

Tesis Doctoral

# Factores que influyen en la coproducción de aflatoxinas y ácido ciclopiazónico en maní por *aspergillus* sección *flavi*

Patriarca, Andrea

2004

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

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://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 Master's and Doctoral Theses Collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Patriarca, Andrea. (2004). Factores que influyen en la coproducción de aflatoxinas y ácido ciclopiazónico en maní por *aspergillus* sección *flavi*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. [http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis\\_n3762\\_Patriarca](http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n3762_Patriarca)

Cita tipo Chicago:

Patriarca, Andrea. "Factores que influyen en la coproducción de aflatoxinas y ácido ciclopiazónico en maní por *aspergillus* sección *flavi*". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2004. [http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis\\_n3762\\_Patriarca](http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n3762_Patriarca)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

**FCE y N BIBLIOTECA**

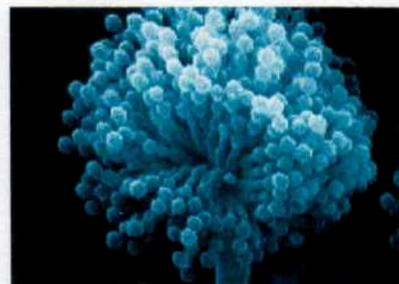
**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**  
**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

---

**FACTORES QUE INFLUYEN EN LA CO-  
PRODUCCION DE AFLATOXINAS Y  
ACIDO CICLOPIAZONICO EN MANI  
POR *ASPERGILLUS* SECCION *FLAVI***

LIC. ANDREA PATRIARCA

3762



---

**DIRECTOR: DRA. GRACIELA VAAMONDE**

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO DE DOCTOR  
DE LA UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

2004

FACTORES QUE INFLUYEN EN LA CO-PRODUCCION DE  
AFLATOXINAS Y ACIDO CICLOPIAZONICO EN MANI POR  
*ASPERGILLUS* SECCION *FLAVI*

**Palabras clave:** *Aspergillus* sección *Flavi*, aflatoxinas, ácido ciclopiazónico, maní, actividad acuosa ( $a_w$ ), temperatura.

INLUENCE OF SEVERAL FACTORS ON CO-PRODUCTION OF  
AFLATOXINS AND CYCLOPIAZONIC ACID IN PEANUTS BY  
*ASPERGILLUS* SECTION *FLAVI*

**Keywords:** *Aspergillus* section *Flavi*, aflatoxins, cyclopiazonic acid, peanuts, water activity ( $a_w$ ), temperature.

*A Christian Chipont, por su apoyo incondicional, por ser mi luz y mi guía, por darme fuerzas para hacer realidad todos mis proyectos.*

*A mis padres, que con su sacrificio hicieron esto posible, y en ello vieron cumplidos sus sueños.*

## INDICE

AGRADECIMIENTOS	ix
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
<b>I. INTRODUCCION</b>	<b>5</b>
I.1. EL MANI	6
<b>I.1.1. Origen histórico</b>	<b>6</b>
<b>I.1.2. Distribución geográfica</b>	<b>8</b>
<b>I.1.3. Características de la planta</b>	<b>10</b>
<b>I.1.4. Variedades</b>	<b>12</b>
<b>I.1.5. Ecología</b>	<b>12</b>
<b>I.1.6. Aspectos económicos</b>	<b>13</b>
I.1.6.1. Exportaciones de la industria manisera	17
I.2. AGENTES DE DETERIORO DEL MANI	19
<b>I.2.1. Los hongos como agentes de biodeterioro</b>	<b>19</b>
<b>I.2.2. Hongos del campo y hongos del almacenamiento</b>	<b>21</b>
<b>I.2.3. El género <i>Aspergillus</i></b>	<b>23</b>
I.2.3.1. Taxonomía	24
I.2.3.2. Aislamiento y enumeración	27
I.2.3.3. Identificación	27
I.2.3.4. Toxicidad	30
<b>I.2.4. <i>Aspergillus</i> sección <i>Flavi</i></b>	<b>32</b>
I.2.4.1. Taxonomía	32
I.2.4.2. Aislamiento y enumeración	33
I.2.4.3. Identificación	33

I.2.4.4. Toxinas	39
A. Aflatoxinas	39
A.1. Estructura	39
A.2. Toxicidad	41
A.3. Mecanismo de acción	43
A.4. Biosíntesis	45
A.5. Control e inactivación	46
B. Acido ciclopiazónico	50
B.1. Estructura	50
B.2. Toxicidad	51
B.3. Mecanismo de acción	54
I.2.4.5. Distribución de especies de <i>Aspergillus</i> sección <i>Flavi</i> en la naturaleza y los alimentos	55
I.3. FACTORES QUE CONDICIONAN EL DESARROLLO DE HONGOS Y LA PRODUCCION DE MICOTOXINAS	57
<b>I.3.1. Temperatura</b>	59
<b>I.3.2. Actividad de agua</b>	60
I.4. OBJETIVOS	66
<b>II. MATERIALES Y METODOS</b>	68
II.1. ESTUDIO DE LA DISTRIBUCION DE <i>ASPERGILLUS</i> SECCION <i>FLAVI</i>	69
<b>II.1.1. Sustrato</b>	69
<b>II.1.2. Aislamientos</b>	69
<b>II.1.3. Identificación</b>	69
<b>II.1.4. Determinación de la capacidad toxicogénica</b>	71

II.2. DESARROLLO DE UN METODO ANALITICO PARA LA DETERMINACION DE ACIDO CICLOPIAZONICO EN MANI	73
<b>II.2.1. Preparación y cuantificación del patrón de ácido ciclopiazónico</b>	73
<b>II.2.2. Selección de un método para el análisis de ácido ciclopiazónico en maní</b>	73
II.2.2.1. Métodos de extracción evaluados	73
a) Método BF modificado	73
b) Método de Lansden	74
c) Método de Gorst-Allman & Steyn	75
d) Método de Prasongsidh <i>et al.</i>	75
e) Método de Prasongsidh <i>et al.</i> Modificado	76
II.2.2.2. Métodos de purificación del extracto ensayados	76
II.2.2.3. Cromatografía en capa delgada (TLC)	77
<b>II.2.3. Estudio del método de Prasongsidh <i>et al.</i> modificado para el análisis de ácido ciclopiazónico en maní</b>	84
II.2.3.1. Recuperación	84
II.2.3.2. Repetibilidad	84
II.3. ESTUDIO DE LA CO-OCURRENCIA NATURAL DE AFLATOXINAS Y ACIDO CICLOPIAZONICO EN MANI	86
<b>II.3.1. Muestras de maní</b>	86
<b>II.3.2. Análisis de aflatoxinas</b>	86
<b>II.3.3. Análisis de ácido ciclopiazónico</b>	87
II.4. ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LA ACTIVIDAD ACUOSA, LA TEMPERATURA Y EL TIEMPO DE INCUBACION SOBRE LA CO-PRODUCCION DE AFLATOXINA B <sub>1</sub> Y ACIDO CICLOPIAZONICO EN MANI	90
<b>II.4.1. Sustrato</b>	90
<b>II.4.2. Selección del procedimiento de desinfección</b>	90

II.4.2.1. Tratamiento con hipoclorito de sodio	90
II.4.2.2. Tratamiento con radiación gamma	90
II.4.2.3. Evaluación de los métodos de desinfección	91
a) Determinación del porcentaje de granos contaminados por mohos	91
b) Determinación de la viabilidad de las semillas	91
<b>II.4.3. Acondicionamiento de los granos a diferentes niveles de actividad acuosa</b>	91
<b>II.4.4. Determinación de la actividad acuosa de los granos</b>	92
<b>II.4.5. Microorganismos</b>	93
<b>II.4.6. Determinación de la capacidad toxicogénica de las cepas utilizadas</b>	93
<b>II.4.7. Preparación y cuantificación del inóculo</b>	94
<b>II.4.8. Inoculación</b>	94
<b>II.4.9. Incubación</b>	95
<b>II.4.10. Análisis de micotoxinas</b>	95
<b>II.4.11. Análisis estadístico</b>	96
<b>III. RESULTADOS Y DISCUSION</b>	97
III.1. ESTUDIO DE LA DISTRIBUCION DE <i>ASPERGILLUS</i> SECCION <i>FLAVI</i>	98
<b>III.1.1. Distribución geográfica de las cepas</b>	98
<b>III.1.2. Capacidad toxicogénica</b>	100
III.2. DESARROLLO DE UN METODO ANALITICO PARA LA DETERMINACION DE ACIDO CICLOPIAZONICO EN MANI	107
<b>III.2.1. Selección del método para el análisis de ácido ciclopiazónico en maní</b>	107
III.2.1.1. Evaluación de métodos de extracción	107

