	0,1 – 1,5	Majerus y col. (1993)
Alemania	80 / 194	0,05	0,10	0,05 – 0,44	Jiao y col. (1994)
Alemania	3 / 21	0,1	No cuantificable	---	Weddeling y col. (1994)
Canadá	26 / 41	0,05 – 0,1	0,06	Trazas – 0,2	Scott y col. (1995)
Reino Unido	14 / 16	< 0,002	0,014	0,002 – 0,052	Jenkins, (1994)
Suiza	7 / 7	< 0,01	0,012	0,01 – 0,033	Zimmerli y Dick (1995)

Los máximos niveles de OA (1,53 ng/ml) fueron hallados en cervezas oscuras alemanas (El-Dessouki, 1992). Este estudio ha sido parte de una larga investigación reportada por Majerus y col. (1993), mostrando que la ocurrencia de OA en cervezas oscuras de cebada ha sido del 35 % comparado con el 8 % de cervezas claras de cebada, y al menos 5 de las cervezas oscuras de cebada y una cerveza oscura de trigo contenían una concentración mayor a 1 ng/ml. Jiao y col. (1994) analizaron cervezas de cebada alemanas y hallaron que el 41 % de las oscuras y el 44 % de las claras presentaban contaminación con OA. El-Dessouki, (1992) y Jiao y col., (1994) analizaron cervezas alemanas de trigo y la contaminación por OA no superaban niveles de 1,04 ng/ml.

Excepto, por los análisis realizados por ELISA hechos por Weddeling y col. (1994), todas las investigaciones entre los años 1992 – 1995 (TABLA I.10) usaron cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detector de fluorescencia para la determinación de OA.

El uso de una columna de inmuno-afinidad como “cleanup” (TABLA I.10; Jenkins, 1994; Scott y Kanhere, 1995; Zimmerli y Dick, 1995 y Biocode Ltd., UK, información comercial,

1995) permitió detectar y cuantificar OA en partes por trillón (ppt = ng/Kg). La confirmación e identificación por cromatografía gaseosa–espectrometría de masa (GL–MS), ha sido utilizada luego de la derivatización de OA y conversión al éster metílico O–metilocratoxina A con niveles de 0,06 ng/ml (Jiao y col., 1994). La confirmación con la formación del mismo derivado, pero utilizando cromatografía líquida, ha sido usada para detectar OA hasta niveles de 0,02 – 0,20 ng/ml (Scott y Kanhere, 1995; Zimmerli y Dick, 1995).

La citrinina no ha sido detectada en el mosto de cerveza o en los granos agotados (Gjertsen y col, 1973; Krogh y col., 1974). En un estudio de ocurrencia natural de citrinina en 41 cervezas alemanas y 52 de otros países, cuando los límites de detección eran de 1 – 2 ng/ml, no mostraron contaminación por citrinina (Majerus y Woller, 1983). Investigaciones adicionales en 64 muestras de cervezas analizadas en Italia producidas en este país o de otros países europeos dieron resultado negativo para la citrinina con un método similar y límites de detección de 0,5 – 1 ng/ml (Vecchio y col., 1985; Cerutti y col., 1987). A pesar que la citrinina puede coocurrir con la ocratoxina A formada en los sustratos de los cereales por el *Penicillium verrucosum* (Madhyastha y col., 1990), esto no es hallado en la cerveza. Una solución acuosa de citrinina calentada a 90° – 100°C produce un aumento de la citotoxicidad (Trivedi y col., 1993a), debido a la formación de una nueva citotoxina “citrinina H1” que ha sido identificada estructuralmente por Trivedi y col. (1993b). La citrinina H1 está formada por la unión de 2 moléculas de citrinina con una pérdida de 2 unidades de carbonos y es diez veces más citotóxica que la citrinina.

Las aflatoxinas B1 y B2 son moderadamente estables en agua a ebullición por más de 2 horas; mientras que, las aflatoxinas G1 y G2 son casi completamente destruidas después de ese periodo de tiempo (Scott, 1996). Tabata y col. (1992) calentaron 15 minutos a ebullición una sopa de sémola de maíz contaminada por las cuatro aflatoxinas y no se observó reducción.

Similarmente, el 72 % de aflatoxina B1 era recuperado de la sémola de maíz después que ésta era cocinada a ebullición durante 30 minutos (Stoloff y Trucksess, 1981).

Chu y col. (1975) hallaron que la retención de aflatoxina B1 agregada en una concentración de 10 y 1 µg/g a la malta o sémola de maíz al principio de la cocción del cereal y luego de la molienda de la malta son similares a los obtenidos con OA. De esta manera, el 40 – 49 % de aflatoxina B1 era recuperada del mosto a ebullición y del 18 – 27 % en la cerveza final; el 45 – 55 % se perdía durante la etapa final de la fermentación. A partir de malta con agregado de aflatoxinas, Steiner y Länzlinger (1978) determinaron que el 5 % de las aflatoxinas B1 y B2 y el 10 % de las aflatoxinas G1 y G2 permanecía en la cerveza y alrededor del 50 % de aflatoxinas en los residuos insolubles. Se utilizó maíz colorado conteniendo un agregado del 60 – 75 ng/g de aflatoxina B1, para elaborar cerveza de acuerdo a un proceso de elaboración artesanal nigeriano y se observó que se retiene el 41 % de la aflatoxina en la cerveza (Okoye, 1986a).

La cocción y fermentación de maíz y de otros granos mostraron una alta retención de aflatoxinas (Dam y col., 1977; Lillehoj y col., 1978). No fue observada degradación de aflatoxina B1 después de los 20 días de fermentación en el medio líquido por 2 cepas de *Saccharomyces cerevisiae* (Mann y Rehm, 1977).

Se detallaron sólo algunos estudios sobre ocurrencia de aflatoxinas en cerveza. El primero en Africa, principalmente en cervezas nativas que usualmente contienen sólidos y el segundo en cervezas comerciales fabricadas en Europa. Los resultados de las cervezas africanas están resumidos en la TABLA I.11. Los métodos de análisis usados fueron cromatografía en placa delgada (TLC), minicolumna – fluorometría y espectrofotometría ultravioleta – visible (UV).

TABLA I.11 – Ocurrencia de aflatoxinas en cervezas. Africa.

Origen y tipo de cerveza	Ocurrencia (+ / totales)	Límite de detección (ppb)	Muestras positivas		Referencias
			Media (ppb)	Rango (ppb)	
Kenya (nativa)	16 / 304	1 (B1+ B2)		1 – 2,5 (B1+B2)	Peers y Linsell (1973)
Zambia (maíz: nativa y comercial)	0 / 25		---	---	Lovelace y Nyathi (1977)
Nigeria (mijo: nativa)	32 / 40		64 (B1)	1,7 – 138 (B1)	Okoye y Ekpenyong (1984)
Nigeria (maíz guinea, mijo: indígena)	4 / 4		187 (B1+ G1)	92 – 262 (B1+ G1)	Alozie y col. (1980)
Nigeria (mijo)	10 / 10		25 (B1)	4 – 50 (B1)	Obasi y col. (1987)
Sudáfrica (sorgo: industrial)	7 / 150	0,05–0,1 (B1)	0,1 (B1)	0,05 – 0,13 (B1)	Trinder (1988)
África (maíz, mijo o sorgo: nativa y comercial)	100 %	---	262 (B1+ G1)	---	Scott (1996)

Excepto para algunas cervezas de Kenya y cervezas de sorgo de Sudáfrica, la identidad de las aflatoxinas no fue confirmada. La aflatoxina B1 fue determinada en la cerveza de sorgo, elaborada industrialmente por una TLC–bidimensional y confirmada por una derivatización con ácido trifluoroacético y se utilizó HPLC cuando los niveles de esta toxina eran mayores a 0,4 ng/ml (Trinder, 1988).

En la TABLA I.12 se muestran los resultados de cervezas europeas. Los métodos utilizados fueron TLC, minicolumna o radioinmuno–ensayo y el rango de los límites de detección estuvieron entre 0,14 – 10 ng/ml.

TABLA I.12 – Ocurrencia de aflatoxinas en cervezas. Europa.

Origen de la cerveza	Ocurrencia (+ / totales)	Límite de detección (ppb)	Referencias
Francia / Europa	0 / 86	No tiene	Payen y col. (1983)
Rumania	0 / 8	10	Galea y Bara (1976)
Europa	0 / 86	0,5	Woller y Majerus (1982)
Italia	0 / 40	0,15 (B1, G1)	Vecchio y col. (1985)
Europa	0 / 24	0,14 (B1, G1)	Cerutti y col. (1987)
Reino Unido	0 / 50	5	Ministry of Agriculture, Fisheries and Food (1987)
Alemania	0 / 75	0,2 (B1)	Tressl y col. (1989)
Checoslovaquia	0 / 34	0,2 (B1)	Fukal y col. (1990)
México (analizadas por el Reino Unido)	3 / 3	< 0,005 (B1)	Jenkins (1994)
Canadá	7 / 24 4,1 – 76 (B1) 7,4 y 8,4 (B2)	0,019 (B1, G1) 0,015 (B2, G2)	Scott y Lawrence (1997)
Europa	0 / 414	0,005 – 0,5	Scott (1996)
Brasil (analizadas por Canadá)	2 / 14	No tiene 9,8 – 33,8	Rosa y col. (1996)
Japón	1 / 1	0,013	Ono y col. (1982)

En la determinación de aflatoxinas se incorporó una nueva metodología de “cleanup” con una columna de inmuno-afinidad que permite disminuir los límites de detección (rango de ng/ml). Con éste método, se halló en el Reino Unido aflatoxina B1 en 3 cervezas importadas de México (Jenkins, 1994; Biocode, información comercial, 1995).

En Japón, Ono (1982) detectó 12,5 ng/ml de aflatoxina B1 en una muestra de cerveza aunque la misma no fue confirmada.

Niessen y Donhauser (1993) elaboraron cerveza utilizando malta contaminada naturalmente y encontraron que en la molienda a 50° – 72°C se producía un incremento en la concentración de DON de 3 a 8 veces con respecto a la contaminación inicial de la malta. Esto podría ser debido a la liberación del DON de las proteínas conjugadas. El DON no se degrada en el proceso de elaboración de cerveza, ni por la ebullición del mosto de cerveza o durante la fermentación; de esta manera, es posible encontrar en el producto final el DON en una

concentración apreciable (Niessen y Donhauser, 1993). Estos análisis fueron hechos utilizando el test de ELISA. Scott y col. (1992) y Böswald y col. (1995) utilizando tres cepas de elaboración de cerveza y una cepa de vino del género *Saccharomyces cerevisiae* observaron que el DON no se degrada durante el proceso de fermentación. Schwarz y col. (1995) con malta contaminada naturalmente, observaron que la concentración de DON se mantenía durante todas las etapas del proceso de elaboración de cerveza.

Cuatro muestras de sémola de malta conteniendo DON entre 1,8 – 17 µg/g se utilizaron para elaborar cerveza y en este producto las concentraciones de DON obtenidas variaron entre 0,4 – 3,2 µg/g, lo que representa una retención de DON del 80 – 93 % en la cerveza. Se utilizó la cromatografía gaseosa–espectrometría de masa (GC–MS) para analizar los extractos de acetato de etilo de la cerveza. En la malta original, se determinó 17 µg/g de DON y luego de la elaboración de cerveza en los granos y levaduras agotadas se encontraron concentraciones de DON de 1,0 y 4,7 µg/g respectivamente. Esto representa solamente el 2,7 % de la contaminación original de DON. En este estudio también se observó la estabilidad del DON al ser hervido el mosto de cerveza (Schwarz y col., 1995). Con respecto al 15–acetildeoxinivalenol (15–ADON) a partir de malta conteniendo unos 2,8 µg/g de 15–ADON, la cerveza no presentaba contaminación y solamente un 18 % aparecía en los granos agotados (Schwarz y col., 1995).

En la TABLA I.13 se muestran varios de los resultados encontrados en bibliografía sobre ocurrencia del DON en cerveza con el lugar de procedencia de las mismas.

Payen y col. (1983) utilizaron técnicas por TLC y GC para detectar trazas de acetil T–2 y toxina HT–2 en una cerveza contaminada con DON; en 5 cervezas determinaron DAS (< 10 – 35 ng/ml) y 3 de las cuales contenían también toxina T–2 (< 10 – 42 ng/ml). En los trabajos de Vecchio y col. (1985) y Cerutti y col. (1987) analizaron la posibilidad de contaminación por T-2 en 14 muestras, HT–2 y DAS en 64 muestras. Todas las muestras fueron negativas. El

límite de detección para el método por TLC tenía un rango de 5 – 30 ng/ml (Trucksess y col., 1986).

TABLA I.13 – Ocurrencia de deoxinivalenol en cervezas.

Origen de la cerveza	Ocurrencia (+ / totales)	Límite de detección (ppb)	Muestras positivas		Referencias
			Media (ppb)	Máximo (ppb)	
Francia/Europa	1 / 49	No tiene	20	20	Payen y col., 1983.
USA	0 / 14	50	---	ND	Trucksess y col., 1986.
Canadá	29 / 50	0,1 – 1,5	5,4	50	Scott y col., 1993.
Alemania	85 / 196	50	205	569	Niessen y Donhauser, 1993. Niessen y col., 1993.
Alemania	18 / 18	1,25	5	9	Weddeling y col., 1994.

Scott y col. (1993), analizaron 50 muestras de cervezas por el método de GC-MS para DON derivatizado con heptafluorobutiril-éster y realizaron la confirmación posterior con el derivado trimetilsilil-éster. El 21 % de las 33 muestras canadienses y el 12 % de las 17 muestras importadas contenían niveles de DON mayores a los 5 ng/ml. El nivalenol (NIV) fue detectado en 3 de las muestras contaminadas con DON en niveles de 0,1 a 0,84 ng/ml. En Alemania se analizaron cervezas usando un test de ELISA para DON (Niessen y Donhauser, 1993; Niessen y col., 1993) o para un derivado luego de la conversión al triacetato (Weddeling y col., 1994). El test de ELISA para DON se comparó con los resultados obtenidos por el análisis por HPLC. Las metodologías daban resultados comparables hasta niveles de 580 ng/ml (Niessen y Donhauser, 1993). El máximo nivel de DON hallado en estudios de ocurrencia de cervezas comerciales fue de 569 ng/ml en una cerveza de trigo (Niessen y Donhauser, 1993; Niessen y col., 1993). La concentración media de DON y la

frecuencia de contaminación por esta toxina en las cervezas de trigo (245 ng/ml de media y 74,6% de frecuencia) fueron significativamente mayores que las cervezas lager hechas de cebada malteada (148 ng/ml y 28,5%). Cervezas comerciales con problemas de “gushing” (descarbonatación espontánea al abrir el envase), TABLA I.14, tenían significativamente mayores concentraciones de DON comparadas con cervezas “no-gushing” (Niessen y Donhauser, 1993, Niessen y col., 1993).

TABLA I.14 – Deoxinivalenol y “gushing” en cervezas comerciales.

Tipo de cerveza	No. De muestras	Gushing (+)	Gushing (-)	DON(+)	DON(+) gushing (+)	DON(-) gushing (+)	DON(+) gushing (-)	Media DON (ppb)	Máx. DON (ppb)
Trigo malteado, ferment. de alta	67	37,3 % máximo 172 ppb	62,7 % máximo 569ppb	74,6 %	26,9 % media 365ppb	10,4 %	47,8 % media 211ppb	245	569
Cebada malteada, ferment. de baja	123	8,9 %	91,1 %	28,5 % media 269ppb	5,7 %	3,3 % media 123ppb	22,8 %	148	478
Cebada malteada, ferment. de alta	6	0,0 %	100 %	0,0 %	---	---	---	---	---

Niessen y col., 1993

Se ha desarrollado un método por GC-MS que involucra una extracción con acetato de etilo y un análisis directo del extracto que permite la obtención de resultados rápidos (Schwarz y col., 1995; Hastings y Stenroos, 1995).

La zearalenona (ZEA) es metabolizada en gran parte a β -zearalenol (β -ZeOH) por cepas de *Saccharomyces cerevisiae* también utilizadas en la elaboración de cerveza (Matsuura y Yoshizawa, 1985; Scott y col., 1992; Böswald y col., 1995). Además se comprobó que cepas de *Fusarium*, contaminantes naturales de la cebada y los cereales adjuntos, pueden metabolizar la ZEA en α -ZeOH y β -ZeOH (Richardson y col., 1985). Schoentzaal (1984) fue el primero que planteo que este metabolito debería estar en la cerveza. El promedio de la

conversión (no corregida por el método de recuperación) de ZEA a β -ZeOH y α -ZeOH por tres cepas de *S. cerevisiae*, después de 7 días de fermentación, fue de 63 % y 7,3 % respectivamente y sólo se detectó el 1,8 % de ZEA remanente (Scott y col., 1992). In vitro, cepas de *S. cerevisiae* de cerveza y una cepa de *S. uvarum* de vino producían también la conversión de la ZEA mayoritariamente a β -ZeOH (Matsuura y Yoshizawa, 1985; Sunjic y col., 1991). Böswald y col. (1995) encontraron una cepa de *S. cerevisiae* que convertía ZEA en β -ZeOH y α -ZeOH.

Al utilizar en la fabricación maltas con una contaminación entre 1,6 y 4,8 $\mu\text{g/g}$ de ZEA, la ZEA no era detectada en las cervezas, pero los niveles de contaminación en los residuos insolubles fue de 3,6 y 9,5 $\mu\text{g/g}$, correspondiendo al 66 % y 61 % respectivamente de la contaminación inicial. La ZEA no era detectada en la levadura agotada. En la elaboración de cerveza con el procedimiento artesanal originario de Nigeria, con maíz guinea malteado que contenía inicialmente ZEA entre 562 – 2504 $\mu\text{g/g}$, el remanente promedio de ZEA fue del 51 % en cerveza y del 12 % en el residuo sólido (Okoye, 1987). La ZEA en el proceso de fermentación para la obtención de etanol se concentra en los residuos sólidos con una concentración de alrededor de 2 veces mayor que los que contenía el sustrato de maíz inicialmente (Bennet y col., 1981). Ninguno de los dos procesos de fermentación nombrados el nigeriano (Okoye, 1987) ni el de producción de etanol por *S. uvarum* (Bennet y col., 1981) metabolizaron la ZEA.

Okoye (1987) analizó la ocurrencia natural de ZEA en cervezas (TABLA I.15). Una muestra de cerveza europea (Payen y col., 1983) presentó similar contaminación, aunque varios estudios de ocurrencia en cervezas Europeas dieron resultados negativos para ZEA. Las investigaciones en Africa y en Europa detalladas en la TABLA I.15, a excepción de Weddeling y col. (1994) usaron el método de TLC para la detección y cuantificación.

Weddeling y col. (1994) usaron un método de ELISA que tiene una reactividad–cruzada con α -ZeoH del 42 % y β -ZeoH del 14 % (R-Biopharm GmbH, Alemania) para el análisis y todas dieron negativos (Scott y col., 1993). La ZEA tiene menor probabilidad de ocurrencia que el DON en cebada (Tanaka y col., 1988), similarmente a lo que se observa al comparar la ocurrencia de estas dos toxinas en cerveza (Scott y col., 1993; Weddeling y col., 1994).

TABLA I.15 – Ocurrencia de zearalenona en cerveza.

Origen de la cerveza	Ocurrencia (+ / totales)	Límite de detección (ppb)	Muestras positivas		Referencias
			Media (ppb)	Rango (ppb)	
Zambia	14 / 25	10	1410 – 1500	90 – 4600	Lovelace y col., 1977
Swazilandia	3 / 23			8000-53000	Martín y Keen, 1978
Lesotho	17 / 140			300 – 2000	Martín y Keen, 1978
Nigeria	28 / 46		82	13 – 200	Okoye, 1986b
Francia/Europa	1 / 49		100	---	Payen y col., 1983
Hungría	0 / --	10	---	---	Bata y col., 1981
Italia	0 / 40	2,5 – 5	---	---	Vecchio y col., 1985
Europa	0 / 24	10	---	---	Cerutti y col., 1987
Reino Unido	0 / 50	8	---	---	Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentos, 1987
Alemania	0 / 17	0,25	---	---	Weddeling y col., 1994
Canadá	0 / 50	1,5 – 2	---	---	Scott y col., 1993

Hasta 1994, sólo se había encontrado fumonisinas en maíz (Bullerman y Tsai, 1994). De esta manera si se utiliza maíz o productos derivados del maíz como adjuntos, estas micotoxinas podrían introducirse en la cerveza. Los copos y las sémolas de maíz son las posibles fuentes de contaminación (Bennet y col., 1995). No hay estudios de la influencia del proceso de elaboración de cerveza sobre el nivel de contaminación de las fumonisinas. De cualquier

manera, la fermentación por levaduras de dos lotes de maíz contaminado con 15 y 36 $\mu\text{g/g}$ de fumonisina B1 (FB1) mostraba una pequeña degradación de la misma (Bothast y col., 1992). FB1 y FB2 son bastantes estables al calentamiento (Alberts y col., 1990). Scott y col.(1995) observaron la pérdida del 3 al 28 % de FB1 y del 9 al 17 % de FB2 durante la fermentación del mosto de cerveza por 3 cepas cerveceras de *S. Cerevisiae*. Estos últimos trabajos indican que las fumonisinas podrían ser halladas en las cervezas comerciales. Recientemente, las fumonisinas fueron detectadas en 7 de 30 muestras de cervezas de origen canadienses y en 2 de 11 muestras de cervezas importadas, por un método con cleanup por una columna de inmuno-afinidad seguida por una determinación por HPLC (Scott y Lawrence, 1995).

Torres y col. (1998), hicieron una investigación que describía la ocurrencia de fumonisinas en 32 muestras de cervezas Españolas, incluyendo algunas cervezas no alcohólicas. El análisis se hizo utilizando el método ELISA y el rango de aplicación para la FB1 fue entre los 3 – 100 ng/ml de cerveza, los porcentajes de recuperación del método fueron del 81 %. El límite de detección de las fumonisinas fue de 3 ng/ml de cerveza. Los resultados de las 14 muestras positivas (43,8 % del total) mostraron cantidades bajas de fumonisinas y con un rango de 4,76 – 85,53 ng/ml.

Respecto a otras micotoxinas (Cole y col., 1983) se analizaron cervezas para detectar la presencia de **sterigmatocistina** (Vecchio y col., 1985; Cerutti y col., 1987; Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, 1987) y **patulina** (Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, 1987). El límite de detección fue de 4-8ng/ml para la primera y de 80ng/g para la segunda. Las 164 muestras de cerveza analizadas dieron resultados negativos.

Se puede concluir que entre las micotoxinas analizadas, el deoxinivalenol es la que se encuentra mas frecuentemente y con mayores niveles en todas las cervezas analizadas hasta el momento.

I.5 – Tricotecenos

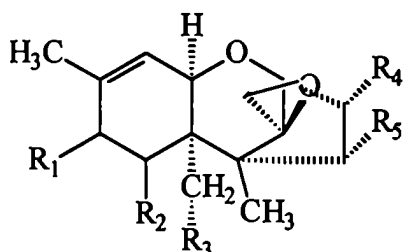
El DON está incluido dentro del grupo de micotoxinas conocidas con el nombre de **tricotecenos**. Estos son metabolitos secundarios producidos por especies de varios géneros de hongos entre los que se pueden mencionar *Fusarium*, *Myrothecium*, *Trichoderma*, *Trichothecium* y *Verrucaria*.

El número conocido de tricotecenos continúa incrementándose y hasta ahora fueron hallados, de 148 fuentes naturales, 83 compuestos no-macrocíclicos y 65 compuestos macrocíclicos (Grove, 1988). Los tricotecenos no-macrocíclicos se dividen en dos grandes **Grupos: A y B** y los tricotecenos macrocíclicos en los **Grupos: C y D**. Se clasifican así debido a su estructura química basada en un sistema de 3 anillos llamada «*tricoteceno*» (12,13-epoxitricotece-9-eno) la que tiene varios grupos funcionales (Ueno, 1983).

Los compuestos del **Grupo A** están caracterizados por la presencia en la posición del C-8 de hidrógeno, hidroxilo o una función éster (Tabla I.16). En esa misma posición los tricotecenos del **Grupo B** tienen la función carbonilo (Tabla I.17). Los compuestos del **Grupo C** (roridinas, son diésteres del verrucarol) están caracterizados por la presencia de un segundo anillo de epóxido en los C-7 y C-8 o C-9 y C-10, además del que está presente en C-12 y C-13. Los del **Grupo D** (verrucarinas, son triésteres del verrucarol) tienen una unión éster entre los C-4 y C-15 además del anillo epóxido en C-12 y C-13 (Cole y Cox, 1981).

Los tricotecenos muestran un amplio rango de actividad biológica, tal como la antibacteriana, antiviral, antifúngica y actividad citostática. Algunos tricotecenos son fitotóxicos con diferentes grados de toxicidad en animales y otros incluyen actividad insectida (Cole y Cox, 1981; Tryphonas y col., 1984; Schoental, 1984; Scott, 1990; Pacin, 1992; Pacin y col., 1997; Sinha y Bhatnagar, 1998).

La presencia de la función epóxido, muy reactiva y electrofílica, explica bioquímicamente las propiedades necrosantes de los derivados con la función 12,13-epóxido, como así también los efectos inhibitorios sobre la síntesis de proteínas o el ADN (Derache, 1990).



TRICOTECENOS

GRUPO A

TABLA I.16 – Tricotecenos del Grupo A.

COMPUESTO	ABREV.	R1	R3	R4	R5	PM	PF(°C)	[α]
Neosolaniol	NEO	OH	OAc	OH	OAc	382	172	---
Diacetoxiscirpenol	DAS	H	OAc	OH	OAc	366	161	20,0°
T-2 triol	T-23	Oival	OH	OH	OH	382	---	---
T-2 tetraol	T-24	OH	OH	OH	OH	298	---	---
Toxina HT-2	HT-2	Oival	OAc	OH	OH	424	---	---
Toxina T-2	T-2	Oival	OAc	OH	OAc	466	151	15,0°

Cole y Cox (1981)

R2 : H

OAc : O-acetilo , O-COCH₃

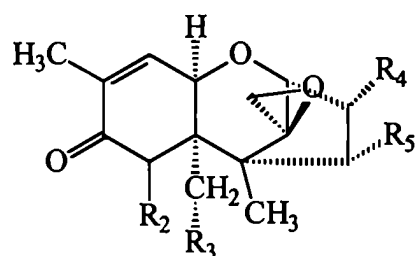
Oival : O-isovalerilo , O-COCH₂CH(CH₃)₂

ABREV.: abreviatura

PM : peso molecular

PF : punto de fusión

[α] : rotación óptica a 25°C



TRICOTECENOS

GRUPO B

TABLA I.17 – Tricotecenos del Grupo B.