III.2.1.2. Evaluación de métodos de purificación del extracto	110
III.2.1.3. Cromatografía en capa delgada	111
<b>III.2.2. Desempeño analítico del método de Prasongsidh <i>et al.</i> modificado</b>	112
II.2.2.1. Recuperación	112
III.3. ESTUDIO DE LA CO-OCURRENCIA NATURAL DE AFLATOXINAS Y ACIDO CICLOPIAZONICO EN MANI	118
III.4. ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LA ACTIVIDAD ACUOSA, LA TEMPERATURA Y EL TIEMPO DE INCUBACION SOBRE LA CO-PRODUCCION DE AFLATOXINA B <sub>1</sub> Y ACIDO CICLOPIAZONICO EN MANI	121
<b>III.4.1. Desinfección del sustrato</b>	121
<b>III.4.2. Evaluación de los métodos de desinfección</b>	121
<b>III.4.3. Selección de los microorganismos</b>	122
<b>III.4.4. Influencia de la actividad acuosa y la temperatura sobre la co-producción de aflatoxina B<sub>1</sub> y ácido ciclopiazónico en maní</b>	124
III.4.4.1. Tratamiento estadístico de los datos	129
III.4.4.2. Efectos e interacciones de la actividad acuosa, la temperatura y el tiempo de incubación sobre la producción de CPA en maní por <i>A. flavus</i>	130
III.4.4.3. Efectos e interacciones de la actividad acuosa, la temperatura y el tiempo de incubación sobre la producción de AFB <sub>1</sub> en maní por <i>A. flavus</i>	133
III.4.4.4. Efectos e interacciones de la actividad acuosa, la temperatura y el tiempo de incubación sobre la co-producción de CPA y AFB <sub>1</sub> en maní por <i>A. flavus</i>	141
III.4.4.5. Superficies de respuesta para la producción de AFB <sub>1</sub> y CPA por <i>A. flavus</i> en maní	143

<b>IV. CONCLUSIONES</b>	145
IV.1. ESTUDIO DE LA DISTRIBUCION DE <i>ASPERGILLUS</i> SECCION <i>FLAVI</i>	146
IV.2. DESARROLLO DE UN METODO ANALITICO PARA LA DETERMINACION DE ACIDO CICLOPIAZONICO EN MANI	147
IV.3. ESTUDIO DE LA CO-OCURRENCIA NATURAL DE AFLATOXINAS Y ACIDO CICLOPIAZONICO EN MANI	147
IV.4. ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LA ACTIVIDAD ACUOSA, LA TEMPERATURA Y EL TIEMPO DE INCUBACION SOBRE LA CO-PRODUCCION DE AFLATOXINA B <sub>1</sub> Y ACIDO CICLOPIAZONICO EN MANI	148
APENDICE	149
BIBLIOGRAFIA	151

Deseo agradecer a la Dra. Graciela Vaamonde, bajo cuya dirección he realizado esta Tesis, por haberme guiado en mi iniciación en la investigación científica. Su valiosa experiencia ha sustentado y posibilitado el desarrollo de esta Tesis.

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a la Dra. Virginia Fernández Pinto. Sin su apoyo, calidez humana, sus conocimientos prácticos y su constante consejo este trabajo no hubiera sido posible.

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Buenos Aires, y en particular a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, por brindarme la posibilidad de iniciarme en la investigación científica a través de este trabajo de Tesis.

A la Estación Experimental Regional Agropecuaria Manfredi del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), por el envío de las muestras de maní empleadas en la primera parte del presente trabajo.

Al Dr. Mario Gómez, de SENASA, por el suministro de las muestras de maní que fueron utilizadas en la segunda etapa de este trabajo.

A la Comisión Nacional de Energía Atómica, en especial a la Ingeniera Andrea Docters, por llevar a cabo la irradiación de los granos de maní.

A la Lic. Gabriela Larumbe, por su cordial colaboración y el constante y cálido apoyo brindados durante todo este tiempo.

A la Bióloga Stella Maris Romero, por su solícita disposición y constante interés prestados en todo momento.

A la Bióloga María Belén Pildain, por su colaboración y la facilitación de material de gran utilidad para la realización de esta Tesis.

A Nilda Arapa, por su atenta, cordial y constante ayuda en los aspectos cotidianos de las tareas de laboratorio.

A María del Carmen Ares, por su excelente disposición y gentil asistencia en aspectos administrativos relacionados con el presente trabajo.

A la Lic. Paula Cukierkorn, la Lic. Catalina Romano, y el Magister Gustavo Moltó por su cordial camaradería y su variada colaboración.

A Román Martino, Maximiliano Alvarez, Graciela Martí Garro y María Victoria Alvarez, por su cariño, su apoyo y su valiosa amistad.

A mis padres, que hicieron posible mi carrera, y me acompañaron en el esfuerzo.

A Christian Chipont, por su infinita ayuda, su inagotable paciencia, su apoyo incondicional y su inmenso cariño.

## RESUMEN

Se estudió la distribución de cepas de *Aspergillus* sección *Flavi* en 57 muestras de maní provenientes de la zona núcleo manisera de la provincia de Córdoba, Argentina. Se encontraron cepas de *A. flavus* y/o *A. parasiticus* en el 74% de las muestras analizadas. *A. nomius*, una especie relativamente poco frecuente en la naturaleza, no fue aislada de ninguna muestra. En base a estos resultados, se puede afirmar que las cepas de *A. flavus* y *A. parasiticus* están ampliamente distribuidas en la zona manisera de la provincia de Córdoba.

Se evaluó la capacidad toxicogénica de las cepas aisladas de maní y se encontró que el 89% de las cepas de *A. parasiticus* eran aflatoxigénicas, y que el 76% de las cepas de *A. flavus* producían aflatoxinas y el 90% eran productoras de ácido ciclopiazónico (CPA), mientras que el 69% de las mismas eran productoras simultáneamente de ambas micotoxinas. Además se hallaron cinco cepas de *A. flavus* con características atípicas, productoras de aflatoxinas del grupo B y G en conjunción con CPA. Estudios a nivel molecular están siendo llevados a cabo por otros autores a fin de determinar si se trata de una nueva especie. Este trabajo es el primer informe de la presencia de estas cepas en cultivos de nuestro país.

Se desarrolló un método analítico para la determinación de CPA en maní con adecuados atributos de desempeño analítico (recuperación 95%; RSD<sub>r</sub> variable entre 5,1% y 9,8% según el nivel de contaminación en el rango de 100 a 500 µg/kg; límite de detección 45 µg/kg).

Se investigó la co-ocurrencia natural de aflatoxinas y CPA en maní en 50 muestras provenientes de la provincia de Córdoba. La co-ocurrencia de ambas

micotoxinas fue hallada en 2 de las muestras. Si bien la proporción de muestras contaminadas fue relativamente baja, los niveles de contaminación fueron elevados (hasta 1250  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de aflatoxinas totales y 4300  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de CPA). Este es el primer informe de co-ocurrencia de aflatoxinas y ácido ciclopiazónico en maní cultivado en nuestro país.

Se estudió la influencia de la actividad de agua ( $a_w$ ), la temperatura y el tiempo sobre la co-producción de dos micotoxinas importantes en relación a la contaminación potencial del maní: las aflatoxinas y el ácido ciclopiazónico (CPA), ambas producidas por *A. flavus*.

Se observó que la cantidad producida de ambas toxinas fue determinada por la compleja interacción de  $a_w$ , temperatura y tiempo de incubación. El mayor nivel de CPA se produjo a  $a_w$  0,94 y 25°C luego de 28 días de incubación, en tanto que  $a_w$  0,86 puede ser considerada limitante para la producción de esta toxina en maní.

La producción de ambas toxinas mostró una respuesta diferente a las condiciones estudiadas. Las condiciones de máxima acumulación de ambas micotoxinas es opuesta, es decir, en las condiciones óptimas para la producción de CPA, la acumulación de AFB<sub>1</sub> es poco significativa y viceversa. La capacidad de responder de manera diferente a factores ambientales en relación a la biosíntesis de metabolitos secundarios tóxicos puede ayudar a la supervivencia del hongo en un nicho ecológico particular, permitiéndole colonizar el sustrato más eficientemente que otros competidores.

## ABSTRACT

The distribution of *Aspergillus* section *Flavi* strains in 57 peanut samples from the peanut-growing area in the province of Córdoba, Argentina, was studied. Strains of *A. flavus* and/or *A. parasiticus* have been isolated in 74% of analyzed samples. *A. nomius*, a species relatively infrequent in nature, was not isolated. According to these results, it can be stated that *A. flavus* and *A. parasiticus* are widely distributed in the peanut-growing area of Córdoba.

Mycotoxin potential of the strains was evaluated and it was found that 89% of *A. parasiticus* strains were aflatoxigenic, and that 76% of *A. flavus* strains produced aflatoxins and 90% were cyclopiazonic acid (CPA) producers, while 90% simultaneously produced both toxins. Additionally, five *A. flavus* strains with atypical characteristics, producing group B and G aflatoxins in conjunction with CPA, were found. Molecular studies are being carried out by other authors to establish if these strains belong to a new species. This is the first report of the presence of these strains in crops in our country.

An analytical method was developed for determination of CPA in peanut, with adequate analytical performance (recovery 95%; RSD<sub>r</sub> variable from 5,1% and 9,8% according to contamination level in the range of 100-500 µg/kg; detection limit 45 µg/kg).

The natural co-occurrence of aflatoxins and CPA in peanut was investigated in 50 samples from the province of Córdoba. The co-occurrence of both mycotoxins was found in 2 samples. Although the proportion of contaminated samples was relatively low, contamination levels were high (until 1250 µg/kg of total aflatoxins and 4300

$\mu\text{g}/\text{kg}$  of CPA). This is the first report of co-occurrence of aflatoxins and cyclopiazonic acid in peanut cultivated in our country.

The influence of water activity ( $a_w$ ), temperature and time on the co-production of two important mycotoxins related to potential peanut contamination was studied: aflatoxins and cyclopiazonic acid (CPA), both produced by *A. flavus*.

It was observed that the quantity of both toxins produced was determined by the complex interaction between  $a_w$ , temperature and incubation time. The highest level of CPA was produced at  $a_w$  0.94 and 25°C after 28 days of incubation, while  $a_w$  0.86 can be considered limitant for the production of this toxin on peanut.

The production of both toxins showed a different response to the studied conditions. Maximum accumulation conditions for both mycotoxins are opposite. At optimal conditions for CPA production, AFB<sub>1</sub> accumulation is less than significant and vice versa. The ability to respond in a different way to environmental factors in relation to the biosynthesis of toxic secondary metabolites may aid survival of the fungus in a particular ecological niche allowing it to colonize the substrate more efficiently than other competitors.

**I**

# INTRODUCCION

---

CAPITULO

## I.1. EL MANÍ

El maní o cacahuete (*Arachis hypogaea*), no es una verdadera nuez sino más bien una legumbre de carácter anual, como el poroto y la arveja. La planta de maní es poco común porque florece sobre la tierra y sus vainas, las cuales contienen las cinco semillas que la misma produce, son de carácter subterráneo.

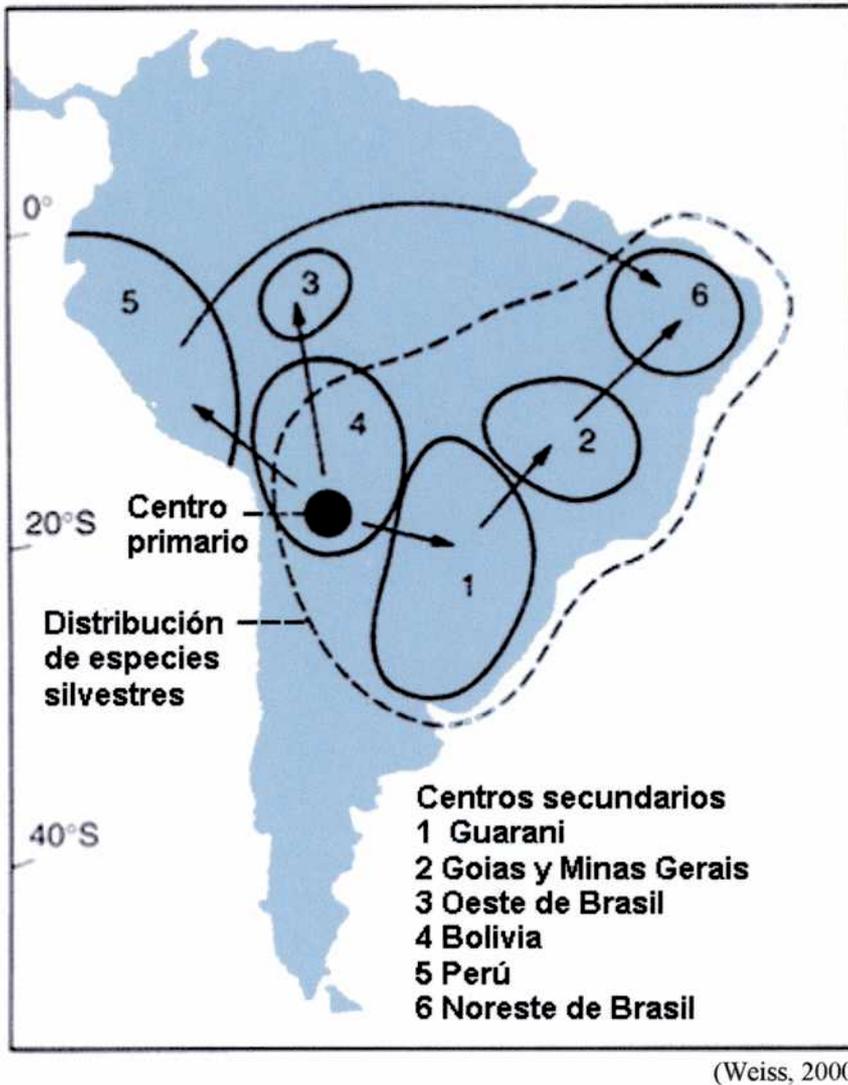
La composición alimenticia de sus semillas varía entre aceites comestibles, fuentes proteicas y carbohidratos. En proporción, entre el 40 y el 50% de las mismas son lípidos, entre el 20 y el 50% son proteínas, y entre el 10 y el 20% carbohidratos. Las semillas son nutritivas y contienen vitamina E, niacina, foliacina, calcio, fósforo, magnesio, zinc, hierro, riboflavina, tiamina, potasio y otros. El aceite de maní es una excelente fuente de ácidos grasos mono y polisaturados; contiene alrededor de 1% de ácido palmítico y 80% de oleico y linoleico.

El maní, el aceite de maní y los complejos proteicos a base de maní constituyen un importante segmento del comercio mundial en productos y semillas oleaginosas. El maní es la quinta semilla oleaginosa en producción a nivel mundial, y es utilizado para diferentes propósitos: comida, alimento para animales, y materia prima industrial (Nwokolo, 1996).

### I.1.1. Origen histórico

Los registros arqueológicos sustentan la existencia de consumo de maní entre los años 2500 y 300 AC en los oasis de los desiertos peruanos (Weiss, 2000; Smith, 2002). Aunque no se han descubierto registros arqueológicos de áreas cultivadas en la región, debido a su clima tropical, la región Guaraní de Paraguay, y el este y centro de Bolivia hacen muestra de la mayor diversidad de variedades silvestres de la especie. El maní

como cultivo agrícola fue probablemente originario de los valles del Paraguay, y de la zona de la Provincia del Chaco, en Argentina, a las orillas del Río Paraná (figura I.1). Se cree que la planta fue originalmente cultivada por los ancestros de los indios sudamericanos.



**Figura I.1. Centros de origen y diversidad del cultivo de maní**

El primer registro escrito del proceso de cultivo se encuentra en textos de origen español del año 1502 (“Hispanola”), donde los indígenas lo cultivaban e identificaban utilizando el vocablo “maní” (Sauer, 1993). Registros de Brasil de alrededor del año

1550 mostraban que la cosecha del mismo grano se conocía allí por el nombre de “mandubi”. Los textos españoles y portugueses verifican la extensión de la presencia de este cultivo desde las “Indias Orientales” hasta Sudamérica.

Los primeros datos establecen que el maní era un alimento común entre los indios de Sudamérica antes de la llegada de los españoles, y se consumía crudo o tostado. También se consideraba que poseía efectos soporíferos y antiinflamatorios. En Perú y Brasil se usaba para preparar leche de maní y productos similares a las tradicionales confituras de almendras. Fue transportado a África por los portugueses, donde se convirtió en una parte importante de la dieta. La pasta de maní se usaba para espesar sopas, guisos y platos similares, y el aceite para usos culinarios.

Antes de 1800, en el Caribe y las colonias Británicas en Norteamérica, los esclavos cultivaban maní en pequeños jardines. El maní fue utilizado para alimentar esclavos desde los primeros tiempos del tráfico Europeo de los mismos. Los colonos no parecen haber consumido el maní directamente, pero lo utilizaban para engordar ganado porcino y avícola. Los primeros datos del uso del maní en los Estados Unidos muestran que se lo usaba como bebida y como un buen sustituto del chocolate. Durante el siglo XIX, el maní fue vendido principalmente tostado, en sus vainas.

### **1.1.2. Distribución geográfica**

En la actualidad, el maní se encuentra ampliamente difundido a nivel mundial. Entre los países productores más importantes se encuentran India, China, Estados Unidos, Sudáfrica, África del Este, y Brasil.

La expansión de este cultivo puede ser analizado en base a sus varietales. El maní se divide usualmente entre 4 variedades: “Virginia”, “Peruano”, “Español”, y “Valencia”.