COMPUESTO	ABREV.	R2	R3	R4	R5	PM	PF(°C)	[α]
Nivalenol	NIV	OH	OH	OH	OH	312	222	---
Deoxinivalenol	DON	OH	OH	OH	H	296	152	6,35°
3-acetilDON	3-ADON	OH	OH	OAc	H	338	186	40,5°
15-acetilDON	15-ADON	OH	OAc	OH	H	338	143	79,0°

Cole y Cox (1981)

R1 : C = O

OAc : O-acetilo , O-COCH₃

ABREV.: abreviatura

PM : peso molecular

PF : punto de fusión

[α] : rotación óptica a 25°C

La probable contaminación en las cervezas puede deberse a los tricotecenos de los Grupos A y B.

I.6 – Metodologías.

Los métodos analíticos para la determinación de micotoxinas dependen de numerosos factores. Para la selección de un esquema analítico se debe considerar en primer lugar la naturaleza química de las micotoxinas de interés, el peso molecular y los grupos funcionales presentes. Todos éstos factores determinan las propiedades de volatilidad y solubilidad de la micotoxina que influyen en la selección de la metodología de análisis para una toxina específica o grupo de toxinas.

Los métodos dependen no sólo de la/s toxina/s sino también de la matriz de la muestra. Las micotoxinas y la matriz inciden en la selección de los métodos de extracción, purificación (cleanup) detección y cuantificación (Trucksess y col., 1987; Sydenham y Shephard, 1996).

Las técnicas analíticas mas comunes se basan en la extracción con un solvente o sistema de solventes de la/s toxina/s de la matriz. La selección de solventes no está limitado cuando las técnicas son por TLC, HPLC, GLC u otros métodos químicos; mientras los inmunoensayos (ELISA) están limitados para unos pocos solventes. Para la extracción de los metabolitos de *Fusarium*, tricotecenos y zearalenona, se han utilizado numerosas técnicas. En la TABLA I.18 se muestran algunas metodologías analíticas aplicadas a DON y se detallan los solventes de extracción utilizados.

En bibliografía se encuentran desarrollos sobre metodología para varios tricotecenos y que emplean enzima unida a inmuno-adsorbente (ELISA), cromatografía en capa delgada (TLC), cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y cromatografía gas-líquida (GLC) (Kamimura y col., 1979; Eppley y col., 1986; El-Sharkawy y Abul-Hajj, 1998).

Los kits comerciales ELISA son ideales, cuando no presenta interferencias, para ser utilizados en matrices complejas y son muy convenientes para hacer “screening” (presencia o ausencia) de diferentes compuestos rápidamente. Los kits desarrollados para tricotecenos tienen el

Tabla I.18 – Extracción, purificación y determinación de DON en varios alimentos.

Alimentos	Extracción	Purificación	Método Detección	Límite Detección	Referencias
trigo, harina	metanol-KCl (aq)	C-celite-alúmina	GC-FID (HFBs)	100-500 ng/g	Furlong y Valente Soares (1995)
maíz, otros cereales	metanol-agua	florisil o C-18 (SPE)	GC-ECD (HFBs)	3,5 ng/g	Seidel y col. (1993)
cebada, maíz	acetonitrilo-agua	n-hexano / florisil	GC/NICI-MS (TMSs)	5 ng/g	Kim y col. (1993)
harina, salvado	acetonitrilo-agua	Romer	LC-UV	50 ng/g	Trucksess y col. (1995); Romer (1986)
A base de granos	metanol-agua o acetonitrilo-agua	Nil	ELISA	1000 ng/g	Abouzie y col. (1991)
trigo	metanol-agua	Nil	ELISA	200 ng/g	Schmidt (1995)
cerveza	acetato de etilo	C-18 (SPE)	GC-MS (HFBs)	0,1-1,5 ng/ml	Young y Lafontaine (1993)
leche	Nil	C-alúmina (SPE)	LC-UV	5 ng/ml	Vudathala y col. (1994)
tejidos de cerdos	acetonitrilo-agua	C-alúmina (SPE)	LC-MS	1 ng/g	Prelusky y Trenholm (1991)

ECD: detección electroquímica; **ELISA:** enzima unida a inmuno-adsorbente; **FID:** detector de ionización de llama; **GC:** cromatografía gaseosa; **HFB:** heptafluorobutiril-derivados
LC: cromatografía líquida; **MS:** espectrometría de masa; **NICI-MS:** detección por ionización química de ión negativo usando MS; **SPE:** extracción en fase sólida
TMS: trimetilsilil-derivados; **UV:** ultravioleta; **A base de granos:** cereales para el desayuno, harina flor (de trigo) y harina de maíz

inconveniente que son pocos selectivos y muchos compuestos análogos pueden reaccionar con el anticuerpo, dando falsos positivos.

Las técnicas inmunoquímicas ofrecen un gran potencial en el campo del análisis de las micotoxinas, pero la aplicación de los métodos de validación en los laboratorios ha sido lenta. Los métodos aparecen en principio para la determinación de DON en granos de cereal. Estudios iniciales con el método directo o indirecto de ELISA para el análisis de DON por Xu y col. (1988) y Shannon y col. (1985), han hallado una ventaja del método directo sobre el indirecto de ELISA en términos de sensibilidad y especificidad.

Los límites de detección reportados son de 10 µg/Kg para maíz y trigo y se observó una buena correlación entre las técnicas de radioinmunoensayo y TLC. Se han estudiado las características del método directo de ELISA para DON, 3-ADON y 15-ADON en buffers por Usleber y col. (1991) y la diferenciación entre 3-ADON y DON ha sido posible a través de la hidrólisis de la muestra. Este kit está disponible comercialmente y es aplicable al análisis de DON con posterior acetilación en balanceados, granos y productos derivados de cereales (RIDASCREEN DON, Rbiopharm GmbH). Cuando es usado como un procedimiento de screening cualitativo para determinar la presencia de DON en trigo, el kit de laboratorio AGRISCREEN (de Neogen Corporation) no ha mostrado una diferencia significativa con TLC (Putnam y Binkerd, 1992). Schmidt (1995) plantea un test de microdosificación (EZQuant, Diagnostix, Inc.) que resultó comparable a un método por GLC.

La cromatografía planar se la puede usar en forma semicuantitativa o cuantitativa por comparación visual con estándares o combinada con el uso de un espectrodensitómetro. Betina (1989) y Bennett y Richard (1994) han publicado una revisión de los métodos por TLC para DON y ZEA.

Este método tiene dos grandes problemas para tricotecenos: el alto límite de detección o sea baja sensibilidad y la no fluorescencia de estas toxinas, sobre todo los del Grupo B, que tienen

un grupo cromóforo carbonilo α , β -insaturado que les da una baja absorbancia a la luz ultravioleta (longitud de onda = 210 – 220 nm). Para poder detectarlos, es necesario derivatizar las toxinas y obtener derivados que permitan la detección y cuantificación. Para ello se debe asperjar la placa con una solución con derivatizante cuya elección depende del grupo de tricotecenos a caracterizar:

Grupo A: solución de metanol-ácido sulfúrico-ácido acético (8-1-1) se deja secar la placa y luego se pone la misma en estufa a 120°C (6 min). Se obtienen manchas pardas a marrón oscuras que se ven con la luz ultravioleta de longitud de onda 254 nm.

Grupo B: solución de cloruro de aluminio al 20 % en etanol – agua (1:1) se deja secar la placa y luego se pone la misma en estufa a 120°C (6 min). Se obtienen manchas azul-celestes, cuya fluorescencia se compara visualmente con respecto a la fluorescencia de un estándar de la misma micotoxina a la luz ultravioleta de longitud de onda 254 nm.

Se emplea rutinariamente placas de sílicagel en fase normal.

El análisis por TLC presenta además el inconveniente que deben usarse distintos sistemas de solventes de desarrollo en corridas unidimensionales o bidimensionales para poder separar mejor los diferentes tricotecenos (Croteau y col.,1994).

Con referencia a la baja sensibilidad un ejemplo de ello es el método oficial de DON en trigo, cuyo límite de cuantificación es de 300 $\mu\text{g/Kg}$ según A.O.A.C. (1995); por lo que en la placa se pueden cuantificar valores mayores o iguales a 250 ng.

La utilización de HPLC para la detección de tricotecenos del Grupo A es muy difícil debido a la ausencia en su molécula de un grupo cromóforo adecuado para su detección. El carbonilo α , β -insaturado absorbe la luz ultravioleta en el rango de longitud de onda 210 – 220 nm aproximadamente y la mayoría de los solventes de corrida absorben también a esas longitudes de onda, dificultando su apreciación.

Actualmente se utiliza la derivatización postcolumna con cloruro de aluminio de los tricotecenos del Grupo B y la cuantificación con un detector de fluorescencia. Éste derivado incrementa la fluorescencia del producto en unas cinco veces con respecto al compuesto sin derivatizar. El límite de detección para el DON es aún poco sensible de 1 ppm, 3,3 veces mayor que el método de TLC para el trigo (A.O.A.C., 1995), por lo que éste método es menos sensible que el que utiliza TLC.

Para confirmación, se puede usar un detector de arreglo de diodos (DAD) que permite una detección y parcial caracterización de los tricotecenos del Grupo A y B (Kuronen, 1989).

La primera aplicación de HPLC con detección ultravioleta (LC-UV) para la determinación de DON ha sido reportado por investigadores canadienses (Trenholm y col., 1985) empleando una columna cromatográfica de fase reversa (RP) y una fase móvil de metanol-agua. Rajakylä y col. (1998) determinaron DON en granos a niveles de 250 – 1000 ng/g (ppb) usando LC y detección UV. Ramakrishna y col. (1990) en India y Lauren y Agnew (1991) en Nueva Zelanda usaron sistemas similares para detectar DON en granos y alimentos. Stratton y col. (1993) y Visconti y Botálico (1983) emplearon LC-RP con detección UV para determinar DON y otras toxinas de *Fusarium* en granos. La fase móvil utilizada ha sido un gradiente de metanol – agua y reportaron como límite de detección de DON 50 ng/g. En Estados Unidos, Trucksses y col. (1995) han usado un sistema similar en el relevamiento de harina y salvado. Vudathala y col. (1994) han usado una columna cromatográfica de fase reversa y con una fase móvil de acetonitrilo – agua para detectar DON agregado a la leche de vaca. Además se destacan en HPLC los trabajos de ocurrencia de Maycock y Utley (1985) y Lauren y Greenhalgh (1987)

Sylvia y col. (1986) usaron por primera vez la detección electroquímica-reductiva en LC (LC-EC) para determinar niveles de DON en trigo contaminado naturalmente.

Childress y col. (1990) incrementaron la sensibilidad y selectividad para DON y otros tricotecenos utilizando HPLC acoplado on-line con una fotólisis postcolumna y detección amperométrica y Kostianen (1991) utilizó, entre otras técnicas, HPLC acoplado a masa y Sano y col. (1987) fue el precursor de la derivatización postcolumna.

Los métodos que utilizan GLC requieren de una buena purificación de las muestras. El uso de columnas capilares permite obtener una alta resolución en la separación cromatográfica. Además, de acuerdo al detector usado, se puede tener una alta sensibilidad y selectividad para el análisis de la mayoría de los tricotecenos. Este método es versátil y el más usado en el análisis tanto en la industria como en investigación.

Este método requiere de una derivatización. Los derivatizantes pueden ser los trimetilsilanos, que al reaccionar con los hidroxilos de los tricotecenos forman los trimetilsilil-éteres. La optimización de las reacciones de derivatización con los trimetilsilanos han sido reportados por Gilbert y col. (1985), Rizzo y col. (1986) y por Luo y col. (1989).

Se pueden usar los detectores de ionización de llama (FID) o el de captura de electrones (ECD). El inconveniente de estos derivados es que, por la alta temperatura de los detectores (250° – 320°C), se deposita en ellos el dióxido de silicio. Baja la sensibilidad de los detectores y puede deteriorar irreversiblemente al ECD (Scott y col., 1981).

Otros derivatizantes utilizados son el heptafluorobutiril-imidazol (HFBI) y el heptafluorobutiril-anhídrido (HFBA) que al reaccionar con los hidroxilos de los tricotecenos, se forman los heptafluorobutiril-ésteres que no dejan residuo alguno en los detectores FID o ECD. El detector que mas se utiliza con éstos derivatizantes es el ECD, pues tiene una alta sensibilidad y selectividad a los compuestos electronegativos. La derivatización con éstos compuestos es reproducible y da una buena resolución cromatográfica, (Romer, 1978; Kuroda y col., 1979; Scott y Kanhere, 1986; Scott y col., 1989; Möller y Gustavsson,

1992; Scott y col., 1993; Croteau y col., 1994). Se utiliza un catalizador de reacción en fase sólida, para la producción de los HFB-ésteres (Kanhere y Scott, 1990).

Aunque el método mas empleado en GLC es con el ECD, también han sido reportados el uso del FID, como así también, la aplicación del GC-MS.

El método de GC-ECD es el más empleado para detectar DON y otros tricotecenos en granos de cereal. En trigo, Scott y col. (1989) inyecta los HFB-ésteres sobre una columna capilar megabore DB-1701 y reporta límites de detección entre 20 - 100 ng/g. Sydenham y col.(1989) emplea un detector ECD y con un límite de detección de 20 ng/g para el DON en trigo y Luo y col. (1990) estima el límite de detección de 5 ng/g para el maíz y trigo usando una columna empacada OV-17 y los TMS-éteres. Muñoz y col. (1990) inyecta los HFB-derivados sobre una columna capilar DB-5 y detecta como mínimo 43 ng/g para el maíz. Langseth y Clasen (1992) también han empleado un ECD para detectar los TMS-derivados y han reportado como límite de detección alrededor de 20 ng/g de muestra. Möller y Gustavsson (1992) ha empleado los TMS-derivados y Seidel y col. (1993) los HFB-derivados para detectar DON y otros tricotecenos en varios cereales. Croteau y col. (1994) derivatizaron extractos de maíz con HFBA y han reportado un límite de detección de 50 ng/g para el DON.

Scott y col. (1992) y Ware y col. (1984) utilizaron el método de GC-ECD con los TMS-derivados, para la determinación de DON en el mosto de cerveza y en trigo respectivamente.

Algunas técnicas de análisis hidrólizan el DON al alcohol correspondiente antes de la derivatización. Para el análisis de balanceados, Rood y col. (1988) realizaron la hidrólisis y han detectado los pentafluoropropil-ésteres con el ECD. Lauren y Agnew (1991) plantean que la aplicación de la hidrólisis resulta en un incremento de la estabilidad de los extractos y resultados mas consistentes y confiables de la cuantificación por ECD de los trifluoroacetyl-derivados. Los límites de detección de ambos trabajos son de 20 ng/g.

Furlong y Valente Soares (1995) usaron un detector FID para el análisis de DON y otros tricotecenos en trigo. Las muestras son extraídas con una solución acuosa de metanol y KCl y los extractos derivatizados con HFBI. La confirmación e identificación se realiza por reacciones de acetilación y reducción, reportándose un límite de detección entre 50 a 100 ng/g.

La determinación por GLC-MS usa ionización química de ión negativo-espectrometría de masa (NICI-MS) para el análisis de DON y otros tricotecenos (Krishnamurthy y col., 1986).

Rood y col., (1988) usaron NICI-MS para confirmar la presencia de DON y otros tricotecenos en los alimentos balanceados y estimaron el límite de detección entre 20 a 50 ng/g para el DON; Sydenham y col. (1989) y Luo y col. (1990) han usado GC-MS para confirmar la presencia de tricotecenos en trigo y maíz contaminado. También se analizó la presencia de tricotecenos en cereales por GC acoplado a un detector selectivo de masa operando en el modo NICI (Schwadorf y Müller, 1991). Se usaron los trifluoroacil-derivados y usaron al metanol como el gas reactivo. Con el barrido del espectro a escala completa (400 – 650 unidades de masa atómica), reportaron límites de detección de 1 a 5 ng/g.

Scott y col. (1993) y Hastings y Stenroos (1993) han usado GC-MS en el modo de impacto de electrón, para determinar la presencia de DON (y otras micotoxinas de *Fusarium*) en cerveza. El NICI-MS, en el modo de monitoreo de ión selectivo, ha sido utilizado por Kim y col.(1993) para determinar los niveles de DON y otras toxinas de *Fusarium* en cebada y maíz, con un límite de detección de 5ng/g.

El método de Scott y col. (1989) ha sido adaptado para incluir 6 tricotecenos y emplear cualquiera de los dos métodos, ECD o NICI-MS (Health Canada, 1993).

El uso de LC-MS para DON por Rajakylä y col. (1998), implicó una modificación de un método de LC-UV con la introducción de una interfase “termospray-MS” que ha permitido

bajar los límites de detección al rango de 3 a 40 ng/g. Un sistema LC–MS con una interfase de termospray ha sido utilizada para la determinación de DON en tejidos de cerdos (Prelusky y Trenholm, 1991). Kostiainen y col. (1991) han implementado espectrometría de masa de alta resolución por bombardeo rápido de átomos acoplada a un LC, con la adición de una postcolumna con un gas reactivo como el glicerol. El método resultó sensible y selectivo para la identificación de DON y otros tricotecenos.

I.7 – Diferentes métodos análisis de tricotecenos en muestras líquidas.

La cerveza es una matriz líquida y presenta problemáticas particulares para su análisis relacionadas con la cantidad de agua presente en las muestras. En las TABLAS I.19 – I.25 se resumieron las distintas etapas utilizadas en muestras líquidas extraídas de la bibliografía de cervezas (Scott y col., 1993), leche (Swanson y col., 1986), orina (Black y col., 1986) y plasma y orina (Rood y col., 1986). El objetivo de este resumen comparativo es poder seleccionar la metodología más adecuada en cada etapa para analizar la contaminación por tricotecenos de cervezas consumidas en el país.

TABLA I.19 – Preparación de las muestras

CERVEZA	LECHE	ORINA	PLASMA Y ORINA
50 ml se desgasifican por agitación 15 min. Se ajusta al 5% (v/v) el etanol en cervezas de bajo contenido alcohólico.	Se entibia a 50°C y se agita vigorosamente. A 40 ml, se agrega 5 ml de solución saturada de NaCl.	Sin tratamiento previo Se pueden almacenar a -20°C por 8 meses antes del análisis.	A 8 ml de plasma centrifugado u orina, se agrega 1 ml de solución saturada de NaCl.

TABLA I.20 – Extracción de las micotoxinas

CERVEZA	LECHE	ORINA	PLASMA Y ORINA
10 ml se pasan a través de una columna de matriz hidrofílica de 6 ml de capacidad. Después de 2 a 4 min de absorción, se deja drenar.	45 ml se pasan por una columna de matriz hidrofílica de 50 ml de capacidad. Después de 5 min de absorción, se deja drenar.	3 ml se pasan por una columna de matriz hidrofílica de 5 ml de capacidad. Después de 4 min de absorción, se deja drenar.	9 ml de cualquiera de las dos muestras, se pasan por una columna de matriz hidrofílica. Después de 2 a 3 min de absorción, se deja drenar.

TABLA I.21 – Primera elución de las micotoxinas

CERVEZA	LECHE	ORINA	PLASMA Y ORINA
Se eluye con 8 porciones de 20 ml de acetato de etilo : metanol (95 : 5). Se seca el eluato con 2 g de sulfato de sodio anhídrido y se lleva a sequedad en el rotavapor.	Se eluye con 6 porciones de 50 ml de acetato de etilo. Se concentra el eluato a sequedad en el rotavapor.	Se eluye con 4 porciones de 8 ml de acetato de etilo : metanol (95 : 5). Se seca el eluato con 2 g de sulfato de sodio anhídrido y se lleva a sequedad en el rotavapor.	Se eluye con 2 porciones de 40 ml de acetato de etilo. Se concentra el eluato a sequedad en el rotavapor.

TABLA I.22 – Purificación de las micotoxinas

CERVEZA	LECHE	ORINA	PLASMA Y URINA
<p>Se preacondiciona una columna de fase reversa C-18 de 3 ml de capacidad con 2 porciones de 6 ml de metanol, seguida de 2 porciones de 6 ml de agua destilada y se deja drenar hasta el tope de la misma.</p> <p>El residuo se disuelve en 50 µl de metanol, se agita; se agregan 500 µl de agua y se agita. Se transfiere a la columna y se deja drenar hasta el tope de la misma.</p>	<p>Se preacondiciona una columna de fase reversa C-18 de 3 ml de capacidad con 2 porciones de 6 ml de metanol, seguida de 2 porciones de 6 ml de agua destilada y se deja drenar hasta el tope de la misma.</p> <p>El residuo se transfiere a un tubo de centrifuga con 2 porciones de 4 ml de acetonitrilo y de 2 a 4 ml de hexano; luego se agrega 1 ml de agua destilada. Se centrifuga a 2000 rpm, descartando la capa de hexano.</p> <p>Se concentra a sequedad la fase acetonitrilo – agua en el rotavapor, con T<50°C.</p> <p>Se redissuelve el residuo en 0,1 ml de metanol, se agita y agrega 1 ml de agua destilada y se mezcla. Se transfiere a la columna y se deja drenar. Se lava la columna con 1 ml de agua y se deja drenar hasta el tope de la misma.</p>	<p>Se preacondiciona una columna de fase reversa C-18 de 3 ml de capacidad con 2 porciones de 6 ml de metanol, seguida de 2 porciones de 6 ml de agua destilada y se deja drenar hasta el tope de la misma.</p> <p>Se resuspende el residuo en 2 ml de agua destilada. Se transfiere a la columna y se deja drenar sin llevar a sequedad la misma.</p> <p>Se lava la columna con 2 ml de agua destilada y se deja drenar hasta el tope de la misma.</p>	<p>Hidrólisis: se transfiere el residuo a un tubo con metanol y se lleva a sequedad. Se agrega 0,2 ml de hidróxido de sodio (0,25 M) en 90% de metanol. Se calienta a 60°C (5min) y se enfría a temperatura ambiente por 10 min. Se agrega 0,2 ml de ácido acético (0,25 M) en tolueno y se agita en vortex.</p> <p>Se concentra a sequedad la fase toluénica con suave corriente de nitrógeno a 50°C.</p> <p>Purificación: se preacondiciona la columna de silicagel con 1 volumen de cloroformo : acetona (1 : 3), seguido de 1 volumen de cloroformo y se deja drenar.</p> <p>El residuo de la hidrólisis se transfiere con 2 porciones de 2 ml de cloroformo : acetona (9 : 1) y se deja drenar hasta el tope de la misma.</p>

TABLA I.23 – Segunda elución de las micotoxinas

CERVEZA	LECHE	ORINA	PLASMA Y ORINA
<p>Se eluye con 1 porción de 6 ml de metanol : agua (8 : 2) y se deja drenar. El extracto se evapora a sequedad en el rotavapor a una temperatura menor a 50°C. Se transfiere el residuo a un vial con 2 porciones de 0,5 ml de diclorometano : metanol (9 : 1) y se lleva a sequedad con una corriente suave de nitrógeno y leve calentamiento. El residuo se resuspende en 1 ml de metanol.</p>	<p>Se eluye con 2 porciones de 1 ml de metanol : agua (1 : 1) y se deja drenar. Se transfiere el eluato a un balón y se lava el tubo con 3 porciones de 2 ml de acetona y se lleva a sequedad en el rotavapor. Se transfiere el residuo a un vial con 3 lavados de 2, 1 y 1 ml de diclorometano : metanol (9 : 1) y se lleva a sequedad con una corriente suave de nitrógeno. El residuo se resuspende en 0,4 ml de metanol.</p>	<p>Se eluye con 1 porción de 2 ml metanol : agua (4 : 6) y se deja drenar. Se eluye con una segunda porción de 2 ml de metanol : agua (9 : 1) y se deja drenar. Se lleva a sequedad el eluato (4 : 6) en rotavapor a una temperatura menor a 40°C. Se diluye el eluato (9 : 1) a (5 : 5) con agua destilada y se extrae, en una ampolla por 10 min, con 2 porciones de 5 ml de diclorometano. Se seca con 2 g de sulfato de sodio anhídrido y se combina con el residuo del eluato (4 : 6) que se lleva a sequedad en el rotavapor. Se transfiere el residuo a un vial con 1 ml de metanol y se lleva a sequedad con una corriente suave de nitrógeno.</p>	<p>Al tubo anterior, se agrega 200 µl de etanol absoluto y 1 ml de cloroformo, se agita con vortex y se transfiere a la columna. Al mismo tubo, se agrega una mezcla de 1 ml cloroformo : acetona (1 : 3), se agita con vortex y se transfiere a la columna e inmediatamente se agrega en la columna 4 ml de cloroformo : acetona (1 : 3). Se deja drenar y se recoge todos los eluatos en un tubo (son aproximadamente unos 6 ml). Se lleva a sequedad con una corriente suave de nitrógeno y leve calentamiento en baño de agua a temperatura de 50°C.</p>
1 ml metanol = 10 ml cerveza	0,4 ml metanol = 40 ml leche	residuo = 3 ml orina	residuo = 8 ml plasma / orina

TABLA I.24 – Derivatización de las micotoxinas

CERVEZA	LECHE	ORINA	PLASMA Y ORINA
<p>En un tubo se pone 200 µl del extracto metanólico y se seca con una corriente suave de nitrógeno y leve calentamiento. Se agregan 70 µl de solución de 2 mg/ml de dimetilaminopiridina en tolueno : acetónitrilo (1 : 1) y 30 µl de anhídrido heptafluorobutírico; se mezcla con vortex. Se calienta a 22°C (30 min) en un baño de arena. Se agrega 465 µl de hexano y se mezcla con el vortex. Se agrega 2 ml de solución acuosa de carbonato ácido de sodio (3 %) y se agita con vortex durante 2 min. Se toman 100 µl de la fase superior (tolueno) y se agregan 900 µl de hexano, se agita. Se inyecta 1 µl.</p> <p>1 µl = 0,4 µl cerveza</p>	<p>En un tubo se pone 100 µl del extracto metanólico y se seca con una corriente suave de nitrógeno y leve calentamiento. Se agrega 1 ml de tolueno : acetónitrilo (95 : 5) y 100 µl de heptafluoroimidazol, se agita con vortex durante 1 min. Se calienta en un baño de arena a 60°C (1 h), después se enfría a temperatura ambiente. Se agrega 1 ml de solución acuosa de carbonato ácido de sodio (5 %) y se agita con vortex durante 2 min. Se toman 50 µl de la fase superior (tolueno) y se agregan 950 µl de hexano, se agita. Se inyecta de 1 a 4 µl.</p> <p>1-4 µl = 0,5-2 µl leche</p>	<p>Al residuo anterior se agrega 20 µl de una solución de 7-hidroxiacetoxiscirpenol (1 µg / µl), que es el estándar interno; se evapora a sequedad con una corriente suave de nitrógeno. Se agregan 200 µl de tolueno : acetónitrilo (95 : 5) y 20 µl de heptafluorobutirilimidazol y se agita con el vortex. Se calienta en un baño de arena a 60°C (2hs) y luego se enfría a temperatura ambiente. Se lava la fase toluénica con 1 porción de 0,5 ml de carbonato ácido de sodio (5 %) y 2 porciones de 0,5 ml de agua destilada. Se inyecta 0,5 µl.</p> <p>0,5 µl = 7,5 µl orina</p>	<p>Al residuo anterior se agregan 1 ml de solución de 2 mg/ml de dimetilaminopiridina en tolueno : acetónitrilo (90 : 10) y 50 µl de anhídrido trifluoroacético, se agita con el vortex. Se calienta en un baño de arena a 60°C (20 min) y luego se enfría a temperatura ambiente. Se agrega 1 ml de solución acuosa de carbonato ácido de sodio (5 %) y se agita con vortex durante 2 min. Se toman 25 µl de la fase toluénica y se agregan 975 µl de hexano, se agita con vortex. Se inyectan 2 µl.</p> <p>2 µl = 0,4 µl plasma / orina</p>