El varietal “Virginia” fue llevado desde las Antillas hasta Méjico en los primeros años del siglo XVI y luego rápidamente introducido en el Oeste del continente Africano. Esta variedad fue exportada entonces al este de Norteamérica tanto desde las Indias Orientales como desde Africa Occidental en el siglo XVII.

El varietal “Peruano” fue originalmente exportado desde Filipinas. Fue transportado por galeones españoles al Sudeste de China antes de 1600, donde se lo conoció como “porotos extranjeros”. Este cultivo se expandió por toda China, y de allí a Japón donde tomó el nombre de “porotos chinos”. Los colonos chinos fueron probablemente responsables de su expansión al resto del Sudeste Asiático e Indonesia. En el caso de la India, el maní provino probablemente del Africa, ya que uno de los nombres con el que se lo conocía en este país era "poroto de Mozambique".

La variedad “Española” fue seguramente transportada desde Brasil al Africa por los portugueses alrededor del 1500. Una vez allí se mezcló con la variedad “Virginia” y produjo una gran diversidad de subvariedades africanas. La variedad española fue evidentemente introducida en España a fines del siglo XVIII, desde Brasil, vía Lisboa. Desde allí se lo llevó al sur de Francia, y finalmente a los Estados Unidos en el año 1871.

La variedad “Valencia” fue introducida en España desde la provincia de Córdoba, Argentina alrededor del 1900, mientras que ésta llegaría a los Estados Unidos desde Valencia (de donde obtiene su nombre) alrededor de 1910. El maní no llegó a Inglaterra o Francia hasta mucho después que los españoles y portugueses hubieran

encontrado este cultivo por primera vez. El primero registro del vocablo “peanut” (maní en idioma inglés) se encuentra en el diario de un Inglés que visitó los Estados Unidos en 1794 (Krapovickas, 1969; Smith, 2002).

### **I.1.3. Características de la planta**

El maní (*Arachis hypogaea*) pertenece a la familia de las Leguminosas (*Leguminosae*); es una legumbre de carácter anual, lo cual es inusual, ya que sus genes son poliploides. Solamente puede ser entrecruzada con otra especie, *A. monticola*, la cual es su probable progenitor silvestre (Sauer 1993). La planta de maní puede ser erecta o rastrera, de entre 15 y 60 cm. de alto (figura I.2). Es de escasa velloidad, y tiene un sistema de raíces muy bien desarrollado con muchas ramificaciones laterales. Las raíces están generalmente desprovistas de pelos y cuentan con una epidermis distintiva. Una de las características únicas de la planta de maní son los movimientos nictinásticos de las hojas (Coffelt, 1989).

La hoja está compuesta de cuatro folíolos de forma oval a ovoide, de 4 a 8 cm de largo, unidos al nervio medial o raquis por medio de pequeñas articulaciones que permiten el movimiento. Durante períodos de oscuridad y calurosos días de verano, los pares de folíolos permanecen estrechamente juntos en una posición vertical, y en días normales, los folíolos están separados entre sí en una posición horizontal.

Las flores son ostentosas, sésiles en un principio y con tallos que nacen posteriormente en unas cuantas inflorescencias cortas, densas y axilares. El tubo del cáliz es de forma tubular. La corola es de color amarillo brillante de 0,9 a 1,4 cm de diámetro. Las primeras flores aparecen entre 4 y 6 semanas luego de la siembra. La flor

cuenta con cinco pétalos: uno principal, dos laterales, y dos pétalos embutidos para formar una suerte de “quilla” (Coffelt 1989).

Las vainas se encuentran enterradas de 3 a 10 cm por debajo de la superficie. Miden de 1 a 7 cm de largo, son abultadas en su interior, y contienen de una a cuatro semillas, de color café amarillento, con bordes prominentes reticulados y más o menos deprimidos entre las semillas. La testa es de color rojo claro o rojo oscuro.



**Figura I.2. Esquema de la planta de maní (*Arachis hypogaea*)**

#### **I.1.4. Variedades**

El género *Arachis hypogaea* ha sido dividido en cuatro variedades reconocibles: Virginia, Peruana, Valencia, y Española, de acuerdo a sus diferentes orígenes geográficos, como se ha mencionado previamente.

Las variedades Virginia y Peruana son rastreras y requieren de 5 a 10 meses para desarrollar. Las variedades rastreras son vulgarmente conocidas como “runner” (corredoras en inglés), eso es debido a que sus ramas laterales permanecen cerca del suelo, dando una apariencia de esparcirse por el mismo. Las variedades Española y Valencia son erectas, no cuentan con semillas latentes, y alcanzan la madurez en un período de 3 a 5 meses. Las variedades erectas son comúnmente conocidas como “bunchy” (manejo en inglés), debido a que el crecimiento vertical de las ramas le da a la planta madura una forma compacta, como la de un arbusto. Las variedades erectas usualmente producen un menor rendimiento de granos que las rastreras. Sin embargo, tienden a dar semillas de mayor contenido en aceite y proteínas. La variedad Española es especialmente rica en aceite (Weiss, 2000; Bunting *et al.*, 1985).

#### **I.1.5. Ecología**

El rango geográfico principal de cultivo del maní se encuentra entre los 35°S y los 40°N, pero se extiende hasta los 45°N en Asia Central y en Norteamérica. Se adapta a una amplia variedad de condiciones ambientales. Usualmente, su crecimiento con fines comerciales se realiza por debajo de los 1250 m. de altura, aunque muchas variedades pueden ser encontradas a mayores alturas (Weiss 2000).

Su crecimiento se ve adversamente afectado por baja intensidad lumínica. Los tipos “bunchy” se ven generalmente más afectados por la variación climática que los

tipos “runner”. Las temperaturas óptimas para el desarrollo de la planta se encuentran entre los 25 y 30°C (Weiss 2000).

Una vez arraigada, la planta del maní es resistente a la sequía, y hasta cierto límite también puede soportar inundaciones. Registros pluviométricos desde 500 hasta 1000 mm permiten una producción de nivel comercial, aunque este cultivo puede ser producido con cantidades tan escasas como hasta 300 mm de lluvia anual. Una vez que las vainas han madurado, la lluvia lo afecta de forma adversa, ya que algunos cultivares tienen un período de latencia muy corto y germinan sólo bajo condiciones favorables.

#### **I.1.6. Aspectos económicos**

El cultivo de maní en nuestro país ha sufrido un cambio a mediados de la década del 70, producto de una serie de factores locales e internacionales, que resultó en el vuelco de la clásica producción de maní para la obtención de aceite a la producción a partir de entonces de maní confitería, segmento del mercado mundial en el que nuestro país ha alcanzado un liderazgo en materia de exportaciones.

Entre los principales factores locales desencadenantes del citado cambio se cuentan: la irrupción del cultivo de la soja en la región típicamente manisera y la mejora del paquete tecnológico disponible, en particular en aquellos aspectos concernientes al manejo y recolección del cultivo. Entre los factores internacionales cabe destacar la caída de los precios del aceite de maní, producto del reemplazo del mismo por otros aceites de menor precio tales como los aceites de palma, soja y colza.

Como consecuencia de lo señalado, y teniendo en cuenta que lo que más se comercializaba en el mundo, era el maní tipo runner apto para confitería, la producción argentina de maní se orientó a la obtención de este tipo de producto. Con el fin de crear

cultivares de maní con estas características y adaptados a nuestro medio, el INTA Manfredi solicitó la Universidad de Florida dichos materiales, para comprobar su adaptación a nuestro medio y utilizarlos posteriormente en los planes de mejoramiento. En el año 1975 nuestro país recibió estos materiales, entre los que descolló el cultivar multilínea Florunner, a partir del cual se derivó por selección individual en el cultivar Florman INTA.

En la actualidad el área de siembra está circunscripta casi en su totalidad a la zona centro/sur de la provincia de Córdoba, región que reúne excelentes condiciones agroclimáticas, que permiten la obtención de un producto final de excepcional calidad, libre de aflatoxinas. En las últimas tres campañas agrícolas la provincia de Córdoba concentró el 96,0% del área sembrada con esta oleaginosa. El resto de las coberturas corresponden a lotes implantados en las provincias de Corrientes, Formosa, Salta y San Luis. La zona productora de maní se concentra en las localidades cordobesas de Gral. Deheza y Carnerillo.

La aptitud de comercialización del maní está principalmente afectada por las condiciones climáticas al momento de la cosecha. Los lotes que cumplen las exigencias de limpieza, tamaño y sanidad adecuadas se destinan a confitería y elaboración de pasta de maní. El resto de la producción tiene como destino final la molturación para la obtención de aceite de maní, producto que tiene una interesante demanda en mercados internacionales y que en contraposición es casi desconocido por el consumidor local.