TABLA I.25 – Condiciones cromatográficas de análisis

CERVEZA	LECHE	ORINA	PLASMA Y ORINA
<p>cromatógrafo VARIAN Vista 6000 GC</p> <p>espectrómetro de masa (MSD) VG Analytical Model 7070 EQ</p> <p>inyector: programable y on - column 70°C(1 min) 80°C/min 280°C</p> <p>columna: DB - 5 5% difenil - 95% dimetil - polisiloxano J&W (capilar) 30m x 0,25mm id x 0,25um</p> <p>condiciones de temperatura: 80°C (1 min) 50°C / min 180°C (0 min) 5°C / min 280°C (5 min)</p> <p>gas carrier: helio (22 psi)</p>	<p>cromatógrafo Hewlett - Packard HP-5840 A</p> <p>captura de electrones (ECD) temperatura = 325°C</p> <p>inyector: modo splitless temperatura = 275°C</p> <p>columna: OV - 17 (3 %) 50% fenil - 50% metilsilicona</p> <p>Supelcoport (empacada) 1,80m x 2mm id 100 - 120 mesh</p> <p>condiciones de temperatura 170°C (8 min) 10°C / min 250°C (2 min)</p> <p>gas carrier: argón - metano (95-5) 35 ml / min</p>	<p>Método A: cromatógrafo GC DANI 3800</p> <p>espectrómetro de masa (MSD) VG Analytical Model 7070 EQ</p> <p>inyector: modo splitless temperatura = 260°C split 0,5 min</p> <p>columna: BP - 1 (capilar) 25m x 0,2mm id x 0,25um</p> <p>condiciones de temperatura 160°C (1 min) 10°C / min 275°C (5 min)</p> <p>gas carrier: helio (15 psi)</p>	<p>cromatógrafo Hewlett - Packard HP-5840 A</p> <p>captura de electrones (ECD) temperatura = 300°C</p> <p>inyector: automático Hewlett - Packard HP - 7672 A temperatura: 275°C</p> <p>columna: OV - 17 (3 %) 50% fenil - 50% metilsilicona</p> <p>Supelcoport (empacada) 1,80m x 2 mm id 100 - 120 mesh</p> <p>condiciones de temperatura isotérmica a 165°C</p> <p>gas carrier: helio (35 ml / min)</p>

TABLA I.25 – Condiciones cromatográficas de análisis (continuación)

ORINA
Método B: cromatógrafo GC – MS Finnigan 4600 (usado a modo de confirmación)
espectrómetro de masa (MSD) opera en modo SIM usando el NICI y metano como gas reactivo
inyector: modo splitless temperatura = 300°C split 0,6 min
columna: BP – 5 (capilar) 12m x 0,22mm id x 0,25um
condiciones de temperatura: 90°C (2 min) 20°C / min 180°C (0 min) 5°C / min 240°C(2 min)
gas carrier: helio (8 psi)

II – OBJETIVOS

El objetivo principal del presente trabajo es evaluar la ocurrencia de tricotecenos en cervezas que se consumen en Argentina. Además se procurará evaluar la exposición de estas micotoxinas debido a la ingesta de cerveza, para contribuir al cálculo de las dosis de exposición de tricotecenos a través de los alimentos consumidos contaminados por estas toxinas y desarrollar o adaptar un método de análisis cromatográfico para la detección de tricotecenos en cervezas que sea de fácil aplicabilidad metodológica.

III – MATERIALES Y METODOS

III.1 – Reactivos y solventes.

III.1.1 – Reactivos.

- anhídrido heptafluorobutírico, HFBA (SIGMA, H – 1006).
- carbonato ácido de sodio (MERCK, Art. 6390).
- 4-N,N-dimetilaminopiridina, 4-DMAP (SIGMA, D – 5640).
- sulfato de sodio anhidro (MERCK, Art. 6649).

III.1.2 – Solventes.

- acetato de etilo (MERCK, Art. 21542).
- acetonitrilo (MERCK, Art.30142).
- diclorometano (MERCK, Art. 6050).
- etanol absoluto (MERCK, Art. 983).
- n-hexano (MERCK, Art. 4367).
- metanol (MERCK, Art.15827).
- tolueno (MERCK, Art. 8325).

III.2 – Estándares.

III.2.1 – Estándar Interno.

- 2-amino-5-clorobenzofenona, ACBP (SIGMA, A – 4632).

III.2.2 – Estándares de tricotecenos.

- 3-acetildeoxinivalenol, 3-ADON (SIGMA, A – 6166).
- 15-acetildeoxinivalenol, 15-ADON (SIGMA, A – 1566).
- deoxinivalenol, DON (SIGMA, D – 0156).
- diacetoxiscirpenol, DAS (SIGMA, D – 0761).
- nivalenol, NIV (SIGMA, N – 7769).
- neosolaniol, NEO (SIGMA, N – 1761).
- T-2 tetraol (SIGMA, T – 3888).
- T-2 triol (SIGMA, T – 4013).
- toxina HT-2, HT-2 (SIGMA, T – 4013).
- toxina T-2, T-2 (SIGMA, T – 4887).
- zearalenona, ZEA (SIGMA, Z – 2125).

III.3 – Preparación de las soluciones.

III.3.1 – Estándares de tricotecenos.

Se prepara una solución de DON en metanol a partir de un vial de 4 ml que contiene la toxina (Bennett y Shotwell, 1990). Previa agitación con el vortex, se trasvasa a un matraz de 10 ml con porciones de metanol, llevando luego a volumen con el mismo solvente. Esta solución se

cuantifica en el espectrofotómetro de arreglo de diodos (HP-8451 A, Diode Array Spectrophotometer).

Para la cuantificación (Cole y Cox, 1981) se utiliza $\epsilon = 7030$ en metanol para $\lambda = 219$ nm y un PM = 296,13. La concentración de DON estimada fue de 11,314 $\mu\text{g/ml}$ en la solución madre.

La solución se fracciona en viales de 2 ml de capacidad. Se evapora el solvente con una corriente suave de nitrógeno y con un mínimo calentamiento en baño de arena, tratando de no sobrepasar los 50°C. Cada uno de los viales contiene 4 μg . A éstos se los envuelve en papel de aluminio y se sella con parafilm. Se guarda en el freezer a - 18°C hasta el momento de su uso.

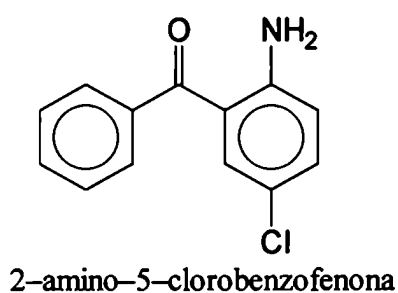
Se preparan en forma similar los estándares de NIV y 3-ADON, cuyas constantes, según Cole y Cox (1981) son:

NIV	$\lambda = 221$ nm	$\epsilon = 6500$ (metanol)	PM = 312,12
3-ADON	$\lambda = 219$ nm	$\epsilon = 5900$ (etanol)	PM = 338,00

Las soluciones estándares de los restantes tricotecenos, 15-ADON del Grupo B y los del Grupo A, se preparan respetando la masa indicada en los frascos de estándares SIGMA.

III.3.2 – Estándar interno.

La estructura química del estándar interno ACBP es:



Se prepara una solución de 500 µg/ml de ACBP en tolueno (solución madre). Se envuelve el matraz en papel de aluminio. Se mantiene en heladera a 5°C hasta el momento de la dilución. De ésta solución madre, se toman 200 µl y se llevan a volumen con n-hexano en matraz de 10 ml. Con ésta solución de trabajo se hacen las diluciones de las toxinas derivatizadas.

La solución de trabajo se prepara en el día del análisis cromatográfico.

III.3.3 – Solución de neutralización.

Se pesan 3 grs de carbonato ácido de sodio en un erlenmeyer y se agregan 100 ml de agua destilada. Se guarda en heladera a 5°C.

III.4 – Materiales y equipos.

- cromatógrafo gas-líquido (GLC): Hewlett-Packard HP-5890 Series II equipado con detector de captura de electrones (ECD) de Ni63 ; con un inyector de vidrio modo split-splitless; columna capilar de sílica fundida y fase estacionaria HP-5 (Hewlett-Packard, 5% difenil – 95% dimetilpolisiloxano) de 25m x 0,2mm i.d.x 5m de film; con trampas para humedad y oxígeno.
- integrador: Hewlett-Packard HP-3396 Series II.
- trompas de agua para hacer vacío.
- centrífuga: ROLCO para tubos.
- rotavapor: BUCHI – R.
- agitador de tubos: vortex PRECYTEC.
- columnas de extracción en fase sólida, de polipropileno:
 - sílica-gel de 500 mg x 3 ml (Bakerbond SPE, 7086 – 03)
 - fase reversa de octadecilsilano de 500 mg x 3 ml (Bakerbond SPE, 7020 – 03).

- baño de arena regulable a 60°C.
- jeringas: Hamilton de 10 mcl (701 N), de 50 mcl (705 N), de 100 mcl (710 N) y de 500 mcl (750 N).
- viales de vidrio de 4 ml (Wheaton, Sigma Z – 18870 – 0) con tapa de plástico y septum de teflón.
- viales de vidrio de 2 ml (Wheaton. Sigma Z – 18869 – 7) con tapa de plástico y septum de teflón.
- agitador magnético PRECYTEC, modelo AE – 28, Ind. Arg.
- papel de aluminio.
- papel de filtro Whatman No. 4.
- cromatoplaça de sílicagel 60 (MERCK, Art. 5553).
- tubo de nitrógeno XSE ó 4,8 (99,99% de pureza).
- tubo de nitrógeno común (95 % de pureza).

Material de vidrio general:

tubo-test de vidrio, 10 x 75 mm con tapa plástica a rosca (Mallinckrodt, 7201 – 38298), erlenmeyers pirex de 125 ml., probetas de 25, 50 y 100 ml., pipetas aforadas de 5 ml., pipetas graduadas de 1, 5 y 10 ml., vasos de precipitados de 50 ml., tubos de ensayos de 20 ml., tubos de centrifuga de 10 ml., balones de destilación con forma de corazón de 50 y 125 ml., frascos kitasato de 125 ml y de 500 ml de capacidad.

III.5 – Muestras.

Las muestras de cerveza y de malta en botellas de 330, 970 y 1000 ml y latas de 354 ml fueron compradas en almacenes y supermercados de la Ciudad de Buenos Aires en diferentes

meses de los años 1997 y 1998. Todos los envases estaban a temperatura ambiente en los estantes y fueron almacenados, lo mas pronto posible y hasta el día de la extracción en la heladera a 5°C, según lo recomienda Scott y col. (1993).

Se analizaron en total 48 muestras de 16 marcas argentinas, la mayoría por triplicado. Una muestra fue analizada por cuadruplicado y de una sólo se obtuvo una muestra en el año 1997 y no se encontró de esa marca durante el año 1998. Además, se analizaron 4 marcas de cervezas importadas de México y 2 de Estados Unidos.

El detalle de las muestras se encuentra en la TABLA III.1

III.6 – Preparación de las muestras.

A 50 ml de muestra, medidos en una probeta de 50 ml, se los coloca en un erlenmeyer de 125 ml de capacidad y se desgasifica por agitación durante 20 min. Se toman 5 ml con pipeta aforada y se colocan en un vaso de precipitados de 50 ml. Las cervezas con bajo contenido alcohólico y la malta se ajustan a un 5% (v/v) con etanol absoluto (Scott y col.,1993).

- Malta SALTA (0 % alcohol): 47,5ml de malta + 2,5 ml etanol absoluto
- Cerveza QUILMES LIBERTY (0,6 % alcohol): 48 ml cerveza + 2,2 ml etanol absoluto
- Cerveza QUILMES LIGHT (3,3 % alcohol): 49 ml cerveza + 1 ml etanol absoluto
- El resto de las cervezas, que tienen entre un 4 – 6 % alcohol, se dejan tal cual.

Se observa que se puede reemplazar el desgasificado en un erlenmeyer de 125 ml por un kitasato de igual volumen y con la trompa de agua, haciendo un vacío muy suave y con agitación. El proceso de desgasificación es un poco mas rápido.

TABLA III.1 MUESTRAS DE CERVEZA

No. Muestra	Marca	Sabor	Color	% Etanol	Envase		Origen	Fecha de Vencimiento
					Tipo	Volumen		
1	Quilmes	Cristal	B	4,9	Lata	354 ml	Argentina	11/08/98
2	Bieckert	Oro	B	4,9	Lata	354 ml	Argentina	13/07/98
3	Palermo		B	4,9	Lata	354 ml	Argentina	26/04/98
4	Quilmes	Light	B	3,3	Lata	354 ml	Argentina	11/07/98
5	Isenbeck		B	4,6	Lata	330 ml	Argentina	11/08/98
6	Palermo		B	4,9	Lata	354 ml	Argentina	11/08/97
7	Bieckert	Oro	B	4,9	Lata	354 ml	U.S.A.	Dic./97
8	Quilmes	Cristal	B	4,9	Lata	354 ml	Argentina	22/09/97
9	Isenbeck		B	4,6	Lata	330 ml	Argentina	12/08/97
10	Bieckert	Clásica	B	5,2	Lata	355 ml	U.S.A.	Nov./97
11	Quilmes	Liberty	B	0,6	Lata	354 ml	Argentina	15/09/97
12	Quilmes	Bock	N	6,3	Lata	354 ml	Argentina	03/08/97
13	Modelo		B	4,4	Lata	340 ml	México	26/09/97

No. Muestra	Marca	Sabor	Color	% Etanol	Envase		Origen	Fecha de Vencimiento
					Tipo	Volumen		
14	Isenbeck	Dark	N	4,6	Bot. (1)	1000 ml	Argentina	02/02/98
15	Schneider		B	4,7	Bot. (1)	970 ml	Argentina	07/11/97
16	Brahma	Chopp	B	5,0	Lata	355 ml	Argentina	10/11/98
17	MALTA Salta		N	sin alcohol	Bot. (1)	340 ml	Argentina	20/09/98
18	Corona Extra		B	4,4	Lata	340 ml	México	26/09/97
19	Bieckert	Africana	N	5,8	Bot. (1)	970 ml	Argentina	Nov./97
20	Isenbeck		B	4,6	Bot. (1)	1000 ml	Argentina	01/04/98
21	Quilmes	Bock	N	6,3	Lata	354 ml	Argentina	02/01/99
22	Quilmes	Light	B	3,3	Lata	354 ml	Argentina	31/10/98
23	Quilmes	Liberty	B	0,6	Lata	354 ml	Argentina	28/12/98
24	Tecate		B	4,5	Lata	340 ml	México	19/11/98
25	Palermo		B	4,9	Lata	354 ml	Argentina	30/11/98
26	Quilmes	Cristal	B	4,9	Lata	354 ml	Argentina	30/12/98
27	Bieckert	Oro	B	4,9	Lata	354 ml	Argentina	13/01/99

No. Muestra	Marca	Sabor	Color	% Etanol	Envase		Origen	Fecha de vencimiento
					Tipo	Volumen		
28	Iguana		B	5,2	Bot. (3)	330 ml	Argentina	16/10/98
29	Quilmes	Liberty	B	0,6	Lata	354 ml	Argentina	03/02/99
30	Heineken	Lager	B	5,2	Bot. (2)	330 ml	Argentina	16/10/98
31	Brahma	Chopp	B	5,0	Lata	355 ml	Argentina	04/01/99
32	Quilmes	Light	B	3,3	Lata	354 ml	Argentina	30/10/98
33	Quilmes	Bock	N	6,3	Lata	354 ml	Argentina	02/01/99
34	Sol		B	4,1	Bot. (3)	330 ml	México	07/10/98
35	Imperial		B	5,5	Bot. (1)	650 ml	Argentina	28/12/98
36	Bieckert	Africana	N	5,8	Bot. (1)	970 ml	Argentina	01/11/98
37	Isenbeck	Dark	N	4,6	Bot. (1)	1000 ml	Argentina	30/03/99
38	Brahma	Bock	N	5,9	Bot. (1)	970 ml	Argentina	15/10/98
39	MALTA Salta		N	sin alcohol	Bot. (1)	340 ml	Argentina	29/09/98
40	Heineken	Lager	B	5,0	Lata	354 ml	Argentina	20/01/99
41	Bieckert	Africana	N	5,8	Bot. (1)	970 ml	Argentina	04/01/99

No. Muestra	Marca	Sabor	Color	% Etanol	Envase		Origen	Fecha de Vencimiento
					Tipo	Volumen		
42	Isenbeck	Dark	N	4,6	Bot. (1)	1000 ml	Argentina	12/06/99
43	Brahma	Bock	N	5,9	Bot. (1)	970 ml	Argentina	15/10/98
44	Iguana		B	5,2	Bot. (3)	330 ml	Argentina	09/12/98
45	Heineken	Lager	B	5,0	Lata	354 ml	Argentina	20/01/99
46	Brahma	Chopp	B	5,0	Lata	355 ml	Argentina	10/11/98
47	Brahma	Bock	N	5,9	Lata	355 ml	Argentina	24/11/98
48	Iguana		B	5,2	Bot. (3)	330 ml	Argentina	08/12/98
49	MALTA Salta		N	sin alcohol	Bot. (1)	340 ml	Argentina	13/12/98
50	Imperial		B	5,5	Bot. (1)	650 ml	Argentina	06/02/99
51	Schneider		B	4,7	Bot. (1)	970 ml	Argentina	11/01/99
52	Schneider		B	4,7	Bot. (2)	970 ml	Argentina	11/01/99
53	Imperial		B	5,5	Bot. (1)	650 ml	Argentina	06/02/99
54	Quilmes	Cristal	B	4,9	Lata	354 ml	Argentina	29/12/98

B: cerveza blanca; N: cerveza negra; (1): botella de vidrio de color caramelo; (2): botella de vidrio de color verde esmeralda transparente; (3): botella de vidrio incoloro

III.7 – Extracción de las micotoxinas.

La cerveza es una matriz alimentaria cuyo contenido de agua y alcohol está alrededor de un 95 % (v/v) mientras que los tricotecenos están en el orden de trazas (ng/ml), por ello se deben concentrar éstos últimos. O sea se extraen los tricotecenos de la cerveza y se logra la concentración de los mismos al pasar una alícuota de la muestra medida exactamente a través de una columna de sílicagel (matriz hidrofílica). Se deja en contacto un tiempo para que las micotoxinas se absorban en el relleno. En la columna se retienen también sustancias afines de acuerdo con la polaridad como por ejemplo sales, azúcares. Se descarta el líquido que contiene pigmentos, agua, alcohol y otras sustancias no afines con el relleno de la columna. Se hace vacío suave evitando en todo momento que se seque la columna.

El cartucho de sílicagel se sujeta a un tapón de goma que se coloca en un kitasato de 500 ml. Se agregan lentamente 5 ml de cerveza desgasificados y se hace un leve vacío para permitir que se absorban los tricotecenos de la muestra, al cabo de los cuales se aumenta el vacío para que drene toda la muestra, se deja así unos 10 min.

En este paso se concentran las micotoxinas presentes y con pequeñas porciones de solvente orgánico se pasan a través de la columna, se eluyen las micotoxinas junto con algunas sustancias interferentes solubles en el solvente. En la columna quedan retenidos otras sustancias interferentes insolubles en el solvente utilizado.

Las toxinas se eluyen con 4 porciones de 20 ml de acetato de etilo–metanol (95–5), siempre haciendo vacío. Se juntan todos los eluidos en un balón de destilación, previo pasaje por un lecho de sulfato de sodio anhidro contenido en un embudo con papel de filtro (Black y col.,1986).

La solución orgánica obtenida, eluato, se evapora hasta sequedad en el rotavapor con un baño de agua a una temperatura menor o igual a 50°C (Scott y col., 1986). El residuo sólido que se

obtiene se lo utiliza completamente en el siguiente paso. Se transfiere a un vial de 4 ml con 3 porciones de diclorometano: metanol (3+1), lavando el balón. Luego, se evapora bajo una corriente suave de nitrógeno, con un leve calentamiento y a una temperatura menor o igual a 50°C. Se envuelve el vial con papel de aluminio, se sella con parafilm y se guarda en el freezer a -18°C.

III.8 – Purificación de las micotoxinas.

Como el residuo del paso anterior contiene sustancias interferentes que pueden molestar en el análisis cromatográfico es que se hace el siguiente paso de purificación o “cleanup”. Este paso consiste en retener la mayor cantidad de las sustancias interferentes y eluir las micotoxinas. Se emplea por lo general, una columna de fase reversa (matriz hidrofóbica) de C-2, C-8 o C-18 en que los grupos hidroxilos (silanoles) de la sílicagel se los ha esterificado con grupos ácidos de 2, 8 ó 18 carbonos, para disminuir la polaridad de la columna con respecto a la de la sílicagel. Se utiliza un cartucho de fase reversa (RP-C18), sujeto al kitasato de 500 ml con un tapón de goma y con un leve vacío se reacondiciona la columna con 2 porciones de 6 ml de metanol y otras 2 de 6 ml de agua destilada. En NINGUN MOMENTO se debe dejar que se seque la columna. El residuo obtenido en el paso anterior se resuspende, por agregado al vial de 4 ml de 50 µl de metanol y se agita con el vortex; luego, se agregan 500 µl de agua destilada y se vuelve a agitar con el vortex. Esta solución se vuelca sobre el tope de la columna, ya reacondicionada, y se hace vacío para dejar que drene la solución pero que queden retenidas las toxinas. Se repiten 2 lavados más del vial con metanol y agua en las mismas proporciones, pero teniendo el cuidado de no dejar secar la columna.

Se eluyen las toxinas con un solvente acuoso, por lo general metanol – agua. De esta forma se retienen parte de los pigmentos y aceites esenciales y se eluyen las micotoxinas. El eluato así

obtenido y contenido en un balón, se lo lleva a sequedad en el rotavapor y, como el caso anterior, se debe evitar que la temperatura del baño de agua supere los 50°C. Se eluyen entonces las toxinas con metanol – agua (80:20) y se recoge el eluato en un balón de 50 ml y se lleva a sequedad en rotavapor (Scott y col.,1992). El residuo obtenido se lo puede utilizar total o parcialmente para el próximo paso que es la derivatización. Se lo transfiere a un vial de 4 ml con 3 porciones de 500 µl de acetato de etilo: metanol (95:5). Se evapora a sequedad el solvente bajo una corriente suave de nitrógeno y con un leve calentamiento procurando que la temperatura no supere los 50°C.

Al vial se lo envuelve con papel de aluminio, se sella con parafilm, se rotula con el número de muestra y el día en que se hizo la extracción; después de lo cual, se lo guarda en un frasco color ámbar o caramelo y éste se lo guarda en el freezer a –18°C, hasta el momento del análisis por cromatografía gaseosa.

El residuo final obtenido equivale a 5 ml de cerveza.

III.9 – Derivatización de las micotoxinas.

La mayor parte de los analitos orgánicos se deben derivatizar para un análisis por cromatografía gaseosa. La derivatización consiste en transformar un grupo funcional, que hace que el analito sea mas polar y de alto punto de ebullición (menos volátil), en otro grupo funcional que convierte al analito en menos polar y de bajo punto de ebullición (mas volátil) y sobre todo termoestable Cohen y Lafonte, 1984; Bayliss y col., 1988).

Hay varios tipos de reactivos derivatizantes:

- **reactivos silanizantes**
- **reactivos acilantes**

Grupo de los reactivos silanzantes:

Estos reactivos tienen como núcleo al átomo de silicio y dentro de éste grupo los hay de varios tipos y estructuras:

MTBSTFA	N – metil – N – (ter – butildimetilsilil) – trifluoroacetamida
BSA	N,O – bis (trimetilsilil) acetamida
BSTFA	N,O – bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida
MSTFA	N – metil – N – trimetil - trifluoroacetamida
TMSDEA	N – trimetilsilil - dietilamina
TMSI	N - trimetilsililimidazol
HMDS	hexametildisilazano
TMCS	trimetilclorosilano
Tri – Sil	mezcla de (HMDS + TMCS)
Tri – Sil Z	mezcla de TMSI
Tri – Sil / BSA	mezcla de BSA
Tri – Sil BT	mezcla de (3 BSA + 3 TMCS + 2 TMSI)

Estos reactivos sirven para derivatizar grupos funcionales como hidroxilos, carboxilos, tioles y aminas primarias y secundarias; es decir, sirve para la derivatización de compuestos del tipo de los ácidos biliares, alcaloides, aminoácidos, azúcares, barbituratos, catecolaminas, esteroides, esterole, fenoles, flavonoides, hormonas, glicoles, narcóticos, nucleótidos y vitaminas.

Todos éstos reactivos vienen en solución y algunos usan como solvente de reacción la piridina, que es excelente para reacciones con los órgano–clorosilanos ya que dan como producto de reacción el ácido clorhídrico y la piridina es un buen aceptor de ácidos. Además,

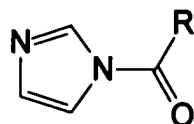
la piridina sirve para aquellas reacciones que se forman los trimetilsilil-derivados pues también es un buen aceptor de protones.

Algunos reactivos silanzantes vienen en solución con solventes del tipo dimetilformamida (DMF), usada en la preparación de derivados sililados de esteroides o en dimetilsulfóxido (DMSO) para obtener los trimetilsilil-derivados de los alcoholes terciarios. Otros solventes utilizados son el tetrahidrofurano (THF) y el acetonitrilo.

Grupo de reactivos acilantes:

- N – fluoroacilimidazoles
- Fluoroalquil anhídridos

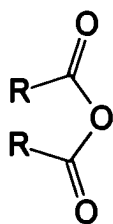
N – fluoroacilimidazoles: cuya estructura química es del tipo



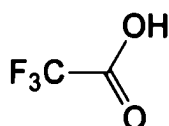
R	NOMBRE	PM	DENSIDAD
- CF ₃	trifluoroetil (TFEI)	164,1	1,560
- C ₂ F ₅	pentafluoropropil (PFPI)	214,1	1,428
- C ₃ F ₇	heptafluorobutiril (HFBI)	264,1	1,562

Estos compuestos sirven para la derivatización de grupos hidroxilos y aminas primarias y secundarias. El fluoroacil-éster formado es ideal para los detectores de captura de electrones o espectrometría de masa debido a la alta sensibilidad que tienen éstos detectores sobre aquellos compuestos.

Fluoroalquil anhídridos: cuya estructura química es del tipo



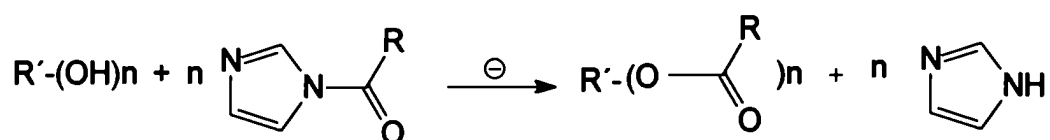
R	NOMBRE	PM	DENSIDAD
- CF ₃	trifluoroacético (TFAA)	210,0	1,490
- C ₂ F ₅	pentafluoropropiónico (PFPA)	310,0	1,571
- C ₃ F ₇	heptafluorobutírico (HFBA)	410,0	1,665

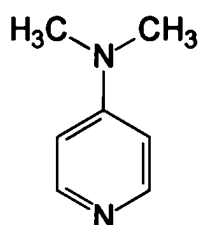
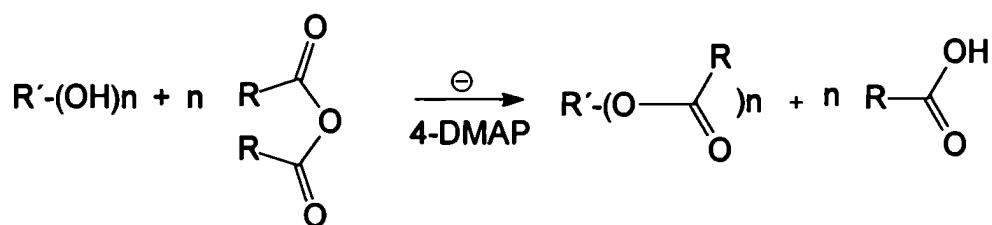


ácido trifluoroacético (TFA)

Son usados en la preparación de fluoroacil-ésteres de alcoholes, fenoles y aminas primarias y secundarias. Estos derivados son adecuados para el análisis por cromatografía gaseosa con detector de captura de electrones o espectrometría de masa.

La reacción es entre el grupo hidroxilo y el reactivo de cada uno de los grupos acilantes de la forma:





4 – N,N – dimetilaminopiridina (4-DMAP)

La primera reacción se realiza a 60°C durante 30 min. en una mezcla de solventes tolueno – acetonitrilo (95:5), siendo el mismo imidazol un reactivo nucleofílico, captura los protones que se forman durante la reacción por ruptura del enlace O – H del grupo hidroxilo. En la segunda reacción se necesita de un compuesto que actúe como nucleofílico y catalizador a la vez. Este reactivo es la 4–N,N–dimetilaminopiridina (4–DMAP). Es un catalizador altamente eficiente para una variedad de reacciones de acilación y es además un reactivo hipernucleofílico que captura los protones formados en la reacción (Hassner y col., 1978; Höfle y col., 1978; Scriben, 1983). Utiliza la misma mezcla de solventes, tolueno – acetonitrilo (95:5), si se incluye en una concentración de 2 mg/ml. La reacción también se hace a 60°C (30 min).

Para ambos casos, se agrega un 50 % en exceso el reactivo derivatizante, para que reaccionen las micotoxinas y otras sustancias interferentes, como ser pigmentos y aceites esenciales (grupo –OH) y proteínas y aminoácidos (grupo –NH₂).

Luego se destruye el exceso de derivatizante y se neutraliza el ácido formado en la reacción, por agregado de una solución acuosa de carbonato ácido de sodio (3% p/v) o de un buffer fosfato (pH = 7,0 – 8,0). Se separa la capa orgánica de la acuosa por decantación o por centrifugación. Este último procedimiento es mas rápido.

Se hace una dilución conveniente de la capa superior, la orgánica, con un solvente adecuado para la inyección. Se debe tener en cuenta que el punto de ebullición de éste solvente, debe estar entre 10° y 30°C por arriba de la temperatura de arranque de la corrida cromatográfica.

Todos los solventes usados para la derivatización deben ser secados previamente con cloruro de calcio para eliminar restos de agua, ya que ésta destruye el reactivo de derivatización. Se agregan aproximadamente unos 2 g. de cloruro de calcio (previamente secados en estufa durante 2 hs. a 130°C y luego enfriados en desecador), a 10 ml de tolueno y acetonitrilo por separado. Se dejan actuar 1 hora agitando de vez en cuando y luego se filtran por papel de filtro Whatman No. 4 y se guardan en tubos de 20 ml de capacidad con tapa a rosca y sellados con parafilm.

Para la derivatización de la muestra se agrega al extracto de cerveza contenido en el vial de 4 ml, 400 µl de acetato de etilo: metanol (95:5) y se homogeiniza con el vortex durante unos 30 seg. De ésta solución se toma una alícuota de 100 µl (equivalente a 1,25 ml de cerveza) y se los coloca en un tubo de vidrio evaporando el solvente con una corriente suave de nitrógeno. Al residuo se le agrega 250 µl de tolueno:acetonitrilo (95:5) que contienen 2 mg de 4-N,N-dimetilaminopiridina / ml como catalizador de la reacción de derivatización, se homogeiniza 30 seg. con el vortex. Después se agregan 20 µl de anhídrido heptafluorbutírico (HFBA) como reactivo derivatizante, y se homogeinizan durante 1 min. con el vortex. La mezcla se mantiene en un baño de arena a 60°C durante 30 min. Después de ese tiempo se enfría a temperatura ambiente y se agregó 12 µl de tolueno y 1 ml de solución acuosa de carbonato

ácido de sodio (3% p/v). Se homogenizan durante 2 min. en vortex. Al cabo de ese tiempo y, para una mejor y rápida separación de la fase orgánica de la acuosa, se centrifugan a 350 g.

En un vial de 2 ml se colocan 25 μ l de la capa superior, la toluénica, y se llevan a sequedad con nitrógeno. Se agregan 500 μ l de n-hexano que contienen 10 μ g ACBP/ml, se homogenizan en vortex durante 30 seg. Se inyectan en el cromatógrafo 2 μ l de esta solución lo que equivale a 0,5 μ l de la muestra de cerveza.

Con el carbonato ácido de sodio en solución acuosa se elimina el ácido heptafluorbutírico formado en la reacción y el exceso de derivatizante. El agregado de un 50% en exceso favorece la total reacción de los grupos hidroxilos de los tricotecnos.

III.10 – Condiciones cromatográficas.

El método empleado es el de cromatografía gas-líquido (GLC) con detector de captura de electrones (ECD) pues permite una mayor sensibilidad y especificidad. Con este método se disminuye la mínima masa detectable y cuantificable frente a los otros métodos como ser cromatografía en capa delgada (TLC) o cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Las condiciones de análisis cromatográfico se detallan a continuación:

temperatura del inyector	250°C
temperatura del detector	300°C
temperatura programada del horno	60°C (1 min)
	50°C/min
	200°C (2 min)
	5°C/min
	280°C (5,2 min)

tiempo total de analisis	27 min
flujo de gas carrier (a 60°C)	1,2 ml/min (N2 – XSE)
presión de cabeza de columna	22 psi
flujo de gas (auxiliar + carrier)	50 ml/min (N2 – XSE)
flujo de septum	2 ml/min
volumen de inyección	2 mcl (splitless)
válvula de purga	ON = 1 min. OFF = 26 min.

III.11 – Análisis de los estándares de tricotecenos.

De cada vial de 2 ml. que contiene 4 µg del residuo sólido de cada uno de los estándares de las micotoxinas se resuspenden en 400 µl de acetato de etilo: metanol (95:5). Se agitan durante 1 min. con el vortex y se toma una alícuota de 75 µl (que equivale a una masa de toxina de 0,75 µg). Se lleva a sequedad con una corriente suave de nitrógeno.

Se hace la derivatización según la técnica descrita en el punto III.9 y se analiza por cromatografía gaseosa según la técnica descrita en el punto III.10, donde los 2 µl inyectados equivalen a una masa de 300 pgr.

Se obtiene así una serie de tiempos de retención de las micotoxinas y del estándar interno (ACBP) que está presente en el solvente de inyección (n-hexano). Así se puede relacionar (cociente) entre el tiempo de retención del estándar de la micotoxina y el del estándar interno. Esta relación se mantiene constante siempre y cuando no se alteren las condiciones cromatográficas con que se trabaje. Se procura construir una tabla de valores de tiempos de retención de los estándares de micotoxinas, del estándar interno y del cociente entre ambos.

Al hacer la corrida cromatográfica de una muestra, el producto entre el cociente de tiempos de retención de los estándares por el tiempo de retención del estándar interno de la muestra da un

valor que nos indica aproximadamente el tiempo de retención a que debe salir la micotoxina en la muestra. Esto es una manera de identificar los picos en un cromatograma de una muestra ya que en éste no sólo hay picos de las micotoxinas sino que además hay picos de las sustancias interferentes.

Para descartar picos espúreos se debe hacer un blanco de muestra, o sea en primer lugar se hace un blanco de todos los solventes utilizados en los procesos de extracción, purificación y de derivatización siguiendo el procedimiento sin colocar muestra. En ésta corrida aparecen los picos no deseados que deben descartarse en la lectura del cromatograma de la muestra.

III.12 – Curva de calibración.

Al vial de 2 ml conteniendo los 4 µg de toxina se le agregan 320 µl de acetato de etilo: metanol (95:5) y se homogenizan con el vortex. Se obtiene así una concentración de 12,5 µg/ml. de toxina. Con una jeringa de 100 µl se toman alícuotas de 10, 20, 40 y 60 µl respectivamente que se ponen en tubos rotulados con 25, 50, 100 y 150 ppb de esa toxina respectivamente. Se los seca bajo una corriente suave de nitrógeno y se los derivatiza tal cual lo explicado en III.9. Se inyectan 2 µl de la solución de n-hexano con ACBP de cada uno de los viales antes mencionados; por lo que se obtiene una masa de inyección de 50, 100, 200 y 300 pgr de cada toxina y de 19 ngr de ACBP.

En el caso de DON se estima el límite de cuantificación de DON que resulta de 2 pgr (1ppb).

III.13 – Confirmación por cromatografía en placa delgada.

En la muestra de cerveza que presenta el mayor valor de contaminación por DON se realizará una confirmación por cromatografía bidimensional en placa delgada.

El residuo equivalente a 35 ml. de cerveza se lo resuspende en 100 μ l de acetato de etilo: metanol (95:5) y se siembra en la placa todo ese volumen contra 30 μ l de una solución estándar de DON de 100 μ g/ml. Se hace un primer desarrollo con tolueno: acetonitrilo (1:1) y se deja secar la placa a temperatura ambiente. La placa se gira 90° y se vuelve a sembrar 30 μ l del estándar de DON. Se hace un segundo desarrollo con tolueno : acetonitrilo (1,05:1,00). Se deja secar la placa a temperatura ambiente y se asperja con una solución al 20 % de cloruro de aluminio en etanol – agua (1 : 1). Después de dejar que escurran los solventes a temperatura ambiente se calienta la placa en estufa a 120°C durante 6 min. Se observa a la luz ultravioleta de longitud de onda 254 nm el resultado.

Se estima un límite de cuantificación de DON de 40 ng/ml cuando se trabaja en TLC.

IV – RESULTADOS Y DISCUSION

IV.1 – Método de análisis de tricotecenos en cerveza.

Se compararon las metodologías descritas en el punto I.7 y se seleccionaron los pasos que se consideraron mas adecuados para el estudio que se describe a continuación.

Con relación a la **preparación de la muestra** la metodología más adecuada es la Scott y col. (1993) ya que se trata de la misma matriz, cerveza, que presenta dióxido de carbono disuelto. O sea, se procedió a desgasificar las muestras, pero modificando la metodología propuesta por Scott y col. (1993) que incluye solo 15 min. de agitación, acoplándole a la agitación un suave vacío sobre la muestra para garantizar una exhaustiva eliminación del gas (el procedimiento está descrito en el punto III.6). El tiempo necesario fue de 20 min.

La presencia de alcohol, etanol, puede alterar las recuperaciones. Las pruebas realizadas indicaron que era conveniente ajustar el contenido de alcohol cuando las cervezas o maltas tenían menos de 4 % (v/v). Scott y col. (1993) plantean el ajuste al 5 % (v/v) del contenido de etanol, pero no indican el procedimiento a seguir cuando las cervezas superan este contenido de alcohol. Las cervezas argentinas tienen mayor contenido de alcohol que las canadienses y se debió comprobar la influencia del ajuste de la concentración de etanol (III.6).

Las cuatro metodologías descritas en I.7 para la **extracción** de las micotoxinas utilizan una matriz hidrofílica para concentrar las micotoxinas de una matriz líquida variando la capacidad de la columna entre 5 a 50 ml (TABLA I.20). Al utilizar sólo 5 ml de cerveza la capacidad de la columna se pudo reducir a 3 ml disminuyendo el costo del análisis. Se descarta la posibilidad de partición líquido-líquido para la extracción de las toxinas porque el tipo de

matriz, con alto contenido de agua, conlleva a la utilización de altas cantidades de solvente. Este volumen de solvente, que debe concentrarse por evaporación, aumenta los riesgos de pérdida de toxinas en esta etapa.

Al pasar la muestra por una columna de silicagel se elimina el agua, etanol y sustancias interferentes no retenidas por el relleno.

Se seleccionó para la primera etapa de extracción de las toxinas la metodología descrita por Scott y col. (1993) y se realizó la siguiente modificación: Scott y col. (1993) utilizaban 10 ml de cerveza y realizaban 8 extracciones con acetato de etilo: metanol (95:5) de 20 ml cada una. En este trabajo sólo se usó 5 ml de cerveza y 4 extracciones con acetato de etilo: metanol (95:5) de 20 ml cada una. La ventaja comparativa es que se necesita la mitad de volumen de los solventes de extracción.

Las recuperaciones obtenidas por Scott y col. (1993) se muestran en la TABLA IV.1 para tres micotoxinas: NIV, DON y ZEA en tres niveles de toxinas agregadas 5, 10 y 15 ng/ml.

TABLA IV.1 – Recuperaciones de NIV, DON y ZEA de cervezas.

Micotoxina agregada (ng/ml)	% RECUPERACION		
	NIV	DON	ZEA
5	101	106	93
10	91	94	96
15	92	98	92

Scott y col. (1993)

Las recuperaciones obtenidas con esa modificación superaron el 90 % en su nivel de 10 ng/ml. La extracción con 8 porciones de 10 ml de acetato de etilo: metanol (95:5) no mejoró

sustancialmente la recuperación y por ello se prefirió, por rapidez en el análisis, 4 extracciones con 20 ml cada una, que es la metodología descrita por Rood y col. (1986).

Sé eluyen las toxinas y se retienen sustancias interferentes que en el caso de cervezas negras son de color pardusco.

El eluato obtenido se lo hace pasar por un lecho de sulfato de sodio anhidro (Black y col., 1986; Scott y col., 1993). Las cuatro metodologías (Black y col., 1986; Rood y col., 1986; Swanson y col. 1986 y Scott y col., 1993) llevan a sequedad con un rotavapor, procedimiento que se utilizó para concentrar el eluato.

La **purificación** de los extractos se realiza en tres de los trabajos seleccionados por columna C-18 de 3 ml de capacidad. Esta metodología dio resultados adecuados de recuperación y por ello no se probó la metodología descrita en la TABLA I.22 por Rood y col. (1986). Los solventes utilizados, metanol:agua 8:2, y los volúmenes utilizados, corresponden a la metodología descrita por Scott y col. (1992). Luego de llevar a sequedad el residuo se lo resuspende para realizar la derivatización. En la columna quedan retenidas ciertas sustancias de un color rosa pálido a rosa y se obtiene un residuo amarillento luego de la evaporación en el rotavapor.

La modificación realizada fue utilizar acetato de etilo: metanol 95:5 en vez de diclorometano: metanol 9:1 para resuspender el residuo pues el primer sistema de solventes presenta menos picos interferentes en el cromatograma que el segundo. La causa probable es que el diclorometano no era de la calidad expresada en el envase.

Se seleccionó esta relación acetato de etilo: metanol para las diluciones previas a la derivatización en vez de metanol, solvente indicado por Scott y col. (1993) y Swanson y col. (1986), pues se observó que las toxinas eran más estables.

Para el análisis de trazas de tricotecenos y de zearalenona, el mejor método y el más recomendado por bibliografía actualmente es el de GLC–ECD. En la TABLA I.25 se observa que solo Swanson y col. (1986) y Rood y col. (1986) utilizaron el detector de captura. Ambos trabajos utilizaron columnas empacadas, probablemente por el año de realización de los mismos. El desarrollo de columnas capilares fue posterior a la fecha de realización de esos trabajos. Se decidió utilizar estas columnas capilares y las mismas permitieron la obtención de cromatogramas con mayor resolución. Se procedió a elegir columna con polaridad similar a la OV–17 (3 %), que fue la utilizada en ambos trabajos.

Tal como fuera descrito en el punto III.9 se prefirió elegir un **derivatizante** que fijara átomos de flúor a las toxinas. Cuanto mayor es el contenido de átomos de flúor en el derivatizante, mayor será la sensibilidad en la detección con el ECD. Por eso, se explica la elección del anhídrido heptafluorobutírico (7 átomos de F) frente al pentafluoropropílico (5 átomos de F) o al ácido trifluoroacético (3 átomos de F) como agentes derivatizantes. Los derivados heptafluorbutiril–ésteres se usan para la determinación de DON en trigo por GLC–ECD (A.O.A.C., 1995) por su mayor especificidad y sensibilidad con ese detector.

La elección del **estándar interno** debe cumplirse con ciertos requisitos:

- estructura química similar a los analitos a cuantificar.
- sensibilidad y especificidad para la detección.
- eluir en la mitad del cromatograma si hay varios analitos o lo más cerca posible del analito de interés.

En nuestro caso se usó como estándar interno el ACBP (2–amino–5–clorobenzofenona) ya que uno no sabía “a priori” que tipo de micotoxinas se iban a encontrar en las cervezas y en la

malta. No se pudo usar inicialmente un tricoteceno como estándar interno pues si la muestra hubiera contenido esa micotoxina los valores cuantificados serían erróneos.

Las micotoxinas seleccionadas para su análisis en las cervezas fueron del Grupo A (NEO, DAS, T-2 tetraol, T-2 triol, HT-2 y T-2) y del Grupo B (NIV, DON, 3-ADON y 15-ADON).

Se comprobó que el tiempo de retención (o tiempo de elución) del estándar interno no coincidiera con ninguna de las micotoxinas elegidas y tampoco con ningún pico presente en el cromatograma de las muestras. El estándar interno que se seleccionó está descrito en un trabajo publicado por ROMER LABS. INC. (1995) y contiene en su estructura química un cloro (átomo electronegativo) y un grupo funcional amino (que tiene un par de electrones libres), esto permite sin necesidad de una derivatización que la molécula sea detectable por el ECD. Por ello se lo puede agregar junto al solvente de dilución, disminuyendo los errores de dilución.

En la Fig. IV.1 se observa el estándar de ACBP con NIV, en la Fig. IV.2 con el estándar de DON y T-2 triol, en la Fig. IV.3 además de DON están el T-2 triol y del HT-2.

El uso de la cromatografía gas-líquido con **columnas capilares** permite tener una alta resolución entre picos. Las variables que se ajustaron son las temperaturas del inyector, detector y la del horno. Estas columnas capilares de sílica fundida tienen una longitud entre los 25 a 100 m., con un diámetro interno que varía entre los 0,1 a 0,350 mm. La resolución de los HFB-ésteres utilizados depende también de la polaridad de la columna. El 3-ADON y el 15-ADON tienen una tendencia a salir en los mismos tiempos de retención y sus productos de hidrólisis pueden superponerse con los del estándar interno ACBP (Figuras IV.4, IV.5, IV.6, IV.7 y IV.8). Además de los productos de hidrólisis (3-ADON, 15-ADON y HT-2) puede presentarse desdoblamiento de picos, como nuestro caso al elegir la columna HP-5. Se