Nuestro país, en el año 1998, alcanzó el liderazgo del comercio mundial de maní confitería aportando en dicha oportunidad el 26,8% del volumen total exportado, posición que cedió a partir del siguiente año ante China. Actualmente continuamos ocupando una posición destacada, ya que somos el tercer exportador de maní a nivel

mundial. Estados Unidos por su parte, gran productor y consumidor que necesita imperiosamente proveerse de maní de alta calidad, como el que produce hoy nuestro país, cerró sus fronteras al mercado mundial, con fuertes restricciones arancelarias que protegían su producción. Para allanar ese camino, en marzo de 1994 fue firmado en el marco del GATT un memorando de entendimiento entre ambos países, por el cual el citado país otorgó a la Argentina una cuota de importación de maní con arancel reducido, por volúmenes crecientes.

La elaboración de manteca de maní, surge como una alternativa con la introducción del cultivar Florman INTA, apto para consumo directo y también de excelente calidad para manteca. La materia prima utilizada debe ser maní confitería, de calibre medio a medio grande, carente de defectos y con ausencia total de aflatoxinas. El crecimiento de la industria nacional de este producto se encuentra limitado por la existencia de cuotas en el mercado norteamericano y por un consumo interno prácticamente inexistente.

Con relación a la producción de aceite, el volumen elaborado es errático, por tratarse de un eslabón de transformación de excedentes y remesas de la producción con destino a confitería. Argentina es el segundo exportador de aceite de maní a nivel mundial, a continuación de Senegal, participando en el período 2000/03 con un porcentaje que fluctuó entre el 16,0% y el 27,3%. La totalidad del aceite de maní se extrae a través de un doble sistema de prensa y posterior extracción por solventes. Su destino principal es la elaboración de aceites mezclas, seguido por el uso como saborizante en la industria de panificación y confitería.

Como subproducto de la extracción de aceite se obtiene una harina oleaginoso de alto contenido en proteínas vegetales y de excelente calidad, la que es comercializada en

forma de pellets, contando con una importante demanda con destino a la alimentación animal (SAGPYA, 2004).

**Tabla I.1. Estimaciones de producción manisera a nivel nacional**

Provincia	Campaña	Area sembrada (ha)	Area cosechada (ha)	Producción (tn)	Rendimiento (kg/ha)
Córdoba	2000/01	243000	241600	381500	1579.0
Córdoba	2001/02	212670	212670	346500	1629.0
Córdoba	2002/03	150100	149600	211400	1413.0
Corrientes	2000/01	160	160	300	1580.0
Corrientes	2001/02	500	500	900	1800.0
Corrientes	2002/03	500	500	700	1400.0
Formosa	2001/02	600	600	1000	1667.0
Formosa	2002/03	1126	1126	1600	1421.0
Salta	2000/01	9000	9000	12600	1400.0
Salta	2001/02	8000	8000	12000	1500.0
Salta	2002/03	5000	4600	6400	1391.0
San Luis	2000/01	300	300	400	1330.0
San Luis	2001/02	600	600	1500	2500.0
San Luis	2002/03	600	600	800	1333.0
<b>Total País</b>	2000/01	252560	251060	394800	1572.53
<b>Total País</b>	2001/02	222370	222370	361900	1627.46
<b>Total País</b>	2002/03	157326	156426	220900	1412.16

(Dirección de Coordinación de Delegaciones, SAGPYA).

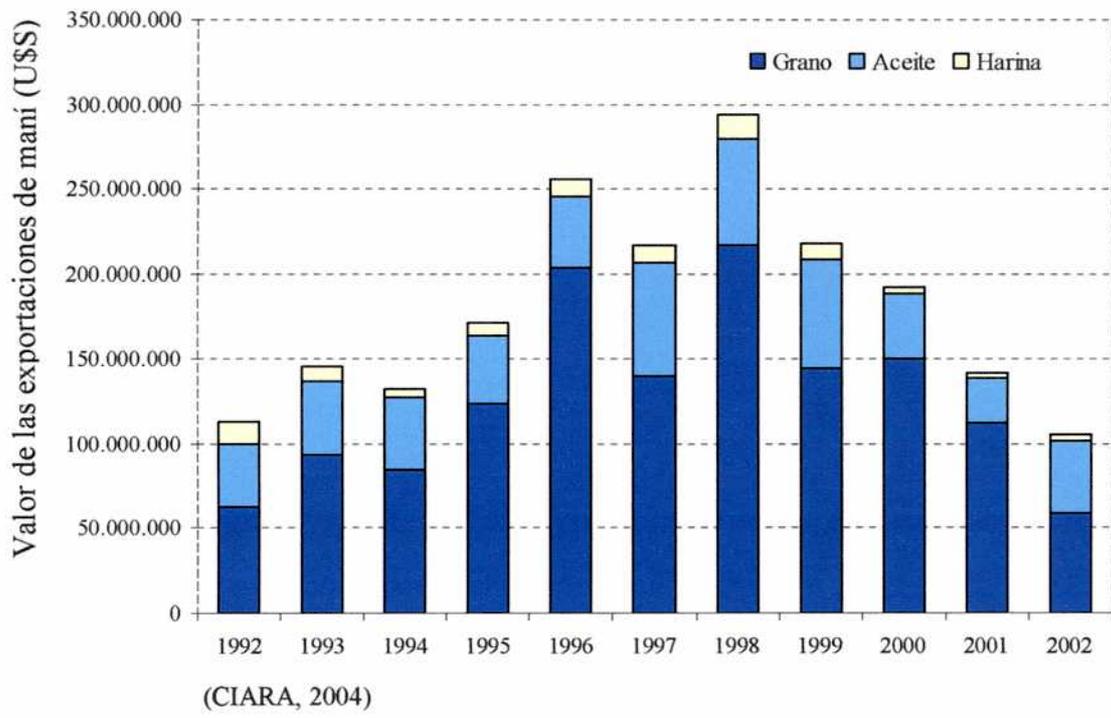
#### I.1.6.1. Exportaciones de la industria manisera

La industria manisera argentina exporta el 80% de su producción. Después de China y Estados Unidos, Argentina es el tercer exportador mundial de maní y la excelencia de sus manufacturas ha dado prestigio internacional a nuestra industria. El maní confitería argentino y sus productos derivados son apreciados y demandados en los mercados más exigentes del mundo.

En las últimas campañas, los Estados Unidos exportaron aproximadamente 236.000 toneladas anuales de maní confitería, China 355.000 y la Argentina 223.000. También exportamos unas 70.000 toneladas de aceite de maní y 62.000 toneladas de subproductos.

El 70 % de las exportaciones maniseras argentinas se destina a la Unión Europea (principalmente Holanda, Alemania, Inglaterra, España, Italia, Grecia y Francia), y el resto se reparte entre USA, Canadá, México y otros países ([www.todoagro.com](http://www.todoagro.com); [www.camaradelmani.com.ar](http://www.camaradelmani.com.ar)).

La figura I.3 ilustra los valores de las exportaciones nacionales de maní durante la última década.



**Figura 1.3. Síntesis de exportaciones argentinas de maní divididas por rubro de la última década.**

## 1.2. AGENTES DE DETERIORO DEL MANÍ

El rendimiento y la calidad del maní se ven afectados por diversos factores. Estos factores pueden dividirse en agentes bióticos y abióticos. Entre los agentes bióticos se incluyen las malezas, los insectos, los hongos, las bacterias, los virus y los nematodos. Entre los agentes abióticos se incluyen factores de estrés fisiológicos y ambientales.

Diferentes partes de la planta son susceptibles a diferentes tipos de estrés. La semilla de maní es afectada principalmente por patógenos del suelo, entre los que se incluyen los hongos, el ataque de insectos en las etapas de precosecha y poscosecha, y las condiciones ambientales (Porter *et al.*, 1997; Melouk & Shokes, 1995).

El maní es un cultivo particular, porque las flores son formadas y fertilizadas sobre el suelo, con el subsecuente desarrollo del fruto en el suelo mismo. La vaina subterránea se encuentra en contacto con la microflora del suelo por un período de tiempo prolongado, facilitando así su invasión por mohos y otros microorganismos (Mehan *et al.*, 1991).

### 1.2.1. Los hongos como agentes de biodeterioro

Los hongos son organismos heterótrofos, absorbotróficos con predigestión externa, que no poseen clorofila. En su mayoría son filamentosos y multicelulares. Sus estructuras somáticas, en general, se diferencian poco entre sí. Los filamentos (hifas), constituyen el cuerpo del hongo (soma). Las estructuras reproductivas (esporas) se diferencian de las estructuras somáticas, y exhiben una gran variedad de formas que tienen importante validez taxonómica. Algunos hongos son parásitos obligados y crecen solo en íntima asociación con el huésped vivo; otros, en cambio, son saprófitos

facultativos y pueden desarrollarse en tejidos muertos y medios de cultivo. Prácticamente cada pequeño fragmento de estos organismos posee capacidad para originar un nuevo individuo (Alexopoulos *et al.*, 1996).