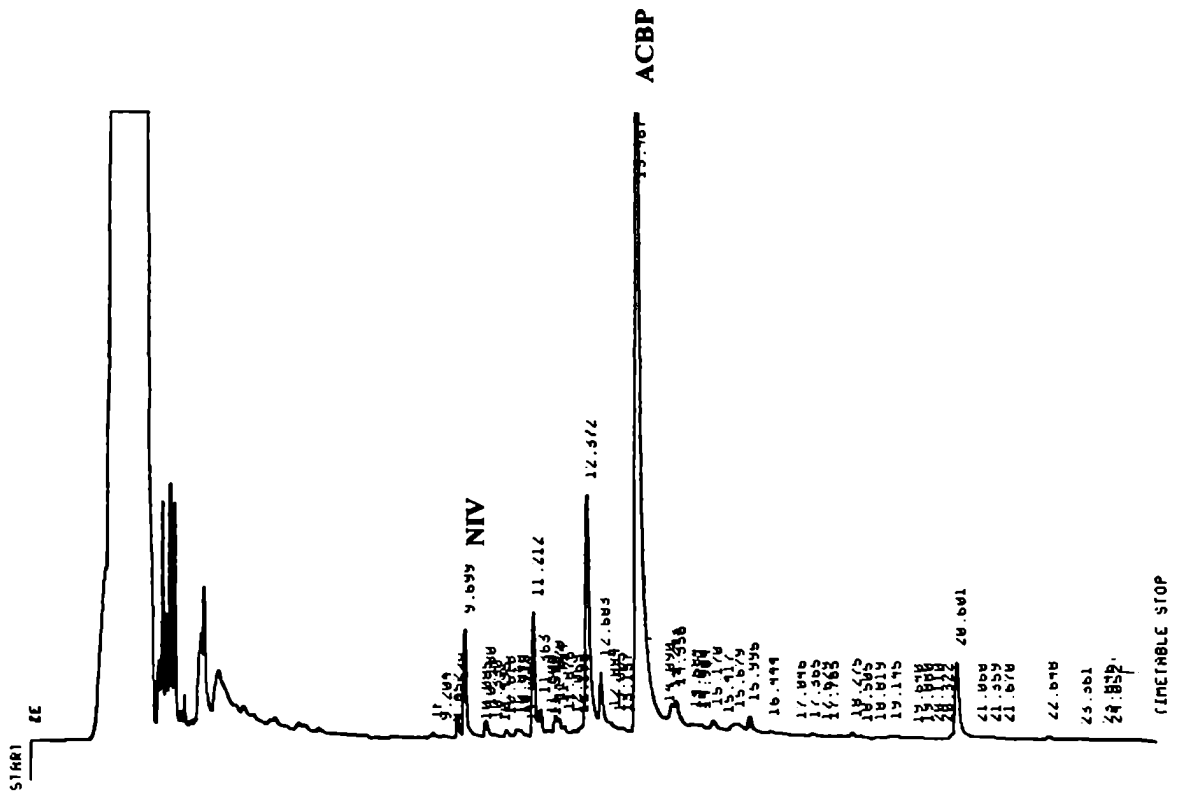


FIGURA IV.1

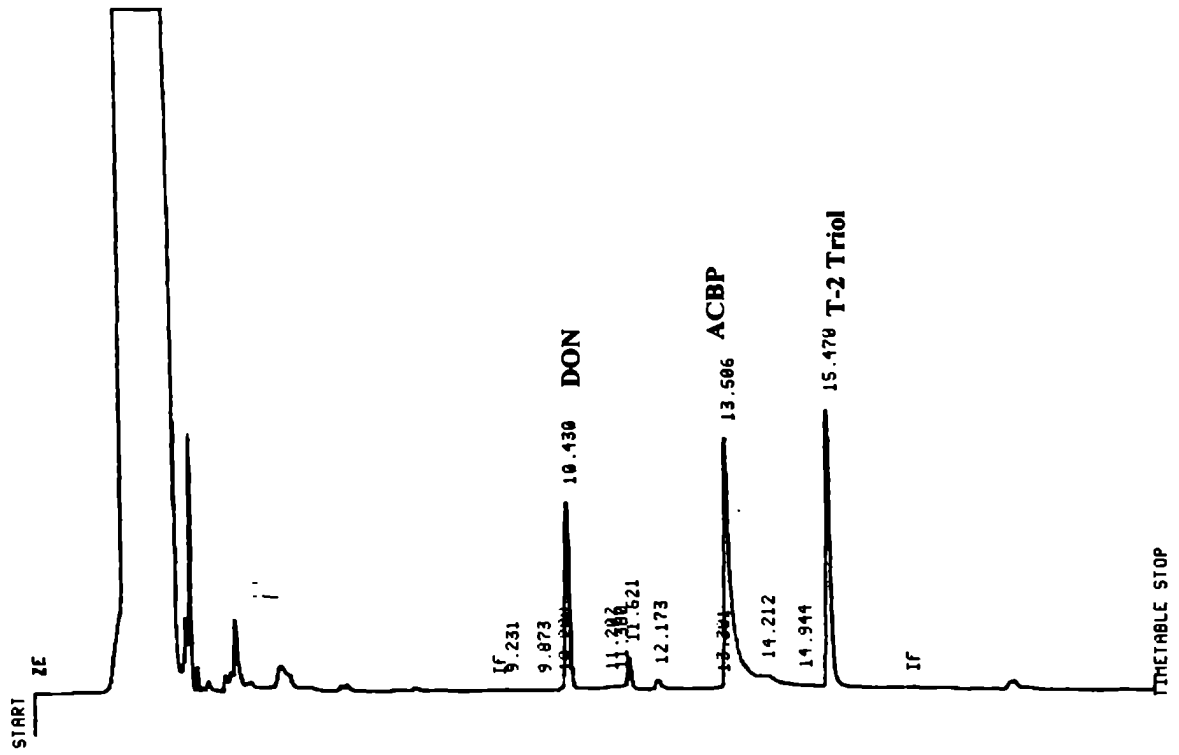


FIGURA IV.2

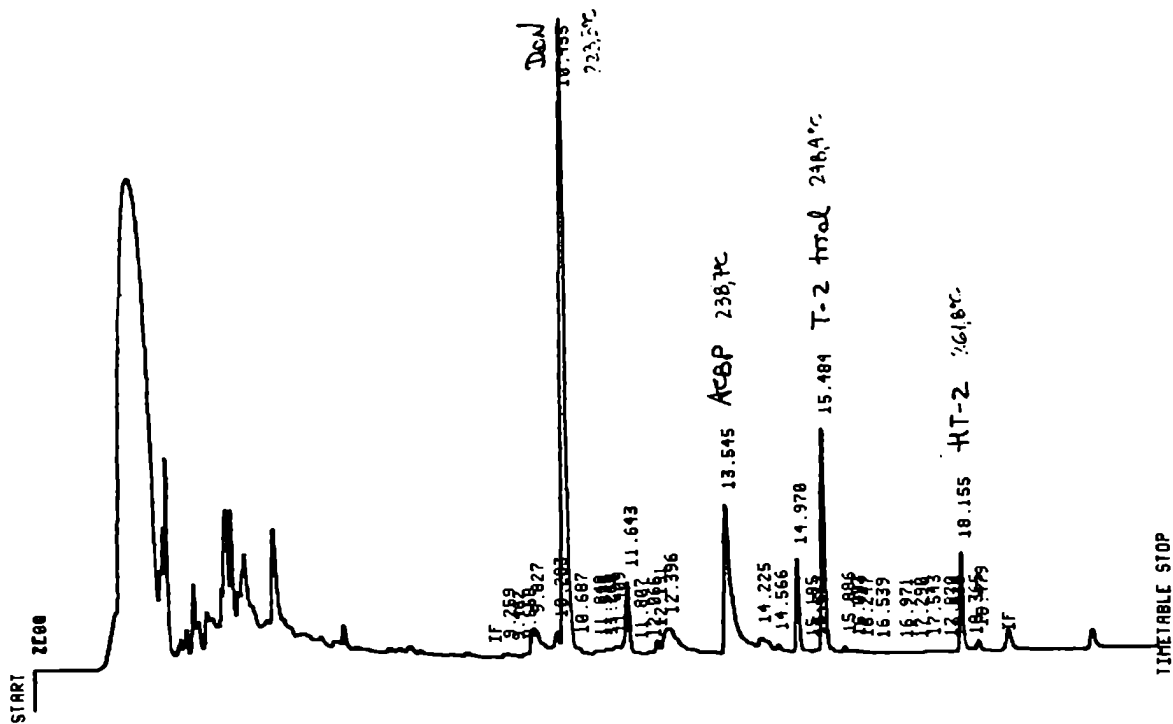


FIGURA IV.3

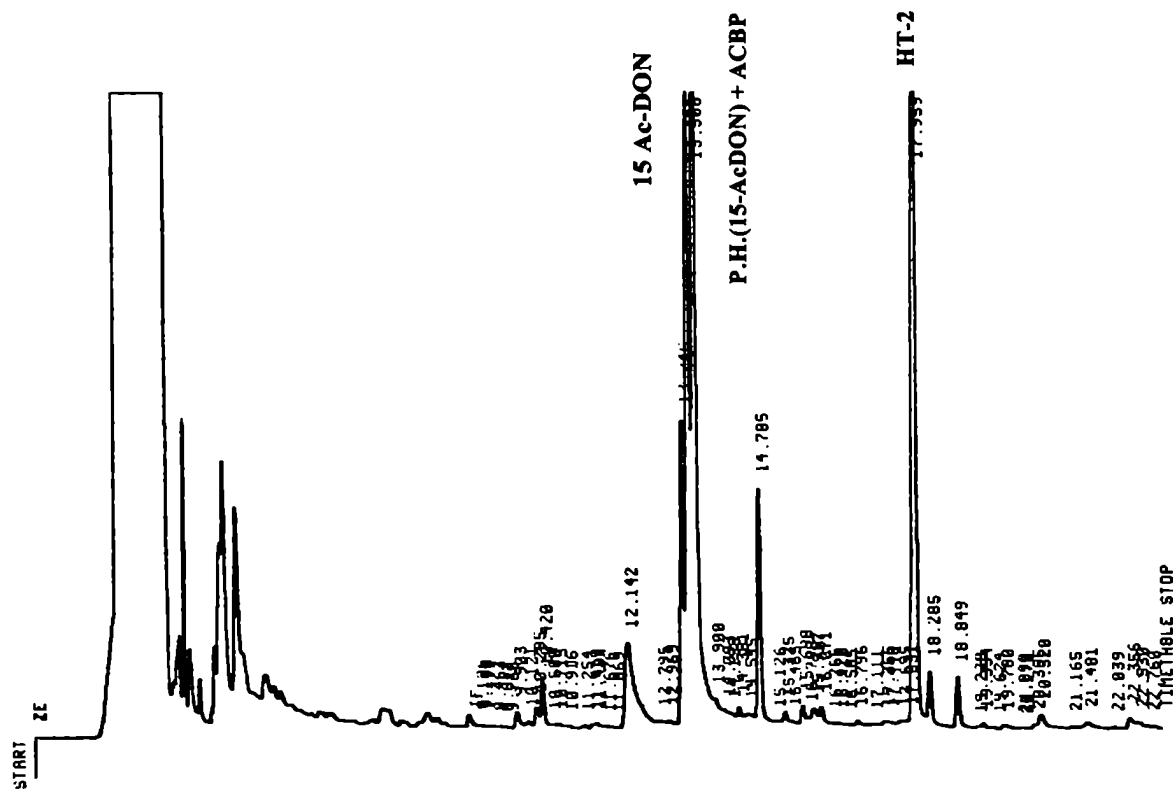


FIGURA IV.4

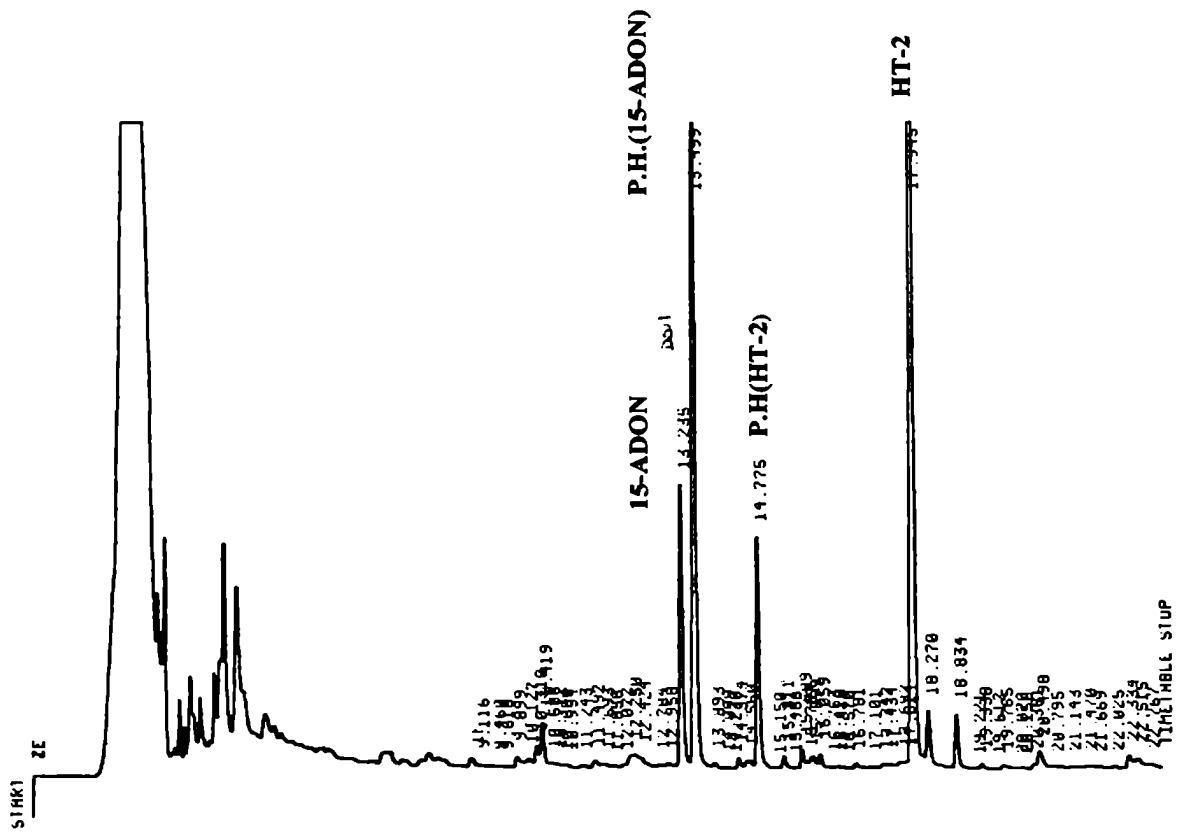


FIGURA IV.5

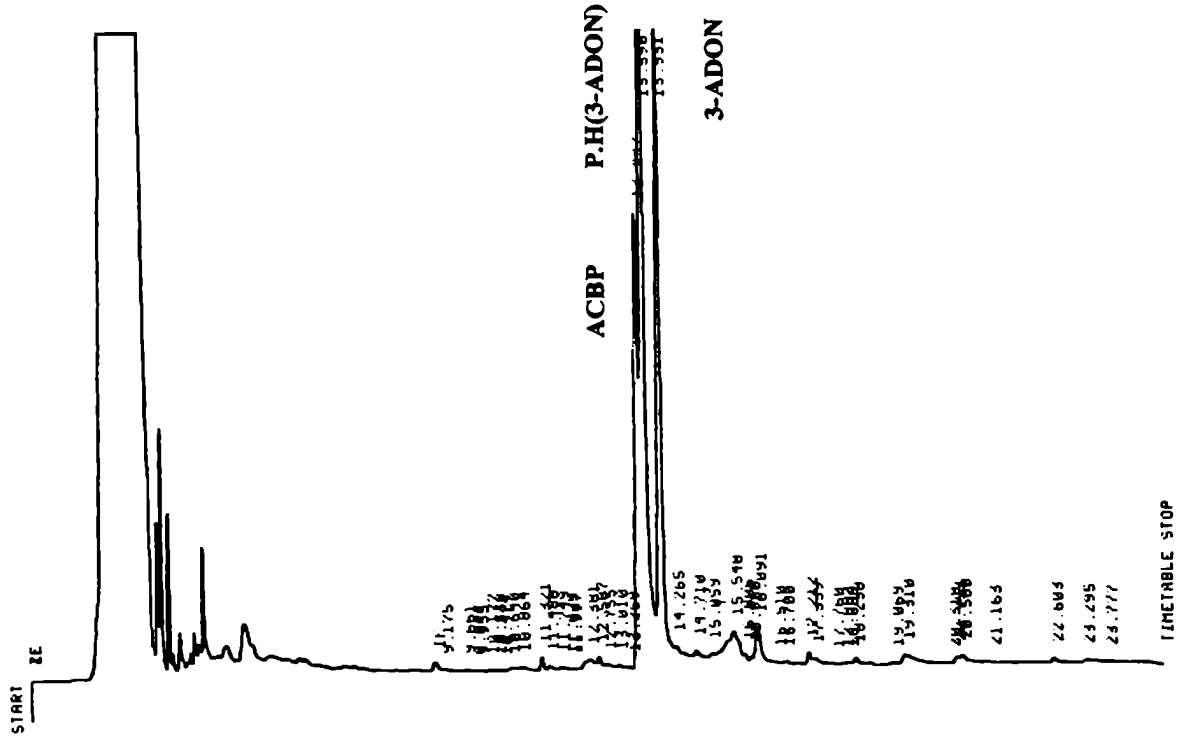


FIGURA IV.6

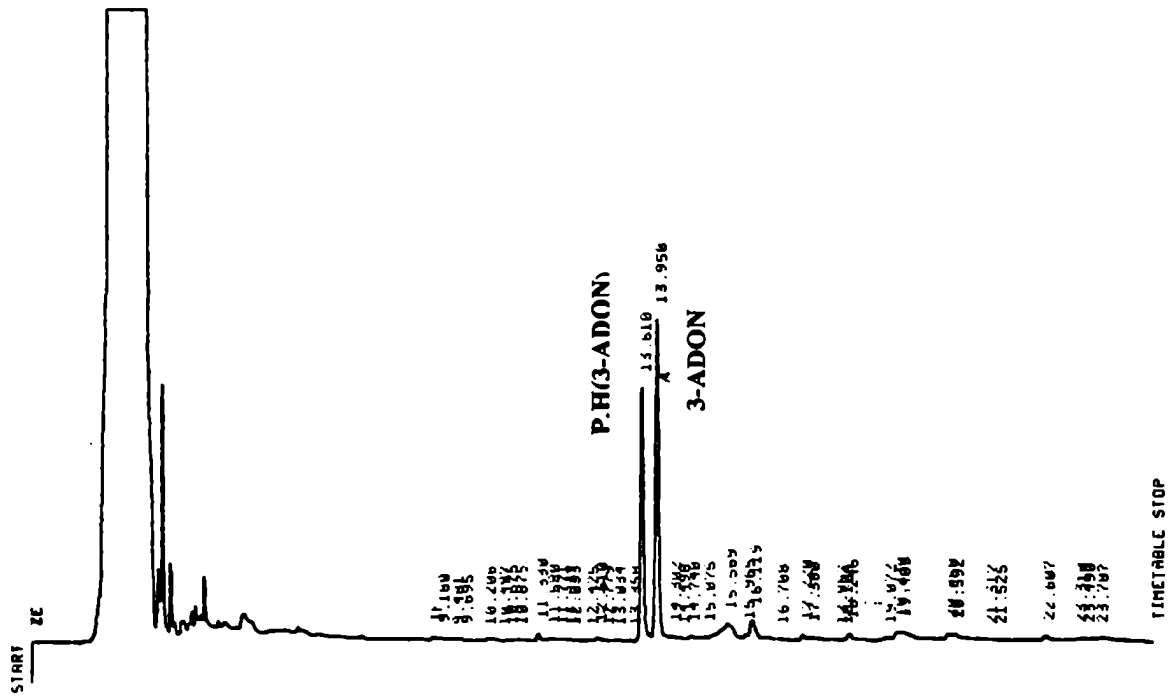


FIGURA IV.7

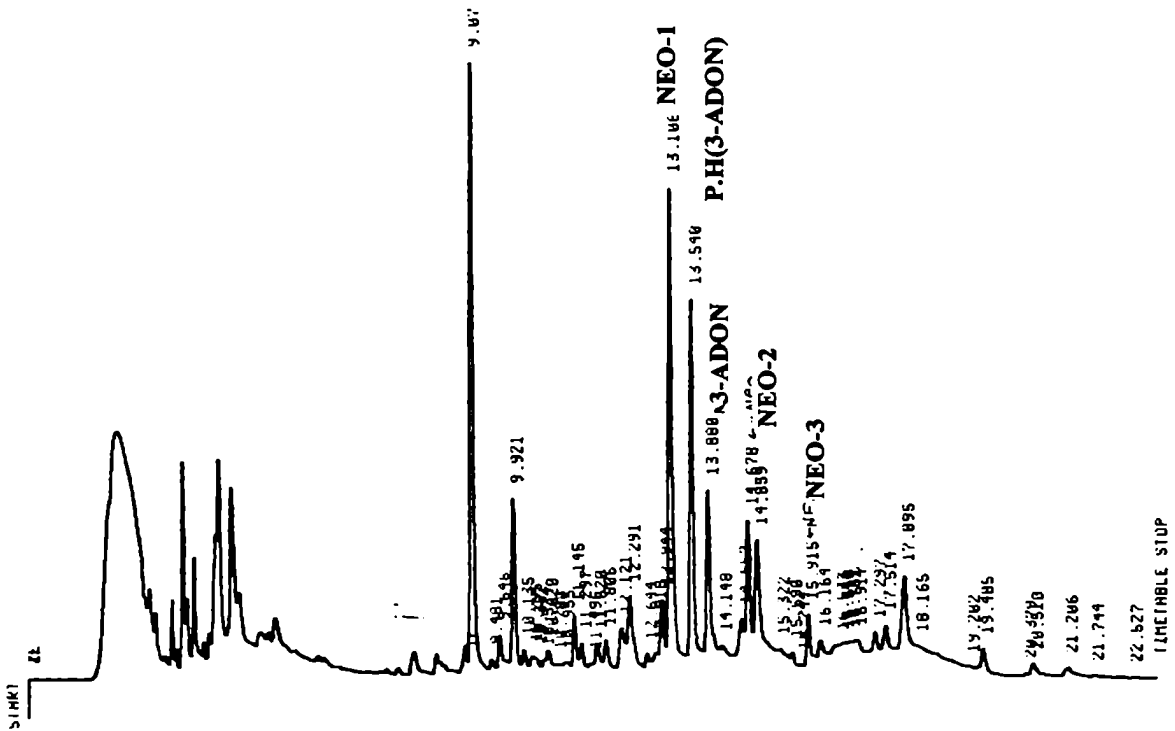


FIGURA IV.8

observa desdoblamiento de NEO (Fig. IV.8) y DAS (Fig. IV.9) y no se observa desdoblamientos en la Fig. IV.10 para el T-2 tetraol y el T-2.

En cuanto a la **temperatura del horno**, los equipos permiten programar rampas de velocidad de calentamiento del horno con lo que se pueden separar bien los picos de interés de las interferencias presentes. La mayoría eluye en los primeros minutos por lo que con la primera rampa se eliminaron las interferencias del extracto de la muestra y los solventes usados. Con la segunda y/o tercera rampa(s) se separa las diferentes toxinas entre sí y de los interferentes más específicos. Se debe tener en cuenta que algunas de estas toxinas pueden ser termosensibles, por lo que se debe extremar los cuidados en las temperaturas para que no aparezcan picos de degradación en los cromatogramas.

El **inyector** es importante en el “modo” en que se trabaja, pues en el análisis de trazas la muestra debe entrar completamente en la columna. Esta última etapa permite una mayor concentración de las toxinas. Se logra por medio del manejo de la válvula de purga en el momento de la inyección. Se debe encontrar cerrada, modo splitless sin división, para que entre toda la muestra. Si se encuentra abierta, modo split con división, parte de la muestra se pierde y se disminuye la sensibilidad. La **temperatura del inyector** debe ser tal que volatilice la muestra derivatizada pero que no la altere térmicamente (pirolíce) y de esta forma entre intacta a la columna.

La **temperatura del detector** debe ser tal que diferentes sustancias cuando salgan de la columna no queden retenidas por el detector; o sea, la temperatura del detector tiene que ser superior en unos 20° – 30°C a la de la columna, para mantener de esta forma limpio el detector y mantener la sensibilidad del mismo.

En cuanto al uso del **gas carrier** y/o **gas auxiliar** se pueden elegir el mismo o diferente gas para ambas funciones según la conveniencia o el grado de exactitud y rapidez del análisis. El

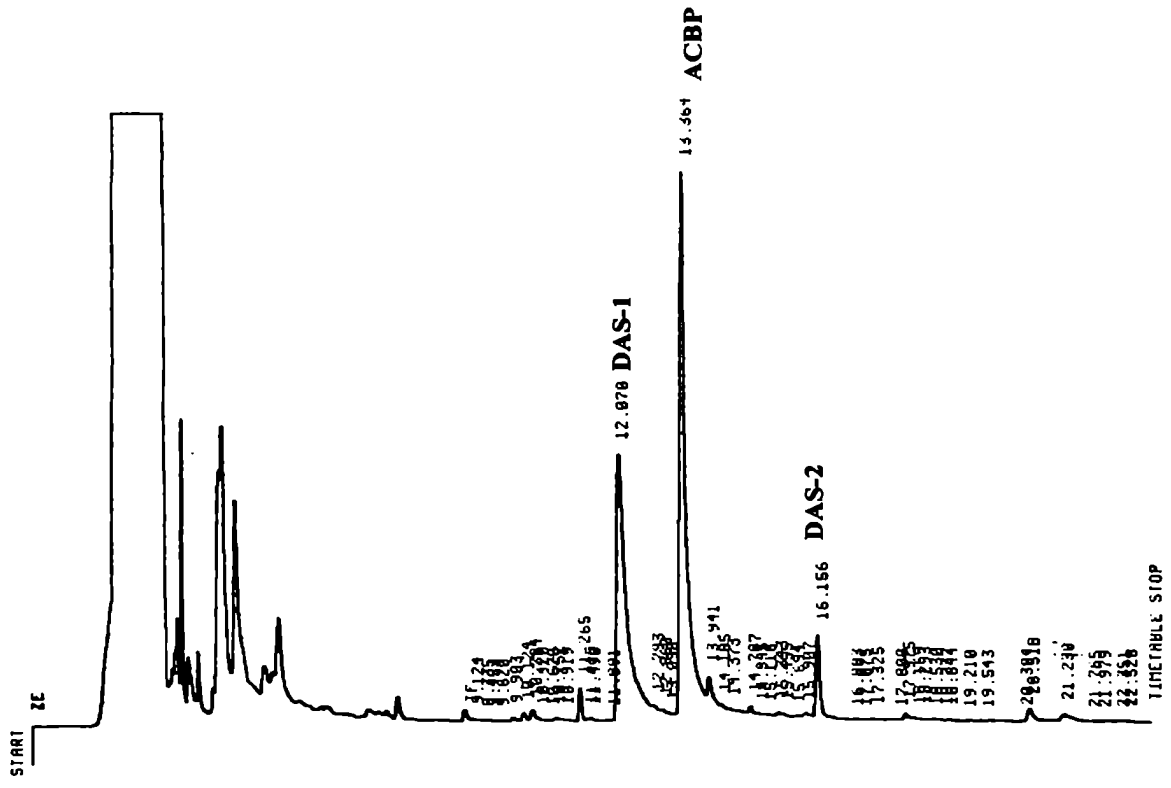


FIGURA IV.9

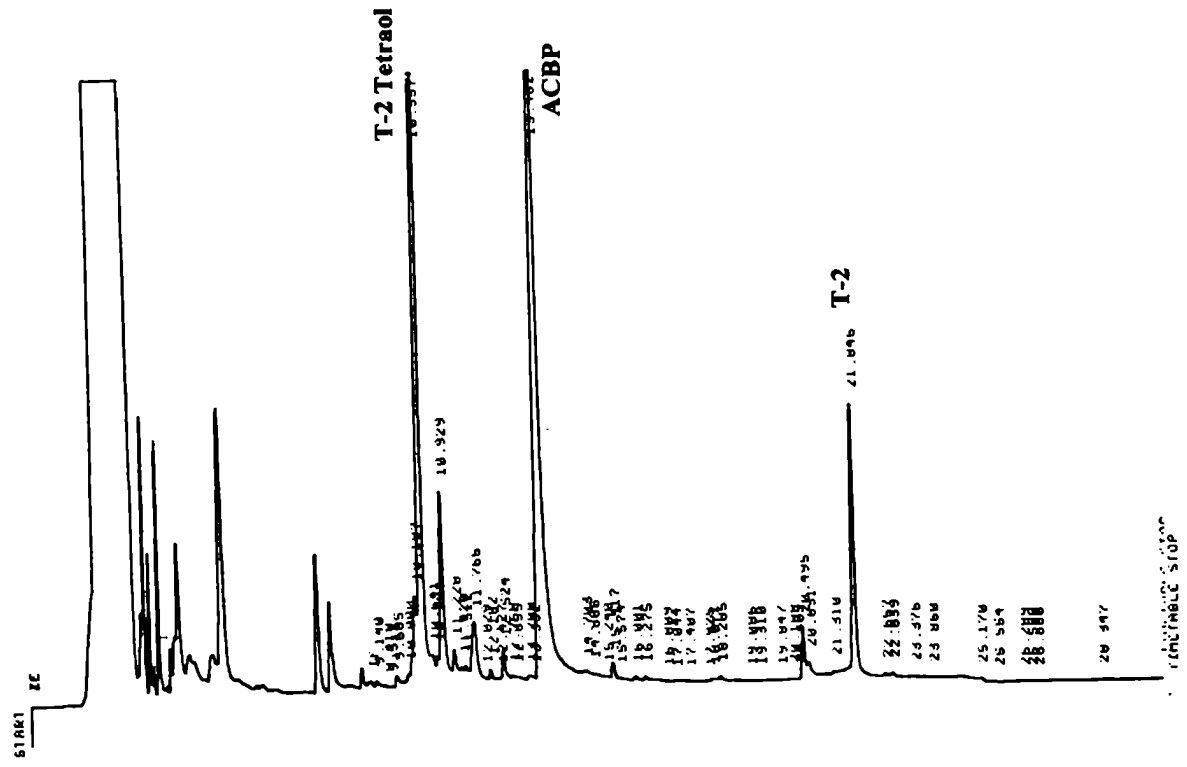


FIGURA IV.10

gas auxiliar es el que circula por el detector ECD y debe ser de muy buena calidad, puede utilizarse nitrógeno o helio. El gas auxiliar necesita de un alto flujo (50 – 60 ml/min.) por ello se decidió utilizar el nitrógeno ya que a igualdad de comportamiento este es más económico que el helio. El **gas carrier** es el que va por la columna analítica y el que eluye a la muestra. Puede ser el mismo nitrógeno que se utiliza para el detector o helio o hidrógeno. El hidrógeno da mejor resolución que el helio y éste que el nitrógeno. Como la resolución fue suficiente con nitrógeno como gas carrier se seleccionó el nitrógeno también por razones económicas y de seguridad.

La siguiente etapa fue obtener los valores de tiempos de retención (tret) de las diferentes micotoxinas con sus productos de degradación y el tiempo de retención del ACBP. Se pudo establecer una relación entre el tret de la micotoxina y el tret del ACBP, para las condiciones cromatográficas siguientes:

60°C (1 min.) 50°C/min 200°C (2 min.) 5°C/min. 280°C (5,2 min.)

flujo de columna (60°C) = 1,2 ml/min.

presión de cabeza de columna = 22 psi

temperatura del inyector = 250°C

temperatura del detector = 300°C

Los datos de los tiempos de retención se muestran en la TABLA IV.2:

TABLA IV.2 – Tiempos de retención de las toxinas y del ACBP.

MICOTOXINA	tret (min.)	tret ACBP (min.)	tret tox. / tret ACBP
NIV	9,699	13,487	0.7191
	(11,212)		(0,8313)
	(12,372)		(0,9171)
T-2 Tetraol	10,357	13,482	0,7682
DON	10,430	13,506	0,7722
	(11,621)		(0,8604)
15-ADON	13,326	13,469	0,9894
	(13,589)		(1,0089)
3-ADON	(13,590)	13,447	(1,0106)
	13,931		1,0360
DAS	12,070	13,364	0,9032
	16,156		1,2089
NEO	13,106	13,398	0,9782
	14,678		1,0095
	15,915		1,1879
T-2 Triol	15,470	13,506	1,1454
Toxina HT-2	18,155	13,545	1,3403
ZEA	20,963	13,340	1.5714
Toxina T-2	21,845	13,482	1,6203

NOTA: entre paréntesis figuran los tiempos de retención de los productos de degradación

Con los datos obtenidos de los cromatogramas, tiempo de retención y área de los picos de los estándares de tricotecenos con el estándar interno ACBP se diseña una tabla en la que se relacionan los tiempos de retención y las áreas del tricoteceno y del ACBP. A modo de ejemplo se muestra la de deoxinivalenol para diferentes masas inyectadas (TABLA IV.3):

TABLA IV.3 – Curva de calibración de DON vs. ACBP.

pgr DON (X)	tret (DON)	tret (ACBP)	Tret	Ar (DON)	Ar (ACBP)	(Y)
50	10,372	13,446	0,7714	1380534	23267552	0,0593
100	10,374	13,446	0,7715	2089293	23729072	0,0881
200	10,375	13,446	0,7716	5730877	24861440	0,2305
300	10,376	13,448	0,7716	9690195	24697840	0,3923

$$\text{Tret} = \text{tret (DON)} / \text{tret (ACBP)}$$

La recta por cuadrados mínimos está definida como: $Y = A + B \times X$

Y: área DON / área ACBP

X: pgr DON inyectados

A : ordenada al origen

B : pendiente de la recta

Graficando la recta con los datos arriba expuestos, se obtuvieron los parámetros siguientes:

N = 4 número de datos

R = 0,9963 coeficiente de correlación

B = 0,00133 pendiente de la recta

A = - 0,0231 ordenada al origen

Con lo cual la recta quedó definida como (ver Fig. IV.11):

$$Y = -0,0231 + 0,00133 \times X$$

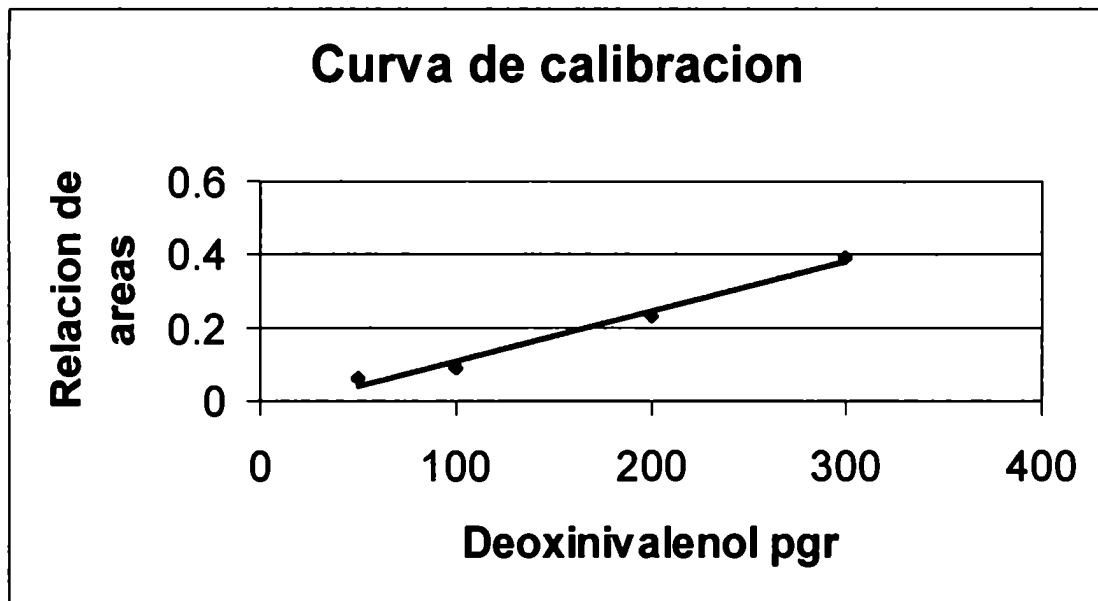


Fig. IV.11 – Curva de calibración de DON vs. ACBP.

El límite de cuantificación hallado para el DON es de 1 ppb (1 ng/ml) contra 1,5 ppb de límite de detección del trabajo de Scott y col.(1993). Este límite es mucho menor que el método oficial de referencia para el trigo de 350 ppb (AOAC, 1995). El trabajo de Scott se basó en la cromatografía gas-líquido y usó un espectrómetro de masa como detector; en el trabajo aquí realizado se usó un detector de captura de electrones que es mucho más sensible para el análisis de trazas que el detector antes mencionado. Comparado con otros trabajos, se tiene menor límite de detección y cuantificación que lo informado por Payen y col.(1983) y De Vecchio y col.(1985) que dan valores de 2,5 – 5,0 ppb de límite de detección.

IV.2 – Análisis cromatográfico de las muestras de cervezas.

Se inyectaron de 1 a 2 μl de los extractos derivatizados de las muestras con y sin agregado de ACBP. La primera conclusión fue que la única toxina contaminante presente en las cervezas era el DON. Por ello se decidió además agregar como estándar interno el T-2 triol. La utilización de éste estándar interno permite minimizar los errores que se pueden producir durante la derivatización. En la Fig. IV.12 se observan los dos estándares internos agregados a una cerveza que no presentaba contaminación, muestra No. 28.

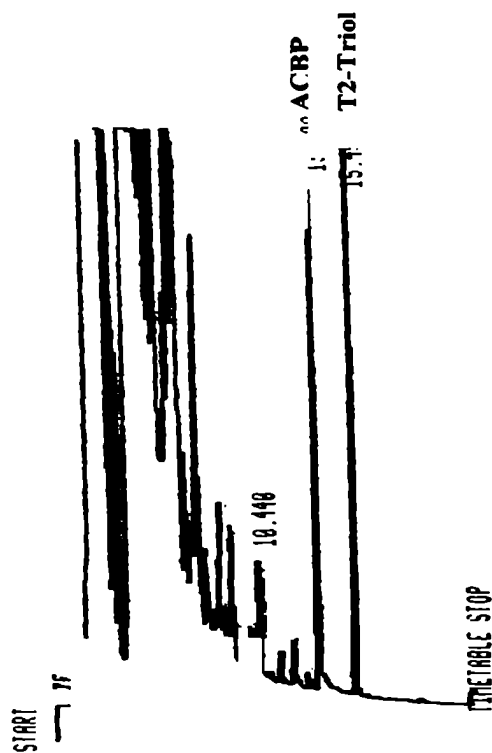
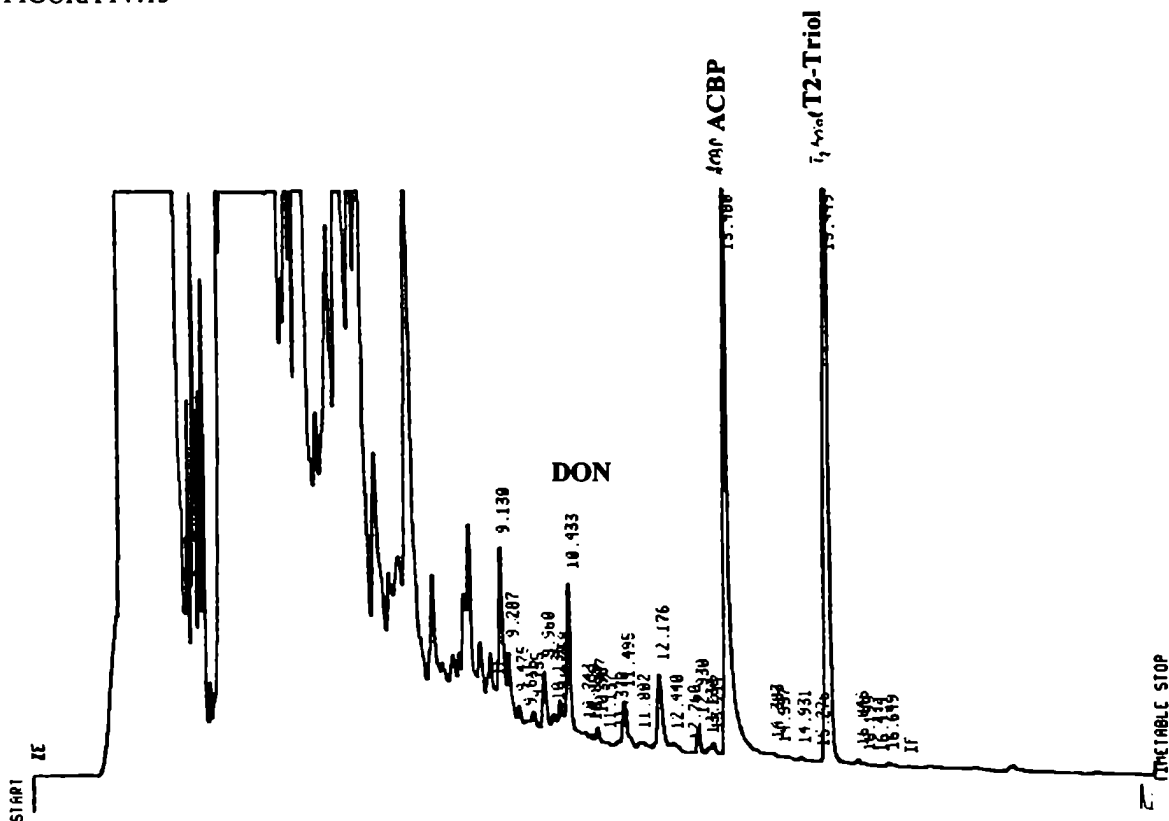


FIGURA IV.12

En la Fig. IV.13 se observa el cromatograma de la muestra No. 8 que presentó la mayor contaminación por DON. No se observaron diferencias significativas en los cromatogramas provenientes de cervezas negras o de cervezas blancas.

Para el cálculo de la concentración de DON presente en las cervezas positivas se utilizó la relación de áreas de DON y ACBP de las muestras y con la curva de calibración, se estimó la masa inyectada en "pgr de DON", equivalente a 0,5 µl de muestra inyectadas en el cromatógrafo.

FIGURA IV.13



En la TABLA IV.4 se muestra la concentración de DON encontrada en las muestras, ordenadas por marcas de cervezas y de malta.

TABLA IV.4 – Concentración de DON en las diferentes cervezas.

MARCA	SABOR	MUESTRA No.	CONCENTRACION (ng/ml)	
			RANGO	PROMEDIO
Bieckert	Africana (N)	19	ND	ND
		36	ND	ND
		41	19,1 – 20,7	19,9
	Clásica (B)	10	28,6 – 39,3	34,0
	Oro (B)	2	38,0 – 48,6	43,3
		7	18,6 – 33,0	27,7
		27	ND	ND
Brahma	Bock (N)	38	ND	ND
		43	ND	ND
		47	ND	ND
	Chopp (B)	16	ND	ND
		31	ND	ND
		46	14,3	14,3
Heineken	Lager (B)	30	ND	ND
		40	7,3 – 9,5	8,4
		45	10,1 – 11,1	10,6
Iguana	(B)	28	ND	ND

MARCA	SABOR	MUESTRA No.	CONCENTRACIÓN (ng/ml)	
			RANGO	PROMEDIO
Iguana		44	26,6 – 36,7	31,7
		48	ND	ND
Imperial	(B)	35	16,1 – 17,7	16,9
		50	ND	ND
		53	8,9 – 9,1	9,0
Isenbeck	(B)	5	20,8 – 20,9	20,8
		9	111,7 – 163,4	128,4
		20	ND	ND
	Dark (N)	14	3,5 – 5,1	4,3
		37	ND	ND
		42	14,2 – 18,7	16,4
MALTA Salta	(N)	17	ND	ND
		39	ND	ND
		49	ND	ND
Palermo	(B)	3	70,8 – 73,2	72,3
		6	23,4 – 61,4	40,9
		25	ND	ND
Quilmes	Bock (N)	12	ND	ND
		21	ND	ND
		33	ND	ND
	Cristal (B)	1	40,3	40,3

MARCA	SABOR	MUESTRA No.	CONCENTRACIÓN (ng/ml)	
			RANGO	PROMEDIO
Quilmes	Cristal (B)	8	209,2 – 229,2	221,5
		26	ND	ND
		54	6,3 – 7,4	6,9
Quilmes	Liberty (B)	11	3,0 – 6,9	5,0
		23	ND	ND
		29	ND	ND
	Light (B)	4	ND	ND
		22	ND	ND
		32	ND	ND
Schneider	(B)	15	4,6 – 5,8	5,2
		51	4,4 – 6,4	5,4
		52	ND	ND
Corona Extra	(B)	18	ND	ND
Modelo Especial	(B)	13	ND	ND
Sol	(B)	34	ND	ND
Tecate	(B)	24	ND	ND

ND: no detectado; (B): cerveza blanca; (N): cerveza negra

El valor medio de contaminación observado fue de 14,3 ng/ml. Para poder evaluar como se ubicaban estos niveles de contaminación respecto a la contaminación por DON encontrada en

otros países se resumen a continuación los trabajos más significativos de ocurrencia natural por DON en cervezas.

Trucksess y col. (1986) no hallaron DON en 14 muestras de cervezas de Estados Unidos. En Canadá se analizaron 50 muestras que incluían 17 cervezas importadas (Reino Unido, Irlanda, Francia, Holanda, Dinamarca, Alemania, Italia, Checoslovaquia, China, Japón, Nueva Zelanda, Jamaica, 2 de México y 3 de Estados Unidos), 29 fueron positivas de DON con un promedio de 5,4 ng/ml y un rango entre 0,3 a 50 ng/ml (Scott y col., 1993). En Alemania se realizaron dos estudios de ocurrencia de DON en cervezas; la primera mostró 85 positivas de 196 muestras con un promedio de 205 ng/ml (Niessen y Donhauser, 1993; Niessen y col., 1993); la segunda sólo incluyó 18 muestras que resultaron positivas de DON con un promedio de 5 ng/ml (Weddeling y col., 1994).

IV.3 – Comparación de frecuencias de contaminación en los diferentes años.

En la Fig. IV.14 se observa la frecuencia de contaminación por DON de todas las cervezas argentinas analizadas. El 56 % de las muestras no presentó contaminación.

En las restantes muestras un 26 % presentaba contaminación entre 2-20 ng/ml., un 14 % entre 20 y 50 ng/ml., un 2 % (1 muestra) entre 50 y 150 ng/ml y una muestra entre 150 y 250 ng/ml.

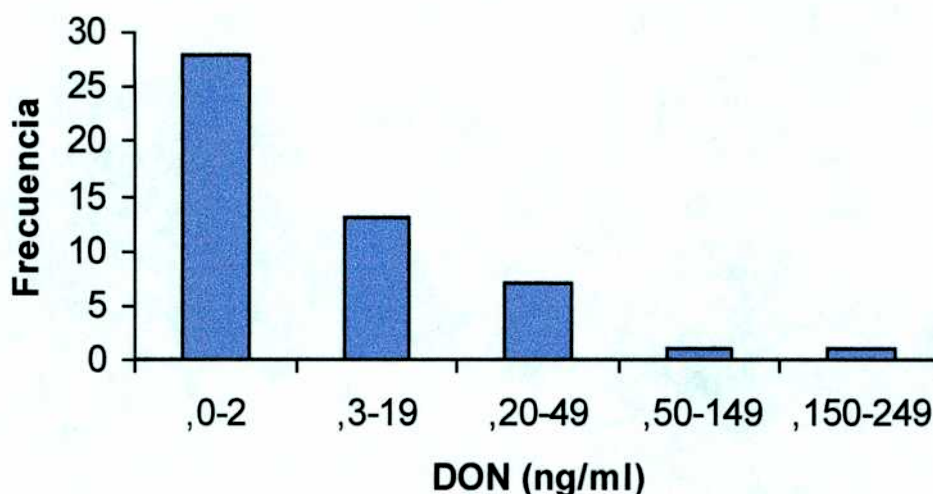


Fig. IV.14 Frecuencia de contaminación por DON

Al observar los resultados (Tabla IV.5), se observó un comportamiento diferente en las muestras provenientes de distintos años de vencimiento.

Para determinar si las diferencias eran significativas se aplicó el *test exacto de Fisher* que permite comparar frecuencias entre dos poblaciones. En este caso, se compararon las frecuencias de contaminación en dos años diferentes.

En la tabla IV.6 se presenta el número de observaciones, el número de muestras contaminadas y la frecuencia observada en cada año analizado.

TABLA IV.5 Distribución de la contaminación por DON en los distintos años

Año	Muestras (+/totales)	Media (ng/ml)	Mediana (ng/ml)	Sobre muestras (+) (ng/ml)		
				Min.	máx.	media
1997	8/9	51	16	5	221	58
1998	8/26	7	0	4	43	22
1998	6/14	5	0	5	20	12

TABLA IV.6 Frecuencia de contaminación en los distintos años

Año	n	Número de muestras contaminadas	Frecuencia observada (en %)
1997	9	7	78
1998	26	8	31
1999	14	6	43

Los resultados obtenidos al aplicar el test de Fisher están en la TABLA IV.7:

TABLA IV.7 Test de Fisher

Años	p – valor – Test de Fisher
1997 / 1998	0,02
1997 / 1999	0,20
1998 / 1999	0,50

Utilizando un nivel global aproximado de 0,05, se detecta diferencia significativa entre las frecuencias de los años 1997 y 1998 y no se detecta diferencia entre los años 1998 / 1999 y 1997 / 1999.

IV.4 – Comparación de medias de contaminación en los diferentes años.

En forma similar se decidió comparar las medias de contaminación de DON en los distintos años de acuerdo a la leyenda que figuraba en el envase “consumir antes de fecha...”

Se realizó un análisis descriptivo para estudiar la validez de las hipótesis de los tests clásicos de comparación de medias. En la Fig. IV.15, se presenta un box-plot de la variable contaminación en los diferentes años. Se observa que no es razonable sostener la hipótesis de normalidad (Conover, 1980).

Se decidió aplicar un test no paramétrico de análisis de varianza (Kruskal – Wallis) sobre los datos transformados. La transformación aplicada es el logaritmo neperiano de la contaminación de DON, al que se le suma uno para evitar indeterminaciones con las muestras negativas. Esta transformación permite homogeneizar las varianzas en los 3 años.

En la Fig. IV.16 se presenta un box-plot de la variable **ln(contaminación +1)** en los diferentes años.

Se detectaron diferencias significativas entre los años 1997, 1998 y 1999 ($p = 0,025$).

IV.5 – Análisis de la distribución de las marcas en los diferentes años.

En este análisis no se tuvo en cuenta el tipo de cerveza, solo se consideran las marcas.

En la TABLA IV.8 se presenta la distribución de las marcas en los 3 años:

Fig. IV.15: Box-plot de la contaminación por DON en los tres años

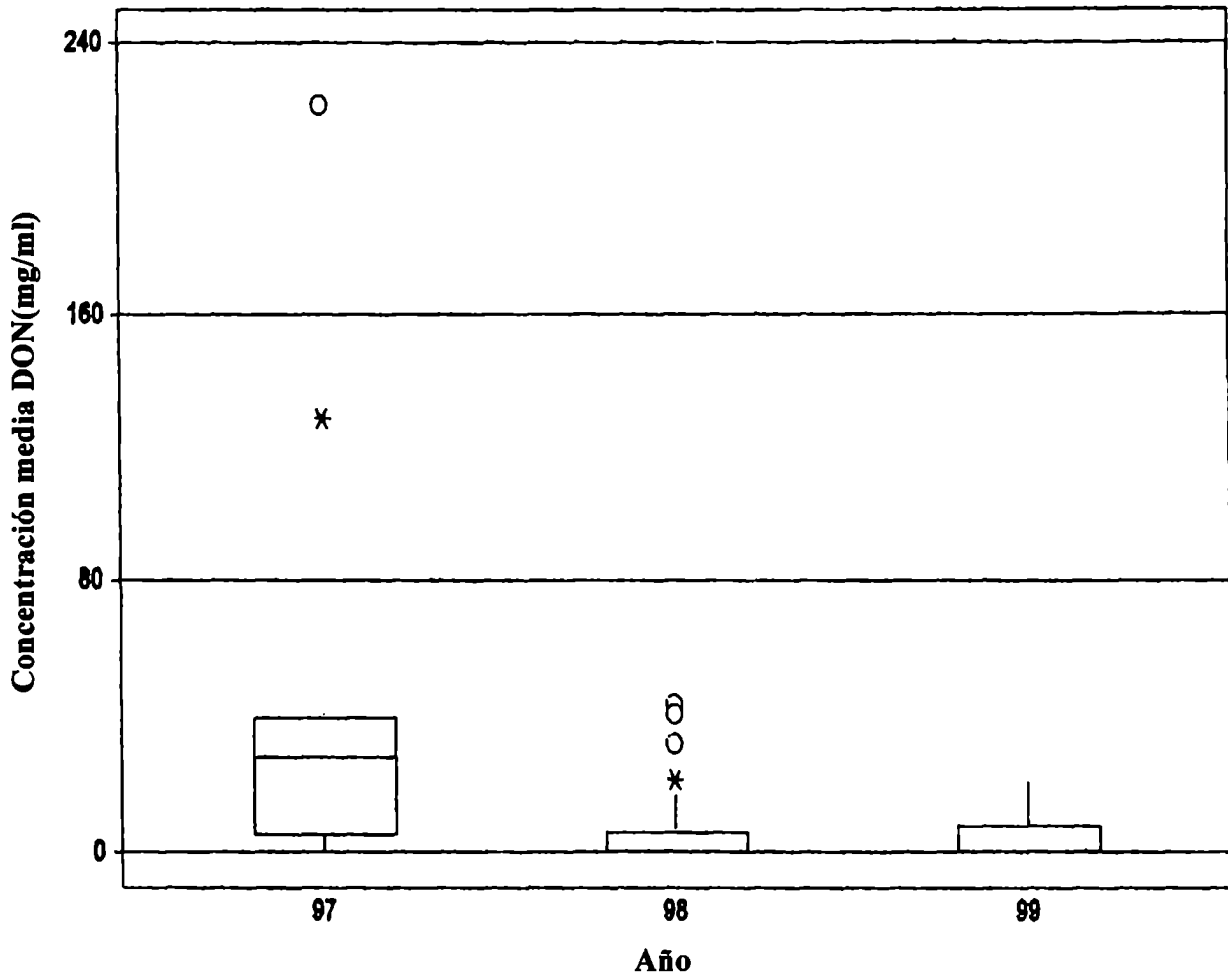


Fig. IV.16: Box-Plot del $\ln(\text{contaminación promedio} + 1)$ para todas las marcas de cerveza analizadas

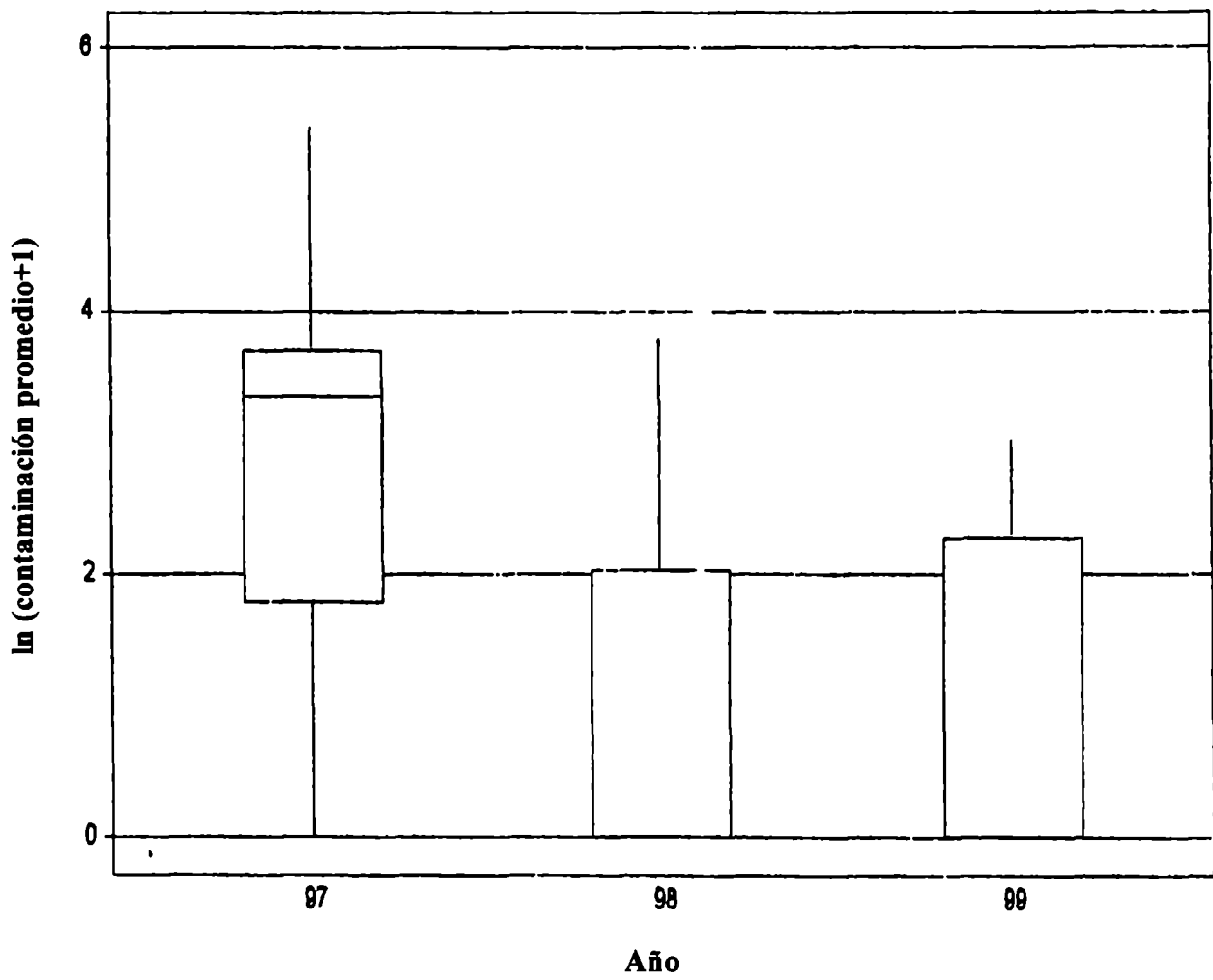


TABLA IV.8 Muestras de cerveza distribuidas por marca.

Año	Marcas								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1997	1	3	1	3	1	0	0	0	0
1998	3	8	2	2	0	3	5	2	1
1999	5	5	0	2	2	0	1	0	2

Se observa que la distribución de las marcas en los 3 años analizados no es semejante. Se decidió repetir el análisis anterior trabajando sólo con las marcas 1, 2 y 4, las únicas de las cuales se tenía información en los 3 años.

En la TABLA IV.9 se presentan los valores de las frecuencias de contaminación:

TABLA IV.9 Frecuencia de contaminación de las cervezas de las marcas 1, 2 y 4.

Año	n	Número de muestras contaminadas	Frecuencia observada (en %)
1997	7	5	71
1998	13	6	46
1999	9	3	33

Los resultados obtenidos, al aplicar el test de Fisher para comparar las frecuencias, son los siguientes, según la TABLA IV.10:

TABLA IV.10 Test de Fisher

Años	p – valor – Test de Fisher
1997 / 1998	0,37
1997 / 1999	0,31
1998 / 1999	0,67

Es decir, que ahora no se detectan diferencias significativas entre las frecuencias de contaminación correspondientes a los tres años cuando se consideran las marcas 1, 2 y 4.