Algunos hongos producen micotoxinas, metabolitos secundarios tóxicos tanto para el hombre como para los animales. Las micotoxinas son producidas por mohos (micromicetes filamentosos) que pueden contaminar alimentos, piensos, o las materias primas empleadas para su manufactura. Estos metabolitos se encuentran asociados a un amplio rango de enfermedades. Algunas micotoxinas son carcinógenas, pueden causar toxicidad aguda o crónica, problemas en el desarrollo de los animales o rechazo del alimento por los mismos y pueden afectar también al hombre. Son en general muy estables y difíciles de destruir. Las aflatoxinas, potentes cancerígenos producidos por *Aspergillus flavus* y especies relacionadas, son las micotoxinas consideradas de mayor importancia.

Los mohos se desarrollan sobre distintos sustratos y frecuentemente no producen las características descomposiciones putrefactivas asociadas a las bacterias; de este modo, diversos alimentos contaminados con micotoxinas pueden consumirse inadvertidamente. Ciertos productos primarios, como por ejemplo cereales y oleaginosas, son particularmente susceptibles al deterioro fúngico y a la contaminación con micotoxinas (Smith & Moss, 1985).

La actividad fúngica puede causar un rápido deterioro de los granos, tanto en términos de calidad como de pérdida de valor nutritivo, cambios bioquímicos, como el incremento en el contenido de ácidos grasos o la contaminación con micotoxinas. Las esporas de los hongos también pueden representar un riesgo para la salud de los

trabajadores agrícolas a través de infecciones e.g., *A. fumigatus*, o alergias e.g., enfermedades pulmonares de los granjeros (Magan & Lacey, 1989).

### **1.2.2. Hongos del campo y hongos del almacenamiento**

Los hongos contaminantes de granos han sido clasificados en dos grupos: “hongos del campo” y “hongos del almacenamiento” (Christensen & Kauffman, 1969). Los primeros característicamente colonizan los granos en el campo, cuando las plantas están fructificando, y deterioran tanto a los frutos que invaden, como a las plantas que surgen de los frutos invadidos. Se desarrollan en condiciones de elevada disponibilidad de agua, antes de la cosecha, aunque en ocasiones también afectan a los granos durante el momento de la cosecha y sólo raramente desarrollan después, en la etapa de almacenamiento (Christensen, 1991). Entre ellos se incluyen especies de *Alternaria*, *Cladosporium* y *Fusarium*. Con alta humedad, especies de *Aspergillus* pueden también desarrollar en cultivos maduros y la ocurrencia de *A. flavus* puede asociarse con la ocurrencia de aflatoxinas en la etapa precosecha (Lacey & Magan, 1991).

Por el contrario, los hongos del almacenamiento son escasos antes de la cosecha, a menudo no detectables por los métodos corrientes de enumeración, pero desarrollan rápidamente durante el almacenamiento cuando las condiciones son favorables. Como estos organismos están adaptados para desarrollarse en ambientes con baja disponibilidad de agua, si el almacenamiento no se practica adecuadamente pueden infectar los granos y reducir su calidad. Entre estos últimos se encuentran especies de *Aspergillus*, *Penicillium* y *Mucor*. Además puede producirse un aumento en el inóculo durante la cosecha, el secado, y cuando el grano es almacenado en lugares contaminados (Magan & Lacey, 1989).

El concepto de hongos del campo y del almacenamiento fue inicialmente desarrollado en regiones templadas. Estudios en los trópicos húmedos sugieren que una división tan rígida puede no ser sostenible. La contaminación de maní, sorgo y maíz con especies de *Aspergillus* y *Penicillium*, especialmente *A. flavus*, y la producción de micotoxinas pueden ocurrir antes de la cosecha (Hill *et al.*, 1985). Frecuentemente han sido aisladas cepas de *A. flavus* de semillas y vainas en el campo. El estrés por sequía, un bajo contenido de humedad, un grado excesivo de madurez y la disminución del vigor de la planta son factores que contribuyen a aumentar la susceptibilidad a la invasión por *A. flavus* y a la contaminación con aflatoxinas del maní en el campo (Mehan *et al.*, 1991).

Al momento de la cosecha, las vainas maduras contienen una compleja combinación de microorganismos, la microflora, que incluye a *A. flavus*. Cuando estas vainas de maní infestadas son levantadas del suelo para ser curadas y secadas, están sujetas a condiciones ambientales rápidamente cambiantes, que pueden causar cambios en las especies fúngicas dominantes y subdominantes sobre y dentro de las vainas. Cuando los maníes de alta humedad son curados o secados, puede haber considerable invasión de las semillas por *A. flavus* y otros hongos establecidos previamente en la vaina. Esto se ve favorecido si el secado es lento y las semillas permanecen en el susceptible rango del 12 al 30% en contenido de humedad por períodos extensos. En climas cálidos y húmedos, el tiempo de secado se extiende y el riesgo de contaminación con aflatoxinas aumenta. Una exposición a la lluvia inmediatamente después de la cosecha no es particularmente nociva, pero si ocurre después de que los maníes están parcialmente secos, seguido de un secado posterior deficiente, resultará probablemente en una contaminación con aflatoxinas (Mehan *et al.*, 1991).

La infección con *A. flavus* y la contaminación con aflatoxinas puede incrementarse en el maní durante el almacenamiento hasta que su contenido de humedad desciende por debajo del 9%. Aumentos en el contenido acuoso por rehumedecimiento durante el almacenamiento o por exposición a humedades elevadas por periodos prolongados resultan en una rápida invasión por *A. flavus* con la subsecuente producción de aflatoxinas (Mehan *et al.*, 1991).

En consecuencia, entre los hongos que afectan al maní, el género *Aspergillus* reviste particular importancia, por estar presente en todas las etapas del cultivo, desde el campo hasta el almacenamiento, y por el peligro potencial de contaminación con micotoxinas.

### **1.2.3. El género *Aspergillus***

El género *Aspergillus* fue descrito por primera vez hace casi 300 años, y ha sido siempre reconocido como un género importante.

Las especies de este género se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza pudiéndose aislar de una gran variedad de sustratos. Gracias a la facilidad de dispersión de sus conidios y a su pequeño tamaño, éstos pueden permanecer en suspensión en el ambiente durante un largo periodo de tiempo. Las especies de *Aspergillus* son muy comunes en el ambiente, principalmente en suelos y vegetación deteriorada.

Un gran número de especies está también estrechamente relacionado con alimentos humanos, particularmente cereales y nueces (Pitt & Hocking, 1985). Si bien algunas especies se utilizan en la producción de alimentos (e.g. *A. oryzae* en la manufactura de salsa de soja), la mayoría de las especies de *Aspergillus* aparecen en los

alimentos como hongos de deterioro (Hocking, 1997). Muchas de ellas son xerófilas, y capaces de deteriorar alimentos que apenas exceden los límites seguros de humedad.

La relación entre *Aspergillus* y el deterioro de alimentos ha sido establecido hace tiempo; la era moderna de la micotoxicología comenzó en 1960 con la ocurrencia de la “Turkey X disease” (enfermedad X de los pavos) en el Reino Unido y el subsecuente descubrimiento de que *A. flavus* era altamente toxicogénico. Las especies micotoxicogénicas más importantes dentro del género son *A. flavus* y *A. parasiticus*, que producen aflatoxinas, *A. ochraceus* (ocratoxina) y *A. versicolor* (esterigmatocistina) (ICMSF, 1996). *A. niger*, una especie ampliamente distribuida en la naturaleza y utilizada para la producción industrial de ácidos orgánicos y enzimas, ha sido recientemente caracterizada como productora de ocratoxina, al igual que otras especies relacionadas (*A. carbonarius*) (Abarca *et al.*, 2001).

#### I.2.3.1. Taxonomía

*Aspergillus* es un género de *Hyphomycetes*, que contiene más de 100 especies reconocidas, la mayoría de las cuales crecen y esporulan bien en medios sintéticos comunes o medios semisintéticos.

La taxonomía más ampliamente utilizada ha sido la de Raper & Fennell (1965). En esta monografía se aceptaban 132 especies subdivididas en 18 grupos. Samson (1979) realizó una recopilación de las especies y variedades descritas posteriormente, con una revisión crítica sobre la validez de los taxones publicados.

La sistemática actual de *Aspergillus* se ha visto enormemente influida por los trabajos presentados en dos reuniones científicas dedicadas exclusivamente a los géneros *Penicillium* y *Aspergillus*. En ellas se realizaron importantes contribuciones

multidisciplinares a la taxonomía del género, y en especial se revisó su nomenclatura siguiendo las normas del código internacional de nomenclatura botánica (ICBN). La monografía de Raper & Fennell (1965) presentaba serios problemas de adecuación a dicha normativa, ya que no se había tenido en cuenta la prioridad de los nombres más antiguos y las nuevas especies descritas no estaban tipificadas (Abarca, 2000).