Se realizó un box-plot de la variable $\ln(\text{contaminación} + 1)$ en los 3 años, que se presenta en la Fig. IV.17.

Al aplicar el test de Kruskal – Wallis, no se detectaron diferencias significativas entre los 3 años ($p = 0,14$).

IV.6 – Evaluación del riesgo por ingesta de micotoxinas.

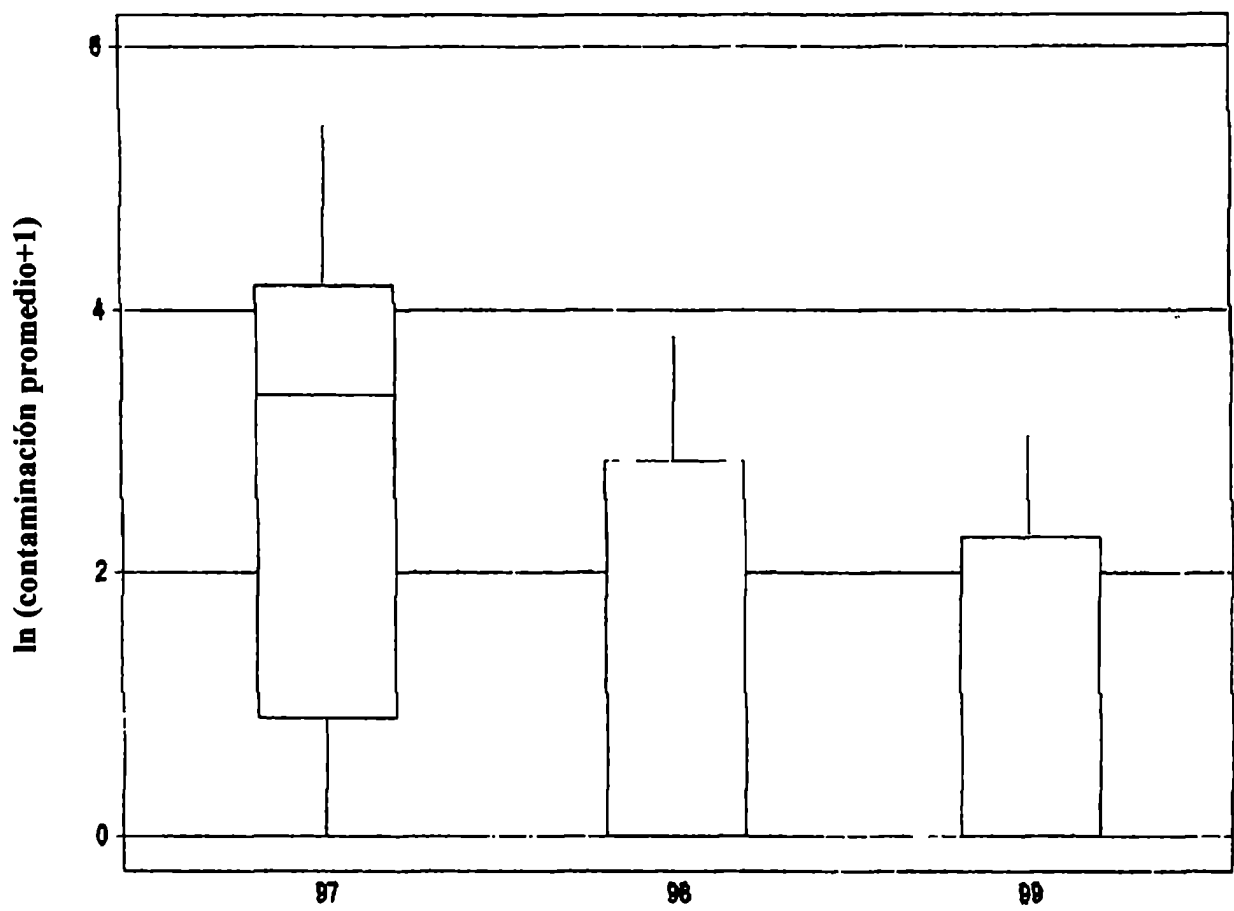
Los datos obtenidos de la encuesta en la Universidad Nacional de Luján por Pacin y col. (1998) sobre el consumo estimado de cerveza y los datos de consumo de la FAO (1991), se comparan con la ingesta diaria tolerable de DON que es de $3 \mu\text{g/Kg}$ de peso corporal para adultos (Kuiper-Goodman, 1994). Se tiene, para un consumo promedio de cerveza de $14,3 \text{ ng/ml.}$, los siguientes son los valores de contribución de consumo de esta bebida a la ingesta de DON detallados en la TABLA IV.11

TABLA IV.11 – Contribución de cerveza a la ingesta de DON.

	Universidad Nacional de Luján (1998)				FAO (1991)
	Varones		Mujeres		Adultos
	18 – 24 años	25 – 50 años	18 – 24 años	25 – 50 años	
Peso corporal medio Kg	70,3	73,9	58,9	62,5	70,0
Ingesta diaria estimada (ng/Kg)	16,4	0,9	7,3	1,3	15,6
Contribución del consumo de cerveza al IDT (3 g/Kg)	0,55 %	0,03 %	0,24 %	0,05 %	0,52 %

Pacin y col. (1998) y Moltó y col. (2000)

Fig. IV.17: \ln (contaminación promedio +1) de las marcas 1, 2 y 4



Según la tabla el consumo de cerveza por sí sola no representaría un grave riesgo para la salud humana, pues su contribución a la ingesta diaria tolerable es menor al 1 %.

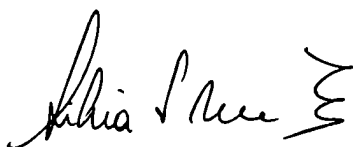
V. CONCLUSIONES

Este estudio muestra por primera vez la contaminación por tricotecenos de cervezas argentinas. De los tricotecenos analizados no se detectó nivalenol, 3-acetildeoxinivalenol, 15-acetildeoxinivalenol, neosolaniol, diacetoxiscirpenol, T-2 triol, T-2 tetraol, toxina HT-2 y toxina T-2. El único tricoteceno hallado en cervezas producidas en Argentina es el deoxinivalenol. Las pocas muestras de cervezas importadas analizadas, que se consumen en el país, no presentaron contaminación por tricotecenos.

Es necesario realizar estudios de ocurrencia de DON frecuentemente en cervezas comerciales en orden de desarrollar estrategias para mantener o inclusive disminuir los bajos niveles de contaminación hallados.

Los valores de ingesta de deoxinivalenol a través de la cerveza consumida no superan el 0,55 % de la ingesta diaria tolerable.

Se debería continuar el estudio utilizando un diseño y tamaños de muestras adecuados que permitan estudiar el nivel y frecuencia de contaminación de acuerdo a diversos factores como ser si las cervezas son de cebada o se les ha agregado cereales adjuntos, si existe interacciones entre las marcas de las cervezas y el año o entre tipos de cervezas.



Dra. Silvia Liliana Resnik



Lic. Gustavo Alvaro Moltó

VI. BIBLIOGRAFÍA.

- ABOUZIED, M.; AZCONA, J.; BRASELTON, W. and PRESTKA, J. (1991). Immunochemical assessment of mycotoxins in 1989 grains food: evidence for deoxynivalenol (vomitoxin) contamination. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 57, pp. 672.
- ALAFACE (1995). *La Industria Cervecera en América Latina*. Editorial ALAFACE, Caracas, Venezuela, págs. 10 – 25.
- ALBERTS, J.; GELDERBLOM, W.; THIEL, P.; MARASAS, W.; van SCHALKWYK, D. and BEHREND, Y. (1990). Effects of temperature and incubation period on production of fumonisin B1 by *Fusarium moniliforme*. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 56, pp. 1729 – 1733.
- ALOZIE, T.; ROTIMI, C. and OYIBO, B. (1980). Citado por Scott (1996). *Mycopathologia*, vol.70, pp. 125 – 128.
- A.O.A.C. (1995), Association of Official of the Analytical Chemists International, 16 th. Ed., Patricia Cunniff (ed.), published by AOAC Int., Arlington, Virginia, U.S.A. *Natural Toxins*, P.Scott (chapter ed.), chap. 49.
- BAKER, J. *Bakerbond spe. Columns instructions*. Division of Mallinckrodt Baker Inc. Phillipsburg, NJ, USA.
- BATA, A.; SARUDI, I. and ORMAI–CSERTHALMI, Z. (1981). Citado por Scott (1996). *Acta Alimentaria*, vol. 10, pp. 162 – 163.
- BAYLISS, M.; HOMER, R. and SHEPHERD, M. (1988). Anthracene–9–carbonyl chloride as a fluorescence and ultraviolet derivatizing reagent for the high–performance liquid chromatographic analysis of hydroxid compounds. *Journal of Chromatography*, 393 – 402.

- BEATTIE, S.; SCHWARZ, P.; HORSLEY, R.; BARR, J. and CASPER, H. (1998). The effect of grain storage conditions on the viability of *Fusarium* and deoxynivalenol production in infested malting barley. *Journal of Food Protection*, vol. 61, No. 1, pp. 103 – 106.
- BELITZ, H. and GROSCH, W. (1988). *Bebidas alcohólicas: cerveza. Química de los Alimentos*. Editorial Acribia S.A., Zaragoza, España. capítulo 20, págs. 705 – 717.
- BENNETT, G.; LAGODA, A.; SHOTWELL, O. and HESSELTINE, C. (1981). *Journal of the American of Oil Chemistry Society*, vol. 58, pp. 974 – 976.
- BENNETT, G. and RICHARD, J. (1994). *Fate and distribution of Fusarium mycotoxins during processing of contaminated grains*. Proceedings of Distillers feed Research Conference, New Orleans, L.A., U.S.A., pp. 23 – 29.
- BENNETT, G.; RICHARD, J. and ECKHHOFF, S. (1995). Abstracts International Seminary on *Fusarium: Mycotoxins, Taxonomy and Pathogenicity*, May 9 – 13, Martina Franca, Italy, pp. 45.
- BENNETT, G.; RICHARD, J. and ECKHOFT, R. (1996). *Distribution of fumonisins in food and feed products prepared from contaminated corn*. Proceedings of an American Chemical Society Symposium on Fumonisin in Food, April 2 – 7, Anaheim, California, U.S.A. Plenum Press, New York, chapter 27, pp. 317 – 322.
- BENNETT, G. and SHOTWELL, O. (1990). Criteria for determination purity of *Fusarium* mycotoxins. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, vol. 73, No. 2, pp. 270 – 275.
- BETINA, V. (1989). Review: chromatographic methods as tools in the field of mycotoxins. *Journal of Chromatography*, vol. 477, pp. 187.

- BLACK, R.; RAYMOND, J. and READ, R. (1986). Detection of trace levels of trichothecene mycotoxins in human urine by gas chromatography – mass spectrometry. *Journal of Chromatography*, **367**, pp. 103 – 115.
- BÖSWALD, C.; ENGELHARDT, G.; VOGEL, H. and WALLNÖFER, P. (1995). Metabolism of the *Fusarium* mycotoxins zearalenone and deoxynivalenol by yeast strains of technological relevance. *Natural Toxins*, vol. **3**, No. 3, pp. 138 – 144.
- BOTHAST, R.; BENNET, G.; VANCAUWENBERGE, J. and RICHARD, J. (1992). Citado por Scott (1996). *Applied and Environmental Microbiology*, vol. **58**, pp. 233 – 236.
- BULLERMAN, L. and TSAI, W. (1994). Incidence and levels of *Fusarium moniliforme*, *Fusarium proliferatum* and fumonisins in corn and corn-based and feeds. *Journal of Food Protection*, vol. **57**, pp. 541 – 546.
- C.A.A. (1998), CODIGO ALIMENTARIO ARGENTINO ACTUALIZADO, De la Canal & Asociados S.R.L. *Bebidas Fermentadas*, capítulo XIII, artículos 1080 – 1083, págs. 357 – 359.
- CAMARA ARGENTINA de DESTILADORES LICORISTAS (1999). Informe semestral.
- C.I.C.A. (1999), CÁMARA de la INDUSTRIA CERVECERA ARGENTINA. Datos Estadísticos (informe), págs. 1 – 15.
- CANALES, A. (1979). Citado por Scott (1996). *Brewing Science*, vol. **1**, J.R.A. Pollock (ed.), Academic Press, London, UK, pp. 237 – 278.
- CERUTTI, G.; VECCHIO, A.; FINOLI, C. and TREZZI, A. (1987). Citado por Scott (1996). *Monatsschrift für Brauwissenschaft*, vol. **40**, pp. 455 – 457.
- CERVEZA (1999). <http://www.geocities.com/NapaValley/3246/cerv01.html>

- COHEN, H. and LAPOINTE, M. (1984). Capillary gas chromatographic determination of T-2 toxin, HT-2 toxin, and diacetoxyscirpenol in cereals grains. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, vol. 67, pp. 1105 – 1107.
- COLE, R. and COX, R. (1981). *Handbook of toxic fungal metabolites*. Academic Press (ed.). Printed in U.S.A., chapter 5, pp. 152 – 263.
- COLE, R.; DONER, J.; COX, R. and RAYMOND, L. (1983). Two classes of alkaloids mycotoxins produced by *Penicillium crustosum* Thom isolated from contaminated beer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 3, No. 3, pp. 655 – 657.
- CONOVER, W. (1980). *Practical non Parametric Statistics*, John Wiley & Sons, New York, NY, USA.
- COOK, P. and COLLIS, C. (1972). Citado por Scott (1996). *Lancet.*, No. 7758, pp. 1014.
- CROTEAU, S.; PRELUSKY, D. and LOCKSLEY TRENHOLM, H. (1994). Analysis of trichothecene mycotoxins by gas chromatography with electron capture detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 42, No. 4, pp. 928 – 933.
- CHILDRESS, W.; KRULL, I. And SELAVKA, C. (1990). Determination of deoxynivalenol (DON, vomitoxin) in wheat by high performance liquid chromatography with photolysis and electrochemical detection. *Journal of Chromatography Science*, vol. 28, pp. 76 – 82.
- CHU, F. (1990). Immunoassays for mycotoxins: current state of the art, commercial and epidemiological applications. *Veterinary and Human Toxicology*, vol. 32 (suppl.), pp. 42 – 50.

- CHU, F.; CHANG, C.; ASHOOR, S. and PRENTICE, N. (1975). Stability of aflatoxin B1 and ochratoxin A in brewing. *Applied Microbiology*, vol. **29**, No. 3, pp. 313 – 316.
- DAM, R.; TAM, S. and SATTERLEE, L. (1977). Citado por Scott (1996). *Cereal Chemistry*, vol. **54**, pp. 705 – 712.
- DERACHE, R. (1990). *Toxicología y Seguridad de los Alimentos: los Tricotecenos*. Ediciones Omega S.A., Barcelona, España; cap. **9**, págs. 185 – 186.
- EL-BANNA, A. (1987). Stability of citrinin and deoxynivalenol during germination process of barley. *Mycotoxin Research*, vol. **3**, No. 1, pp. 37 – 41.
- EL-BANNA, A. and SCOTT, P. (1984). Fate of mycotoxins during processing of foodstuffs. III. Ochratoxin A during cooking of faba beans (*Vicia faba*) and polished wheat. *Journal of Food Protection*, vol. **47**, No. 3, pp. 189 – 192.
- EL-DESSOUKI, S. (1992). Citado por Scott (1996). *Deutsche Lebensmittel Rundschau*, vol. **88**, pp. 354 - 355.
- EL-SHARKAWY, S. and ABUL-HAJJ, Y. (1988). Microbial transformation of zearalenone. 2. Reduction, hydroxylation, and methylation products. *Journal of the Organic Chemistry*, vol. **53**, pp. 515 – 519.
- EPPLEY, R.; TRUCKSESS, M.; NEISHEM, S.; THORPE, C. and POHLAND, A. (1986). Thin layer chromatographic method for determination of deoxynivalenol in wheat. Collaborative study. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, vol. **69**, pp. 37 – 40.
- FAO, (1991). *Food balance sheets 1984 – 1986 average*. Basic Data Unit, Statistics Division. FAO, 00100 Rome, Italy, ISBN 92 – 5 – 003032 – 0.
- FISCHBACH, H. and RODRICKS, J. (1973). Citado por Scott (1996). *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, vol. **56**, pp. 767 – 770.

- FLANNIGAN, B. (1986). Mycotoxins and the fermentation industries. *Int. Biodeterior.*, 22 Suppl., pp. 109 – 114.
- FLANNIGAN, B. (1987), *Brewing Microbiology*, F.G. Priest & I. Campbell (eds.), Elsevier Applied Science, London, UK, pp. 83 – 120.
- FLANNIGAN, B. (1989), *Biodeterioration Research 2*, C.E. O’Rear & G.C. Llwellyn (eds.), Plenum Press, New York, NY, pp. 191 – 200.
- FLANNIGAN, B.; DAY, P. and Mc FARLANE, G. (1984). Growth of mycotoxin producing fungi associated with malting of barley. *Toxigenic Fungi—Their Toxins and Health Hazard*, edited by H. Kurata and Y. Ueno (Tokyo: Kodansha; Amsterdam: Elsevier); pp. 52 – 60.
- FLANNIGAN, B.; MORTON, J. and NAYLOR, R. (1985), *Trichothecenes and other Mycotoxins*, J. Lacey (ed.), John Wiley & Sons Ltd., Chichester, UK, pp. 171 – 184.
- FLANNIGAN, B.; MORTON, J. and NAYLOR, R. (1985). *Fusarium* mycotoxins and the malting of barley. *Trich. and Mycotox.*, No. 17, pp. 171 – 184.
- FUKAL, L.; PROSEK, J. and RAKOSOVA, A. (1990). Citado por Scott (1996). *Monatsschrift für Brauwissenschaft*, vol. 43, pp. 212 – 215.
- FURLONG, E. and VALENTE SOARES, L. (1995). Gas chromatographic method for quantitation and confirmation of trichothecenes in wheat. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists International*, vol. 78, pp. 386.
- GALEA, V. and BARA, A. (1976). Citado por Scott (1996). *Igiena*, vol. 25, pp. 123 – 128.
- GALLO, A.; BOURDIGNON, F.; PACIN, A.; BARBIERI, T. and RESNIK, S. (1992). Evaluation of food intake by means of 24 hours dietary recall in a town of the Province of Buenos Aires, Argentina. *Ecology of Food Nutrition*, vol. 28, pp. 299 – 317.

- GAREIS, M.; BAUER, J.; ENDERS, C. and GEDEK, B. (1989). Contamination of cereals and feed with *Fusarium* mycotoxins in European countries. *Fusarium, Taxonomy and Pathogenicity*, edited by J. Chelkowski (Amsterdam, Elsevier), pp. 441 – 472.
- GILBERT, J. (edit., 1996). *Progress in food contaminant analysis*. Blackie Academic & Professional, Chapman & Hall, Bristol, Great Britain, chapter 3, pp. 65 – 146.
- GILBERT, J.; SHEPHERD, M. and STARTIN, J. (1983). A survey of the occurrence of the trichothecene mycotoxin deoxynivalenol in UK barley and in imported maize by combined gas chromatography – mass spectrometry. *Journal of the Science of Food Agriculture*, vol. 34, pp. 86 – 92.
- GILBERT, J.; STARTIN, J. and CREWS, C. (1985). Optimization of conditions for the trimethylsilylation of trichothecene mycotoxins. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists International*, vol. 77, pp. 525.
- GJERTSEN, P.; MYKEN, F.; KROGH, P. and HALD, B. (1973), Proceedings of the 14 th. Congress of the European Brewery Convention, Salzburg, Austria. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, pp. 373 – 380.
- GLENN, A. and RICHARD, J. (1994). Fate and distribution of *Fusarium* mycotoxins during processing of contaminated grains. *Mycotoxin Research, National Center for Agricultural Utilization Research, USDA*.
- GONZALEZ, H.; PACIN, A.; RESNIK, S. and MARTINEZ, E. (1997). Deoxynivalenol and contaminant mycoflora in freshly harvested Argentinean wheat in 1993. *Mycopathologia*, vol. 135, pp. 129 – 134.
- GROVE, J. (1988). Non-macrocyclic trichothecenes. *Natural Products Reports*, pp. 187.

- HAIKARA, A. (1983). Proceedings of the European Brewery Convention Congress, vol. 19, pp. 401 – 408.
- HARDWICK, W. (1979), *Fermented Food Beverage in Nutrition*, C.F. Gastineau, W.J. Darby & T.B. Turner (eds.).
- HART, F. and FISHER, H. (1977). *Análisis Moderno de los Alimentos*. Editorial Acribia S.A., Zaragoza, España; cap. 2, pág. 34.
- HARWIG, J.; BLANCHFIELD, B. and JARVIS, G. (1977). Effect of water activity on disappearance of patulin and citrinin from grains. *Journal of Food Science*, vol. 42, pp. 1225 – 1228.
- HARWIG, J.; SCOTT, P.; KENNEDY, B. and CHEN, Y. (1973). *Canadian of the Institute of Food Science Technology*, vol. 6, pp. 45 – 46.
- HASTINGS, D. and STENROOS, L. (1993). Determination of deoxynivalenol in barley, malt and beer by gas chromatography – mass spectrometry. *Journal of the American Society Brewing Chemistry*, vol. 53, pp. 78.
- HASTINGS, D. and STENROOS, L. (1995). Determination of deoxynivalenol in barley, and beer by gas chromatography–mass spectrometry *Journal of the American Society Brewing Chemistry*, vol. 53, No.2, pp. 78 – 81.
- HEALTH CANADA, HEALTH PROTECTION BRANCH, (1993). Determination of nivalenol, deoxynivalenol (DON, vomitoxin), T-2 toxin, HT-2 toxin, diacetoxyscirpenol, and monoacetoxyscirpenol in cereals by gas chromatography with electron capture detection. *Laboratories Bulletin, WPG – LB*, No. 13, pp. 1 – 13.
- HLYWKA, J. and BULLERMAN, L. (1999). Occurrence of fumonisin B1 and B2 in beer. *Food Additives and Contaminants*, vol. 6, pp. 319 – 324.
- HOSENEY, R. (1994). Citado por Scott (1996). *Cereal Foods World*, vol. 39, pp. 675 – 679.

- HOUGH, H. (1990). *Biotecnología de la cerveza y de la malta*. Editorial Acribia S.A., Zaragoza, España.
- INDEC (1999a), INSTITUTO NACIONAL de ESTADÍSTICAS y CENSOS. Revista: *Estadísticas de Productos Industriales*, Septiembre 1999, págs. 12 – 13.
- INDEC (1999b), INSTITUTO NACIONAL de ESTADÍSTICAS y CENSOS. Datos Estadísticos, <http://www.indec.mecon.ar/>.
- INV (1999), INSTITUTO NACIONAL de VITIVINICULTURA. Despachos de vino autorizado para consumo, Julio 1999.
- JELINEK, C. (1987). Distribution of mycotoxins. An analysis of worldwide commodities data, including data from FAO / WHO / UNEP food contamination monitoring programme. Joint FAO / WHO / UNEP Second International Conference on Mycotoxins. Bangkok, Thailand.
- JENKINS, R. (1994). Citado por Scott (1996). *Brew. Dist. Int.*, November, pp. 18 – 19.
- JIAO, Y.; BLAAS, W.; RÜHL, C. and WEBER, R. (1994). Citado por Scott (1996). *Deutsche Lebensmittel Rundschau*, vol. 90, pp. 318 – 321.
- JORGENSEN, K. (1998). Survey of pork, poultry, coffee, beer and pulses for Ochratoxin A. *Food Additives and Contaminants*, vol. 15, No. 5, pp. 550 – 554.
- KAMIMURA, H.; NISHIJIMA, M.; SAITO, K.; YASUDA, K.; IBE, A.; NAGAYAMA, T.; USHIYAMA, H. and NAOI, Y. (1979). *Journal of the Food of Hygienic Society Japan*, vol. 20, pp. 352 – 357.
- KANHERE, S. and SCOTT, P. (1990). Heptafluorobutyration of trichothecenes using a solid – phase catalyst. *Journal of Chromatography*, vol. 511, pp. 384.

- KIM, J.; KANG, H.; LEE, D.; LEE, Y. and YOSHIZAWA, T. (1993). Natural occurrence of *Fusarium* mycotoxins (trichothecenes and zearalenone) in barley and corn in Korea. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 59, pp. 3798.
- KOSTIAINEN, R. (1991). Identification of trichothecenes by thermospray, plasma-spray, and dynamic fast-atom bombardment liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography*, vol. 562, pp. 555.
- KOSTIAINEN, R.; MATSUURA, K. and NOJIMA, K. (1991). Identification of trichothecenes by frit- and fast-atom bombardment liquid chromatography-high resolution mass spectrometry. *Journal of Chromatography*, vol. 538, pp. 323.
- KRISHNAMURTY, T.; WASSERMAN, M. and SARVER, E. (1986). Mass spectral investigations on trichothecene mycotoxins. *Biomedical Environmental Mass Spectrometry*, vol. 13, pp. 503.
- KROGH, P.; HALD, B.; GJERTSEN, P. and MYKEN, F. (1974). Fate of ochratoxin A in citrinin during malting and brewing experiments. *Applied Microbiology*, vol. 28, No. 1, pp. 31 – 34.
- KUIPER-GOODMAN, T. (1994). Prevention of human mycotoxicosis through risk assessment and risk management, in “*Mycotoxin in grains*” edited by Miller and Trenholm, pp. 439 – 469.
- KURODA, H.; MORI, T.; NISHIOKA, C.; OKASAKI, H. and TAKAGI, M. (1979). Studies on gas chromatographic determination of trichothecene mycotoxins in food. *Journal of Food of the Hygienic Society of Japan*, vol. 20, pp. 137 – 142.
- KURONEN, P. (1989). High-performance liquid chromatographic screening method for mycotoxins using new retention indexes and diode array detection. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 18, pp. 336 – 348.

- LACICOWA, B. and KIECANA, I. (1991). Fusariosis of spring barley cultivated in Lublin region. *Mycotoxin Research*, vol. 7 A, part II, pp. 128 – 135.
- LANGSETH, W. and CLASEN, P. (1992). Automation of a cleanup procedure for determination of trichothecenes in cereals using a charcoal–alumina column. *Journal of Chromatography*, vol. 603, pp. 290.
- LAUREN, D. and AGNEW, M. (1991). Multitoxin screening method for *Fusarium* mycotoxins in grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 9, pp. 502 – 507.
- LAUREN, D. and GREENHALGH, R. (1987). Simultaneous analysis of nivalenol and deoxynivalenol in cereals by liquid chromatography. *Journal of the Association of Official Chemists*, vol. 70, pp. 479 – 483.
- LEE, U.; JANG, H.; TANAKA, T.; HASEGAWA, A.; OH, Y.; CHO, C.; SUGIURA, Y. and UENO, Y. (1986). Further survey on the *Fusarium* mycotoxins in Korean cereals. *Food Additives and Contaminants*, vol. 3, No. 3, pp. 253 – 261.
- LEE, U.; JANG, H.; TANAKA, T.; HASEGAWA, A.; OH, Y. and UENO, Y. (1985). The coexistence of the *Fusarium* mycotoxins nivalenol, deoxynivalenol and zearalenone in Korean cereals harvested in 1983. *Food Additives and Contaminants*, vol. 2, No. 3, pp. 185 – 192.
- LEE, U.; LEE, Y.; PARK, W. and UENO, Y. (1992). Decontamination of *Fusarium* mycotoxins, nivalenol, deoxynivalenol and zearalenone in barley by the polishing process. *Mycotoxin Research*, vol. 8, pp. 31 – 36.
- LEWIS, M. and YOUNG, T. (1996). *Brewing*. Chapman and Hall (edit.); London, U.K.
- LILLEHOJ, E.; LAGODA, A. and MAISCH, W. (1978). Citado por Scott (1996). *Canadian of the Journal of Microbiology*, vol. 25, pp. 911 – 914.

- LOVELACE, C. and NYATHI, C. (1977). Estimation of the fungal toxins, zearalenone and aflatoxin, contaminating opaque maize beer in Zambia. *Journal of the Science of Food Agricultural*, vol. 28, No. 3, pp. 288 – 292.
- LUO, Y.; ZHENG, J. and YANG, J. (1989). Simultaneous analysis of eight *Fusarium* mycotoxins by gas chromatography. *Environmental Chemistry*, vol. 8, No. 6, pp. 27 – 31.
- LUO, Y.; YOSHIZAWA, T. and KATAYAMA, T. (1990). Comparative study on the natural occurrence of *Fusarium* mycotoxins (trichothecenes and zearalenone) in corn and wheat from high- and low-risk areas for human esophageal cancer in China. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 56, pp. 3723.
- MADHYASTHA, S.; MARQUARDT, R.; FROHLICH, A.; PLATFORD, G. and ABRAMSON, D. (1990). Effects of different cereal and oilseed substrates on the growth and production of toxins by *Aspergillus alutaceus* and *Penicillium verrucosum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 38, No. 7, pp. 1506 – 1510.
- MAJERUS, P. and WOLLER, R. (1983). Zur mykotoxin-situation bei bier. *Monatsschrift für Brauwissenschaft*, vol. 36, No. 8, pp. 335 – 336.
- MAJERUS, P.; CUTKA, I.; DREYER, A.; EL-DESSOUKI, S.; EYRICH, W.; REUSCH, H.; SCHURER, B. and WAIBLINGER, H. (1993). Citado por Scott (1996). *Deutsche Lebensmittel Rundschau*, vol. 89, pp. 112 – 114.
- MANN, R. and REHM, H. (1977). Citado por Scott (1996). *Zeitschrift Lebensmittel für Untersuchung und Forschung*, vol. 163, pp. 39 – 43.
- MANNIO, M. and ENARI, T. (1973). Citado por Scott (1996). *Monatsschrift für Brauwissenschaft*, vol. 26, pp. 134 – 137.

- MARTIN, P. and KEEN, P. (1978). The occurrence of zearalenone in raw and fermented products from Swaziland and Lesotho. *Sabouraudia*, vol. 16, No.1, pp. 15 – 22.
- MATSUURA, Y. and YOSHIZAWA, T. (1985). Citado por Scott (1996). *Journal of the Hygienic of Society Japan*, vol. 26, pp. 24 – 28.
- MAYCOCK, R. and UTLEY, D. (1985). Analysis of some trichothecene mycotoxins by liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, vol. 347, pp. 429 – 433.
- MINISTRY of AGRICULTURE, FISHERIES and FOOD (1987). *Mycotoxins*, Her Majesty's Stationery Office, London, UK, pp. 17.
- MÖLLER, T. and GUSTAVSSON, H. (1992). Determination of type A and B trichothecenes in cereals by gas chromatography with electron capture detection. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists International*, vol. 75, pp. 1049 - 1053.
- MOLTO, G.; SAMAR, M.; RESNIK, S.; MARTINEZ, E. and PACIN, A. (2000). Occurrence of trichothecenes in Argentinean beer. A preliminary exposure assessment. *Food additives and Contaminants* (aceptado para su publicación).
- MONTES, A. (1981). *Bromatología*. Editorial EUDEBA, Argentina, tomo II, capítulo IV, págs. 487 – 496.
- MUÑOZ, L.; CARDELLE, M.; PEREIRO, M. and RIGUERA, R. (1990). Occurrence of corn mycotoxins in Galicia (Northwest of Spain). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 38, pp. 1004.
- NAGODAWITHANA, T. (1991), *Handbook of Applied Micology*, vol. 3 : Foods and Feeds. D.K. Arora, K.G. Mukerji & E.H. Marth (eds.), Marcel Dekker Inc., New York, NY, USA, pp. 553 – 603.

- NEIRA, M.; PACIN, A; MARTINEZ, E.; MOLTO, G. and RESNIK, S. (1997). The effect of bakery processing on natural deoxynivalenol contamination. *International Journal of Food Microbiology*, vol. 37, pp. 21 – 25.
- NIESSEN, L.; BÖHM-SCHRAML, M.; VOGEL, H. and DONHAUSER, S. (1993). Deoxynivalenol in commercial beer—screening for the toxin with an indirect competitive ELISA. *Mycotoxin Research*, vol. 9, pp. 99 – 109.
- NIESSEN, L. and DONHAUSER, S. (1993). *Occurrence and Significance of Mycotoxins*. K. Scudamore (ed.), Central Science Laboratory, Slough, UK, pp. 203 – 207.
- NIP, W.; CHANG, F.; CHU, F. and PRENTICE, N. (1975). Fate of ochratoxin A in brewing. *Applied Microbiology*, vol. 30, No. 6, pp. 1048 – 1049.
- OBASI, O.; OGBADU, G. and UKOHA, A. (1987). Citado por Scott (1996). *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, vol. 81, pp. 879.
- OKOYE, Z. (1986a). Carryover of aflatoxin B1 in contaminated substrate corn into Nigerian native beer. *Bulletin of the Environmental Contaminant and Toxicology*, vol. 37, No. 4, pp. 482 – 489.
- OKOYE, Z. (1986b). Citado por Scott (1996). *Journal of Food Safety*, vol. 7, pp. 233 – 239.
- OKOYE, Z. (1987). Stability of zearalenone in naturally contaminated corn during Nigerian traditional brewing. *Food Additives and Contaminants*, vol. 4, No. 1, pp. 57 – 59.
- OKOYE, Z. and EKPENYONG, K. (1984). Aflatoxin B1 in native millet beer brewed in Jos suburbs. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, vol. 78, No. 3, pp. 417 – 418.
- ONO, H.; SEO, T.; CHO, E.; NAGAKAWA, T.; TOMITA, M.; TSUBOI, S. and IWAMURA, N. (1982). Citado por Scott (1996). *ICMR Ann.*, vol. 2, pp. 127 – 134.

- ORIGENES de la CERVEZA (2000). [http:// www.cerveceria.com.gt/origenes.htm](http://www.cerveceria.com.gt/origenes.htm)
- PACIN, A. (1988). Micotoxicosis por tricotecenos en la población humana: un problema de actualidad. *Revista del Hospital de Niños*, vol. 7, págs. 45 – 51.
- PACIN, A. (1990). Micotoxicosis por Ocratoxina A. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, vol. 4, págs. 385 – 399.
- PACIN, A. (1992). *Las micotoxinas como factor de riesgo en la salud humana*. Seminario Internacional sobre Micotoxinas, editado por la Asociación Colombiana de Postcosecha de Granos (Colombia: IDEMA), págs. 87 – 108.
- PACIN, A.; MARTINEZ, E.; de PORTELA, M. y NEIRA, S. (1998). Consumo de alimentos en la población de la Universidad Nacional de Luján. Aporte energético y proteico. *La Alimentación Latinoamericana*, No. 221, págs. 28 – 36.
- PACIN, A.; MARTINEZ, E.; de PORTELA, M. y NEIRA, S. (1999). Consumo de alimentos e ingesta de algunos nutrientes en la población de la Universidad Nacional de Luján, Argentina. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, vol. 49, págs. 31 – 39.
- PACIN, A; RESNIK, S.; NEIRA, M. and MOLTO, G. (1997). Natural occurrence of deoxynivalenol in wheat, wheat flour and breadmaking products in Argentina. *Food Additives and Contaminants*, vol. 14, pp. 327 – 331.
- PAYEN, J.; GIRARD, T.; GAILLARDIN, M. and LAFONT, P. (1983). Citado por Scott (1996). *Microbiologie et Alimentaire Nutrition*, vol.1, pp. 143 – 146.
- PEERS, F. and LINSELL, C. (1973). Dietary aflatoxins and liver cancer a population based study in Kenya. *Br. J. Cancer.*, vol. 27, No. 6, pp. 473 – 484.
- PERKOWSKI, J.; JELEN, H.; KIECANA, I. and GOLINSKI, P. (1997). Natural contamination of spring barley with group A trichothecene mycotoxins in south-eastern Poland. *Food Additives and Contaminants*, vol. 4, No. 4, pp. 321 – 325.

- POTTER, N. and HOTCHKISS, J. (1999). *Ciencia de los Alimentos. Cerveza*. Editorial Acribia S.A., Zaragoza, España. Capítulo 19, págs. 486 – 492.
- PRELUSKY, D. and TRENHOLM, H. (1991). Tissue distribution of deoxynivalenol in swine dosed intravenously. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 39, pp. 748.
- PUTNAM, M. and BINKERD, K. (1992). Comparison of a commercial ELISA kit and TLC for detection of deoxynivalenol in wheat. *Plant Dis*, vol. 76, pp. 1078.
- QUIROGA, N.; RESNIK, S.; PACIN, A.; MARTINEZ, E.; PAGANO, A.; RICCOBENE, I. and NEIRA, M. (1995). Natural occurrence of trichothecenes and zearalenone in Argentinean wheat. *Food Control*, vol. 6, No. 4, pp. 201 – 204.
- RAJAKYLÄ, E.; LAASASENAHO, K. and SAKKERS, P. (1998). Determination of mycotoxins in grains by high-performance liquid chromatography and thermospray liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography*, vol. 384, pp. 391.
- RAMAKRISHNA, Y.; BHAT, R. and VASANTHI, S. (1990). Natural occurrence of mycotoxins in staple foods in India. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 38, pp. 1857.
- RESNIK, S. (1998). Situación del problema de las micotoxinas en la República Argentina. Seminario Latinoamericano y del Caribe sobre Micotoxinas. Buenos Aires, SECyT, Argentina.
- RESNIK S.; COSTARRICA, M. and PACIN, A. (1995). Mycotoxins in Latin America and the Caribbean. *Food Control*, vol. 6, No. 1, pp. 19 – 28.
- RICHARDSON, K. HAGLER, W. and MIROCHA, C. (1985). Production of zearalenone, alpha- and beta-zearalenol, and alpha- and beta-zearalanol by

Fusarium spp. In rice culture. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 33, pp. 862 – 866.

- RIZZO, A.; SAARI, L. and LINDFOR, E. (1986). Derivatization of trichothecenes and water treatment of their trimethylsilylation ethers in an anhydrous apolar solvent. *Journal of Chromatography*, vol. 368, pp.381.
- ROMER, T. (1986). Use of small charcoal / alumina cleanup columns in determination of trichothecene mycotoxins in food and feeds. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, vol. 69, pp. 699 – 703.
- ROMER, T.; BOLING, T. and MAC DONALD, J. (1978). Gas-liquid chromatography determination of T-2 toxin and diacetoxyscirpenol in corn and mixed feeds. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, vol. 61, pp. 801 – 808.
- ROMER LABS., INC., MYCOTOXIN CONTROL CONSULTANTS (1995). *Gas-chromatographic method for trichothecenes. Method # GC-2001, version 94.2.* Method obtained from Ontario Ministry of Agriculture, Food, and Rural Affairs. Pesticide and Trace Contaminants Lab., Guelph, Ontario, Canada. Conferencia Sudamericana de Micotoxinas. Libro de Referencia. Abril 1995. Buenos Aires, Argentina.
- ROOD, H.; BUCK, B. and SWANSON, S. (1988). Gas chromatographic screenings method for T-2 toxin, diacetoxyscirpenol, deoxynivalenol and related trichothecenes in feeds. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, vol. 71, pp. 483.
- ROOD, H.; SWANSON, S. (Jr.) and BUCK, W. (1986). Rapid screening procedure for the detection of trichothecenes in plasma and urine. *Journal of Chromatography*, vol. 378, pp. 375 – 383.

- ROSA, C.; SANTANA, D. and DIREITO, G. (1996). *Abstracts LX International IUPAC Symposium Mycotoxins and Phycotoxins*, May 27 – 31, Rome, Italy, pp. 177.
- RUPRICH, J. and OSTRY, V. (1995). Determination of the mycotoxin deoxynivalenol in beer by commercial ELISA test and estimation of the exposure dose from beer for the population in the Czech Republic. *Cent. Eur. J. Public. Health*, vol. 3, No. 4, pp. 224 – 229.
- SANO, A.; MATUTSANI, S.; SUZUKI, M. And TAKITANI, S. (1987). High performance liquid chromatographic method for determining trichothecene mycotoxins by post-column fluorescence derivatization. *Journal of Chromatography*, vol. 410, pp. 427 – 436.
- SCOTT, P. (1984). Effects of food processing on mycotoxins. *Journal of Food Protection*, vol. 47, pp. 488 – 499.
- SCOTT, P. (1990). Trichothecenes in grains. *Cereal Food World*, vol. 35, No. 7, pp. 661 – 666.
- SCOTT, P. (1996). Mycotoxins transmitted into beer from contaminated grains during brewing. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists International*, vol. 79, No. 4, pp. 875 – 882.
- SCOTT, P. and KANHERE, S. (1986). Comparison of columns phases for separation of derivatized trichothecenes by capillary gas chromatography. *Journal of Chromatography*, vol. 368, pp. 374 – 380.
- SCOTT, P. and KANHERE, S. (1995). Determination of ochratoxin A in beer. *Food Additives and Contaminants*, vol. 12, No. 4, pp. 591 – 598.
- SCOTT, P.; KANHERE, S.; DALEY, E. and FARBER, J. (1992). Fermentation of wort containing deoxynivalenol and zearalenone. *Mycotoxin Research*, vol. 8, No. 2, pp. 58 – 66.

- SCOTT, P.; KANHERE, S.; LAWRENCE, G.; DALEY, E. and FARBER, J. (1995). Fermentation of wort containing added ochratoxin A and fumonisins B1 and B2. *Food Additives and Contaminants*, vol. 12, No. 1, pp. 31 – 40.
- SCOTT, P.; KANHERE, S. and TARTER, E. (1986). Determination of nivalenol and deoxynivalenol in cereals by electron–capture gas–chromatography. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, vol. 69, No. 5, pp. 889 – 893.
- SCOTT, P.; KANHERE, S. and WEBER, D. (1993). Analysis of Canadian and imported beers for *Fusarium* mycotoxins by gas chromatography–mass spectrometry. *Food Additives and Contaminants*, vol. 10, No. 4, pp. 381 – 389.
- SCOTT, P.; LAU, P. and KANHERE, S. (1981). Gas–chromatography with electron capture and mass–spectrometry detection of deoxynivalenol in wheat and other grains. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, vol. 64, No. 6, pp. 1364 – 1370.
- SCOTT, P. and LAWRENCE, G. (1995). Citado por Scott (1996). *Journal of Food Protection*, vol. 58, pp. 1379 – 1382.
- SCOTT, P. and LAWRENCE, G. (1997). Determination of aflatoxins in beer. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists International*, vol. 80, No. 6, pp. 1229 – 1234.
- SCOTT, P.; LOMBAERT, G.; PELLAERS, P.; BACLER, S.; KANHERE, S.; SUN, W.; LAU, P. and WEBER, D. (1989). Application of capillary gas chromatography to a survey of wheat for five trichothecenes. *Food Additives and Contaminants*, vol. 6, No. 4, pp. 489 – 500.
- SCHMIDT, R. (1995). *EZ Quant, an assay quantitative test for deoxynivalenol*. Presented at 109 th., Association Official Analytical Chemists International Annual Meeting, Nashville, TN, U.S.A.

- SCHOENTAL, R. (1984), in Proceedings, 5 th. *Meeting on Mycotoxins in Animal & Human Health*, 22 – 24 August, Edinburg, UK, M.O. Moss & M. Frank (eds.), University of Surrey, Guilford, UK, pp. 62 – 72.
- SCHWADORF, K. and MÜLLER, H. (1991). Determination of trichothecenes in cereals by gas chromatography with ion trap detection. *Chromatographia*, vol. 32, pp. 137.
- SCHWARZ, P.; CASPER, H. and BEATTIE, S. (1995). Fate and development of naturally occurring *Fusarium* mycotoxins during malting and brewing. *Journal of the American Society Brewing Chemistry*, vol. 53, No. 3, pp. 121 – 127.
- SECRETARIA de AGRICULTURA, GANADERIA, PESCA y ALIMENTACION (SAGPyA, 1999). Datos Estadísticos, <http://siiap.sagyp.mecon.ar/>.
- SEIDEL, V.; LANG, B.; FRAISSLER, S. et al. (1993). Analysis of trace levels of trichothecene mycotoxins in Austrian cereals by gas chromatography with electrón capture detection. *Chromatographia*, vol. 37, pp. 191.
- SHANNON, G.; PETERSON, R. and SHOTWELL, O. (1985). Rapid screening method for detection of deoxynivalenol. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, vol. 68, pp. 1126 – 1128.
- SHIM, W.; KIM, J.; SEO, J. and LEE, Y. (1997). Natural occurrence of trichothecenes and zearalenone in Korean and imported beers. *Food Additives and Contaminants*, vol. 14, No. 1, pp. 1 – 5.
- SIAME, B. and LOVELACE, C. (1989). Natural occurrence of zearalenone and trichothecene toxins in maize-based animal feeds in Zambia. *Journal of Science Food Agriculture*, vol. 49, pp. 25 – 35.
- SINHA, K. and BHATNAGAR, D. (edit., 1998). *Mycotoxins in agriculture and food safety*. Marcel Dekker Inc., chapter 5, pp. 135 – 182.

- SOUCI, S.; FACHMANN, W. and KRAUT, H. (1989). *Die Zusammensetzung der Lebensmittel Nährwert-Tabellen 1989 / 90*. Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie, Garching B. München (eds.), Stuttgart, pp. 439 – 535 and 951 – 955.
- STEINER, K. and LÄNZLINGER, U. (1978). *Brauwissenschaft Rundschau*, vol. **89**, pp. 133 – 135.
- STEWART, G. (1995), *Handbook of Brewing*, W.A. Hardwick (ed.), Marcel Dekker, New York, NY, U.S.A., pp. 121 – 132.
- STINSON, E.; OSMAN, S.; HUHTANEN, C. and BILLS, D. (1978). *Applied and Environmental Microbiology*, vol. **36**, pp. 620 – 622.
- STOLOFF, L. and TRUCKSESS, M. (1981). Effect of boiling, frying, and baking on recovery of aflatoxin from naturally contaminated corn grits or cornmeal. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, vol. **64**, No.3, pp. 678 – 680.
- STRATTON, G.; ROBINSON, A.; SMITH, H.; KITTILSEN, L. and BARBOUR, M. (1993). Levels of five mycotoxins in grains harvested in Atlantic Canada as measured by high-performance liquid chromatography. *Archives of the Environmental of Contaminants Toxicology*, vol. **24**, pp. 399.
- SUNJIC, V.; GELO, M.; RUSMAN, S.; Di GRAZIA, L. and CLAUTI, G. (1991). Stereoselective reduction of two zeranole precursors by baker's yeast. *Enzyme and Microbiology Technology*, vol. **13**, pp. 344 – 348.
- SWANSON, S.; DAHLEM, A.; ROOD, H. (Jr.) and COTE, L. (1986). Gas chromatographic analysis of milk for deoxynivalenol and its metabolite DOM-1. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, vol. **69**, No. 1, pp. 41 – 43.

- SYDENHAM, E.; THIEL, P.; MARASSAS, W. and NIEUWENHÜIS, J. (1989). Occurrence of deoxynivalenol in *Fusarium graminearum* infected undergrade wheat in South Africa. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 27, pp. 921.
- SYDENHAM, E. and SHEPHARD, G. (1996). *Chromatographic and allied methods of analysis for selected mycotoxins*. Progress in Food Contaminant Analysis, J. Gilbert (ed.), Blackie Academic & Professional, Chapman & Hall (1996), Bristol, Great Britain, chapter 3, pp. 65 – 146.
- SYLVIA, V.; PHILLIPS, T.; CLEMENT, B.; GREEN, J.; KUBENA, L. and HEIDELBAUGH, N. (1986). Determination of deoxynivalenol (vomitoxin) by high performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Journal of Chromatography*, vol. 362, pp. 79 – 85.
- TABATA, S.; KAMIMURA, H.; IBE, A.; HASHIMOTO, H.; TAMURA, Y. and NISHIMA, T. (1992). Fate of aflatoxins during cooking process and effect of food components on their stability. *Journal of the Hygienic of Society Japan*, vol. 33, pp. 150 – 156.
- TANAKA, T.; HASEGAWA, A.; YAMAMOTO, S.; LEE, U.; SUGIURA, Y. and UENO, Y: (1988). Worldwide contamination of cereals by the *Fusarium* mycotoxins nivalenol, deoxynivalenol and zearalenone. 1. Survey of 19 countries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 36, pp. 979 – 983.
- TOMOVA, S. (1977). Citado por Scott (1996). *Khig. Zdraveopaz.*, vol. 20, pp. 266 – 270.
- TORRES, M.; SANCHIS, V. and RAMOS, A. (1998). Occurrence of fumonisins in Spanish beer analyzed by an enzyme-linked immunosorbent assay method. *International Journal of Food Microbiology*, vol. 39, Nos. 1 – 2, pp. 139 – 143.

- TRENHOLM, H.; WARNER, R. and PRELUSKY, D. (1985). Assessment of extraction procedures in the analysis of naturally contaminated grains products for deoxynivalenol (vomitoxin). *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, vol. **68**, pp. 645.
- TRESSL, R.; HOMMEL, E. and HELAK, B. (1989). Citado por Scott (1996). *Monatsschrift für Brauwissenschaft*, vol.**42**, pp. 331 – 335.
- TRINDER, D. (1988). Citado por Scott (1996). *Journal of the Institute of Brewing*, vol. **95**, pp. 307 – 309.
- TRIVEDI, A.; DOI, E. and KITABATAKE, N. (1993a). Citado por Scott (1996). *Journal of Food Science*, vol. **58**, pp. 229 – 232.
- TRIVEDI, A.; HIROTA, M.; DOI, E. and KITABATAKE, N. (1993b). Citado por Scott (1996). *Journal of the Chemistry Society Perkins Translations I*, pp. 2167 – 2171.
- TRUCKSESS, M.; FLOOD, M.; MOSSOBA, M. and PAGE, S. (1987). High-performance thin layer chromatographic determination of deoxynivalenol, fusarenon-X, and nivalenol in barley, corn, and wheat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. **35**, pp. 445 – 448.
- TRUCKSESS, M.; FLOOD, M. and PAGE, S. (1986). Thin layer chromatographic determination of deoxynivalenol in processed grains products. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, vol. **69**, No. 1, pp. 35 – 36.
- TRUCKSESS, M.; READY, D.; PENDER, M.; LIGMOND, C.; WOOD, G. and PAGE, S. (1995). *Determination and survey of deoxynivalenol in white flour, whole wheat flour and bran*. Presented at 109 th. Association Official Analytical Chemists International Annual Meeting, Nashville, TN, U.S.A.

- TRYPHONAS, H.; O'GRADY, L.; ARNOLD, D.; Mc GUIRE, P.; KARPINSKY, K. and VESONDER, R. (1984). Effects of deoxynivalenol (vomitoxin) on the humoral immunity of mice. *Toxicology Letters*, vol. 23, pp. 7 – 24.
- UENO, Y. (1983). *Trichothecenes: Chemical, Biological and Toxicological Aspects*. Tokyo, Elsevier.
- USLEBER, E.; MÄRTLBAUER, E.; DIETRICH, R. and TERPLAN, G. (1991). Direct enzyme-linked immunosorbent assay for the detection 8-ketotrichothecene mycotoxins deoxynivalenol, 3-acetyldeoxynivalenol, and 15-acetyldeoxynivalenol in buffer solutions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 39, pp. 2091.
- VECCHIO, A.; FINOLI, C.; PECCEDI, M and CERUTTI, G. (1985). Citado por Scott (1996). *Tecnol. Aliment.* (Milano), vol. 8, pp. 84 – 87.
- VISCONTI, A. and BOTTALICO, A. (1983). Detection of *Fusarium* trichothecenes (nivalenol, deoxynivalenol, fusarenon-X, and 3-acetyldeoxynivalenol) by high performance liquid chromatography. *Chromatographia*, vol. 17, pp. 97 – 100.
- VUDATHALA, D.; PRELUSKY, D. and TRENHOLM, H. (1994). Analysis of trace levels of deoxynivalenol in cow's milk by high-performance liquid chromatography. *Journal of the Liquid Chromatography*, vol. 17, pp. 673.
- WARE, G.; CARMAN, A.; FRANCIS, O. and KUAN, S. (1984). Gas chromatographic determination of deoxynivalenol in wheat with electron capture detection. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, vol. 67, No. 4, pp. 731 – 734.
- WEDDELING, K.; BÄSSLER, H.; DOERK, H. and BARON, G. (1994). Citado por Scott (1996). *Monatsschrift für Brauwissenschaft*, vol. 47, No. 4, pp. 94 – 98.

- WOLLER, R. and MAJERUS, P. (1982). Zur mykotoxin-und insbesondere zur aflatoxinsituation bei beer, ausgangsstoffen und nebenprodukten der bierbereitung. *Monatsschrift für Brauwissenschaft*, vol. 35, pp. 88 – 90.
- XU, Y.; ZHANG, G. and CHU, F. (1988). Enzyme-linked immunosorbent assay for deoxynivalenol in corn in wheat. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, vol. 71, pp 945.
- YOUNG, J. and LAFONTAINE, P. (1993). Detection and characterization of fumonisin mycotoxins as their methyl-esters by liquid chromatography / particle-beam mass spectrometry. *Rapid Communication of the Mass Spectrometry*, vol. 7, pp. 352.
- ZIMMERLI, B. and DICK, R. (1995). Determination of ochratoxin A at the ppt level in human blood, serum, milk and some foodstuffs by high-performance liquid chromatography with enhanced fluorescence detection and immunoafinity column cleanup: methodology. *Journal of Chromatography. Biomedical Applications*, vol. 666, pp. 85 – 99.