Estos errores fueron corregidos por Samson & Gams (1985) y Kozakiewicz (1989) quienes tipificaron y nombraron correctamente a todas las especies. Además, la clasificación intragenérica en grupos no es aceptada por el ICBN, por lo que Gams *et al.* (1985) reclasificaron el género y lo dividieron en seis subgéneros, cada uno de los cuales está dividido a su vez en una o más secciones (Tabla I.2) que se corresponden con los grupos descritos por Raper & Fennell (1965).

Una taxonomía moderna de las especies más comunes de *Aspergillus*, incluyendo aquellas de importancia en alimentos, es provista por Klich & Pitt (1988a).

**Tabla I.2. Clasificación actual del género *Aspergillus*<sup>a</sup>**

Subgénero	Sección	Sinónimo <sup>b</sup>	Especie tipo	Teleomorfo
<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i>	Grupo <i>A. glaucus</i>	<i>A. glaucus</i>	<i>Eurotium</i>
	<i>Restricti</i>	Grupo <i>A. restrictus</i>	<i>A. restrictus</i>	
<i>Fumigati</i>	<i>Fumigati</i>	Grupo <i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>Neosartorya</i>
	<i>Cervini</i>	Grupo <i>A. cervinus</i>	<i>A. cervinus</i>	
<i>Ornati</i>		Grupo <i>A. ornatus</i>	<i>A. ornatulus</i>	<i>Warcupiella</i> , <i>Sclerocleista</i> , <i>Hemicarpeneteles</i>
<i>Clavati</i>	<i>Clavati</i>	Grupo <i>A. clavatus</i>	<i>A. clavatus</i>	-
<i>Nidulantes</i>	<i>Nidulantes</i>	Grupo <i>A. nidulans</i>	<i>A. nidulans</i>	<i>Emericella</i>
	<i>Versicolores</i>	Grupo <i>A. versicolor</i>	<i>A. versicolor</i>	
	<i>Usti</i>	Grupo <i>A. ustus</i>	<i>A. ustus</i>	
	<i>Terrei</i>	Grupo <i>A. terreus</i>	<i>A. terreus</i>	-
	<i>Flavipedes</i>	Grupo <i>A. flavipes</i>	<i>A. flavipes</i>	<i>Fennellia</i>
<i>Circumdati</i>	<i>Wentii</i>	Grupo <i>A. wentii</i>	<i>A. wentii</i>	
	<i>Flavi</i>	Grupo <i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>	
	<i>Nigri</i>	Grupo <i>A. niger</i>	<i>A. niger</i>	
	<i>Circumdati</i>	Grupo <i>A. ochraceus</i>	<i>A. ochraceus</i>	<i>Petromyces</i>
	<i>Candidi</i>	Grupo <i>A. candidus</i>	<i>A. candidus</i>	
	<i>Cremeri</i>	Grupo <i>A. cremeus</i>	<i>A. cremeus</i>	<i>Chaetosartorya</i>
	<i>Sparsi</i>	Grupo <i>A. sparsus</i>	<i>A. sparsus</i>	-

a: adaptada de Gams *et al.* (1985)

b: grupos establecidos por Raper y Fennell (1965)

Algunas de las especies pueden reproducirse sexualmente. Las formas perfectas de *Aspergillus* se incluyen en los géneros *Chaetosartorya*, *Emericella*, *Eurotium*, *Fennellia*, *Hemicarpeneteles*, *Neosartorya*, *Petromyces*, *Sclerocleista* y *Warcupiella*. Estos estados teleomórficos se encuentran en la familia *Trichocomaceae*, del orden de los *Eurotiales*, perteneciente al *phylum Ascomycota* (Abarca, 2000). Si bien existe un gran número de géneros teleomórficos (ascospóricos) que tienen estados conidiales *Aspergillus*, los únicos de real importancia en alimentos son el género xerófilo *Eurotium* (anteriormente conocido como el grupo *Aspergillus glaucus*), especies de *Neosartorya*,

que producen ascosporas termorresistentes y pueden causar deterioro en alimentos procesados por calor, principalmente en productos a base de frutas, y el género *Emericella*, que aunque no es muy común en alimentos, ha sido aislado de una amplia variedad de sustratos, entre ellos los cereales y derivados (Pitt & Hocking, 1985).

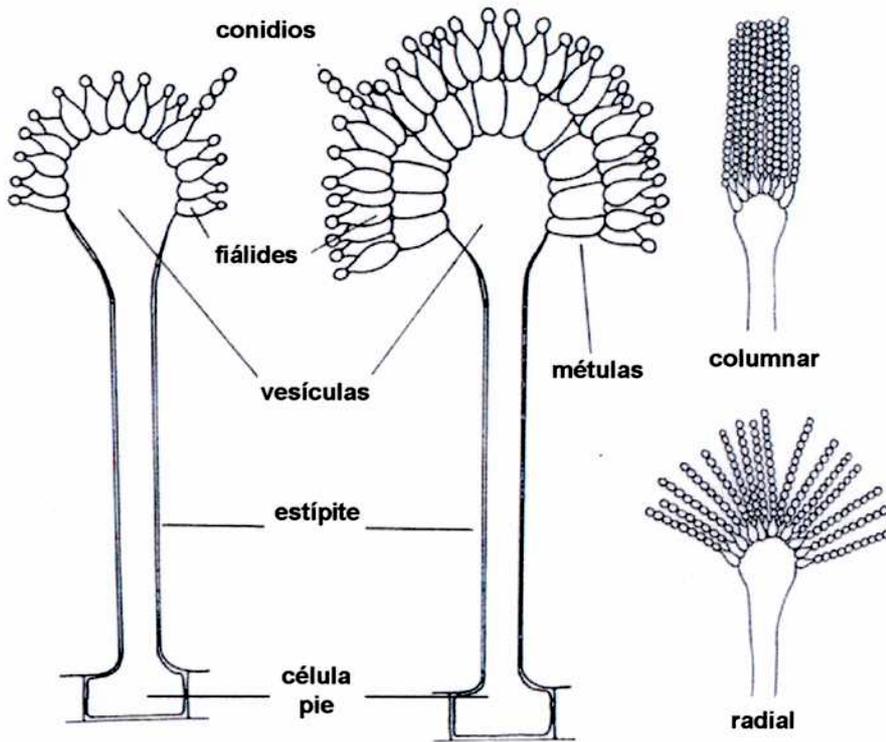
#### I.2.3.2. Aislamiento y enumeración

Existen numerosas técnicas para el aislamiento y enumeración de especies de *Aspergillus* a partir de alimentos. Los medios recomendados para contar hongos en alimentos son los medios antibacterianos que contienen compuestos para inhibir o reducir la expansión de las colonias, como el agar Diclorán Rosa de Bengala Cloranfenicol (DRBC) o el agar Diclorán-18% Glicerol (DG18) (Pitt & Hocking, 1985a).

#### I.2.3.3. Identificación

La identificación de especies de *Aspergillus* requiere el crecimiento en medios especialmente desarrollados para dicho propósito. Se pueden hallar claves y descripciones de las especies comunes de *Aspergillus* en Pitt & Hocking (1985), y en Klich & Pitt (1988a). El agar Czapek, un medio definido basado en sales minerales, o un derivado como el agar Czapek Extracto de Levadura 20% Sacarosa pueden ser de utilidad para identificar especies de *Aspergillus* (Klich & Pitt, 1988a).

*Aspergillus* es un género mitospórico que se caracteriza por la producción de hifas especializadas, denominadas conidióforos, sobre los que se encuentran las células conidiógenas que originarán las esporas asexuales o conidios (Figura I.4).



**Figura I.4. Estructuras morfológicas del género *Aspergillus***

El conidióforo característico de *Aspergillus*, aunque es una estructura unicelular posee tres partes bien diferenciadas: vesícula (extremo apical hinchado), estípite (sección cilíndrica situada debajo de la vesícula) y célula pie (sección final, a veces separada por un septo, que une el conidióforo con el micelio). Las vesículas son normalmente esféricas, pero pueden ser elongadas o menos notoriamente hinchadas en unas pocas especies. Sobre la vesícula se disponen las células conidiógenas, denominadas habitualmente fiálides. En muchas especies, entre la vesícula y las fiálides se encuentran otras células denominadas metulas.

La clasificación del género *Aspergillus* en subgéneros y secciones está basada fundamentalmente en cuatro características: presencia de teleomorfo, presencia o ausencia de metulas; disposición de las metulas o fiálides sobre la vesícula y coloración

de las colonias. A diferencia de las especies de *Penicillium*, las especies de *Aspergillus* están convenientemente “codificadas por color”, y el color de los conidios puede ser un útil punto de partida en la identificación, al menos hasta el nivel de sección. Al igual que el color de los conidios, la morfología microscópica es importante en la identificación. Como se ha mencionado, las vesículas soportan fiálides, o métulas y fiálides, que característicamente nacen todas simultáneamente (figura I.5). Esta característica distingue inequívocamente a *Aspergillus* de *Penicillium* y otros géneros. La producción de fiálides en *Penicillium* y géneros relacionados es siempre sucesiva, no simultánea. Otras dos útiles características de la mayoría, aunque no todas las especies de *Aspergillus* son: primero, los estípites se forman generalmente a partir de una célula corta denominada “célula pie” dentro de una hifa fértil; segundo, los estípites son mayormente no septados, de manera que la vesícula, el estípite y la célula pie forman una única “célula” grande. Los estípites de *Penicillium* son generalmente septados y las células pie son poco frecuentes (Abarca, 2000; Hocking, 1997; Pitt & Hocking, 1997).

La correcta identificación de las especies de *Aspergillus* es un prerequisite esencial para evaluar el potencial de contaminación con micotoxinas en una materia prima, alimentos para animales o destinados al consumo humano.



**Figura I.5. Producción simultánea de fiálides en el género *Aspergillus***

#### I.2.3.4. Toxicidad

Casi 50 especies han sido mencionadas como capaces de producir metabolitos tóxicos (Cole & Cox, 1981), pero las micotoxinas de *Aspergillus* de mayor implicancia en alimentos para humanos y animales son las aflatoxinas, producidas por *A. flavus*, *A. parasiticus* y *A. nomius*; la ocratoxina A, producida por *A. ochraceus*, *A. niger* y especies relacionadas; la esterigmatocistina, producida principalmente por *A. versicolor*, pero también por especies de *Emericella*; y el ácido ciclopiazónico, cuya principal fuente es *A. flavus*, aunque se ha reportado también su producción por *A. tamaritii*. Citrinina, patulina y ácido penicílico son toxinas que también pueden ser producidas por algunas especies de *Aspergillus*, y las toxinas tremorgénicas son producidas por *A. terreus*, *A. fumigatus*, y *A. clavatus*. La tabla I.3 muestra las principales toxinas producidas por especies de *Aspergillus* y sus efectos tóxicos.

**Tabla I.3. Principales micotoxinas producidas por especies de *Aspergillus* y sus efectos tóxicos**

Micotoxinas	Toxicidad	Especies productoras
Aflatoxinas B <sub>1</sub> y B <sub>2</sub>	Daño agudo del hígado, cirrosis, carcinogénicas (hígado), teratogénicas, inmunosupresivas	<i>A. flavus</i> , <i>A. parasiticus</i> , <i>A. nomius</i>
Aflatoxinas G <sub>1</sub> y G <sub>2</sub>	Efectos similares a los de aflatoxinas B, siendo G <sub>1</sub> menos tóxica que B <sub>1</sub> pero más que B <sub>2</sub>	<i>A. parasiticus</i> , <i>A. nomius</i>
Ac. ciclopiazónico	Degeneración y necrosis de varios órganos, tremorgénico, baja toxicidad oral	<i>A. flavus</i> , <i>A. tamarii</i>
Ocratoxina A	Necrosis de riñón (especialmente en cerdos), teratogénica, inmunosupresiva, carcinogénica	<i>A. ochraceus</i> , <i>A. niger</i> y especies relacionadas
Esterigmatocistina	Daño agudo de hígado y riñón, carcinogénica (hígado)	<i>A. versicolor</i> , <i>Emericella</i> spp.
Fumitremorgenos	Tremorgénicos (ratas y ratones)	<i>A. fumigatus</i>
Territrems	Tremorgénicos (ratas y ratones)	<i>A. terreus</i>
Triptoquivalinas	Tremorgénicos	<i>A. clavatus</i>
Citocalasinas	Citotóxicas	<i>A. clavatus</i>
Equinulinas	Rechazo del alimento (cerdos)	<i>Eurotium chevalieri</i> , <i>E. amstelodami</i>

(Hocking, 1997)

#### 1.2.4. *Aspergillus* sección *Flavi*

Indudablemente, el grupo más importante de *Aspergillus* toxicogénicos son los mohos aflatoxigénicos, *A. flavus* y *A. parasiticus*, y la recientemente descrita, pero mucho menos común especie *A. nomius*, los cuales están clasificados en la sección *Flavi* (Gams *et al.*, 1985).

*A. flavus* y *A. parasiticus* son especies establecidas hace mucho tiempo y bien definidas. La especie *A. flavus* data de 1806 y *A. parasiticus* de 1912. Sin embargo, el descubrimiento de que ambas especies producen potentes carcinógenos (aflatoxinas) es relativamente reciente. Las aflatoxinas se descubrieron en 1960, investigando la muerte de 100.000 pavos jóvenes en el Reino Unido y grandes números de patos jóvenes en Kenia, casi simultáneamente con el descubrimiento de un hepatoma ampliamente distribuido en truchas de criadero en California.

##### 1.2.4.1. Taxonomía

*A. flavus* y *A. parasiticus* fueron clasificados por Raper & Fennell (1965) como pertenecientes al “grupo *Aspergillus flavus*”, un término incorrecto que ha sido reemplazado por el término más correcto desde el punto de vista de la nomenclatura: “*Aspergillus* sección *Flavi*” (Gams *et al.*, 1985). *A. flavus* y *A. parasiticus* están estrechamente relacionados a *A. oryzae* y *A. sojae*, especies importantes en la manufactura de alimentos fermentados en Asia, pero no productores de aflatoxinas. Por razones obvias, una diferenciación precisa de estas cuatro especies es muy importante.

#### I.2.4.2. Aislamiento y enumeración

Un recuento satisfactorio de *A. flavus* y *A. parasiticus* puede realizarse en cualquier medio de enumeración antibacteriano que contenga inhibidores apropiados para reducir la extensión de las colonias. Los más recomendados son DRBC y DG18 (Pitt & Hocking, 1985, Samson *et al.*, 1992). Las colonias amarillo-verdosas, moderadamente profundas, de crecimiento relativamente rápido, que exhiben estructuras fructificantes “parecidas a un lampazo” bajo el microscopio pueden ser contadas como *A. flavus* o *A. parasiticus*. La examinación microscópica de las colonias pueden proveer evidencia adicional, pero debe haber crecimiento de colonias representativas en los medios estándares de identificación para su confirmación.

#### I.2.4.3. Identificación

La diferenciación de cepas de *Aspergillus* sección *Flavi* de casi todo el resto de las especies no es dificultosa. Estas especies crecen rápidamente en los medios estándares de identificación, como agar Czapek, agar Extracto de Malta (MEA) y agar Czapek Extracto de Levadura (CYA) (Pitt & Hocking, 1985), y producen conidios verde-amarillentos en colonias que, de no estar éstos presentes, son incoloras (Raper & Fennell, 1965; Pitt & Hocking, 1985).

Distinguir a *A. flavus* de *A. parasiticus* y *A. nomius* es más difícil. La textura de las paredes conidiales es una confiable característica de diferenciación: las paredes de los conidios de *A. flavus* son generalmente lisas a finamente rugosas, mientras que las de *A. parasiticus* son claramente rugosas al observarse a una magnificación de 1000x. También existen otras características variables de valor taxonómico.

La diferenciación de estas dos especies es importante, ya que *A. flavus* generalmente produce aflatoxinas tipo B solamente y menos del 50% de las cepas son toxicogénicas, mientras que las cepas de *A. parasiticus* elaboran aflatoxinas del tipo G además del B y casi todas son toxicogénicas (Klich & Pitt, 1988b). Las cepas de *A. flavus* también producen frecuentemente otra micotoxina, el ácido ciclopiazónico (CPA), pero éste no es producido por *A. parasiticus*. *A. nomius* es morfológicamente similar a *A. flavus* pero, al igual que *A. parasiticus* produce aflatoxinas B y G sin CPA. Debido a que esta especie parece ser muy poco común, no ha sido muy estudiada; por lo tanto el potencial de toxigenicidad de las cepas es desconocido, y la importancia práctica de esta especie es difícil de evaluar.

El examen del patrón de producción de aflatoxinas puede ser utilizado para diferenciar las especies. Las cepas pueden cultivarse en agar crema de coco y observarse bajo la luz UV (Dyer & McCammon, 1994), o pueden utilizarse técnicas simples de “screening” combinadas con cromatografía en capa delgada (TLC) (Filtenborg *et al.*, 1983). Las combinaciones de las características más útiles para la diferenciación entre las tres especies aflatoxigénicas se muestran en la tabla I.4.

Otra característica diferencial de las especies de esta sección es la producción de esclerocios, estructuras de resistencia relacionadas con la diseminación y supervivencia del hongo. Las cepas de *A. flavus* pueden ser divididas en dos grupos. Las cepas S (“small”), se caracterizan por producir gran cantidad de esclerocios pequeños (< 400µm de diámetro) y generalmente producen altos niveles de aflatoxinas. Cepas con estas características han sido consideradas como atípicas (Saito *et al.*, 1986) y también denominadas *A. flavus* var. *parvisclerotigenus* (Saito & Tsuruta, 1993). Las cepas L

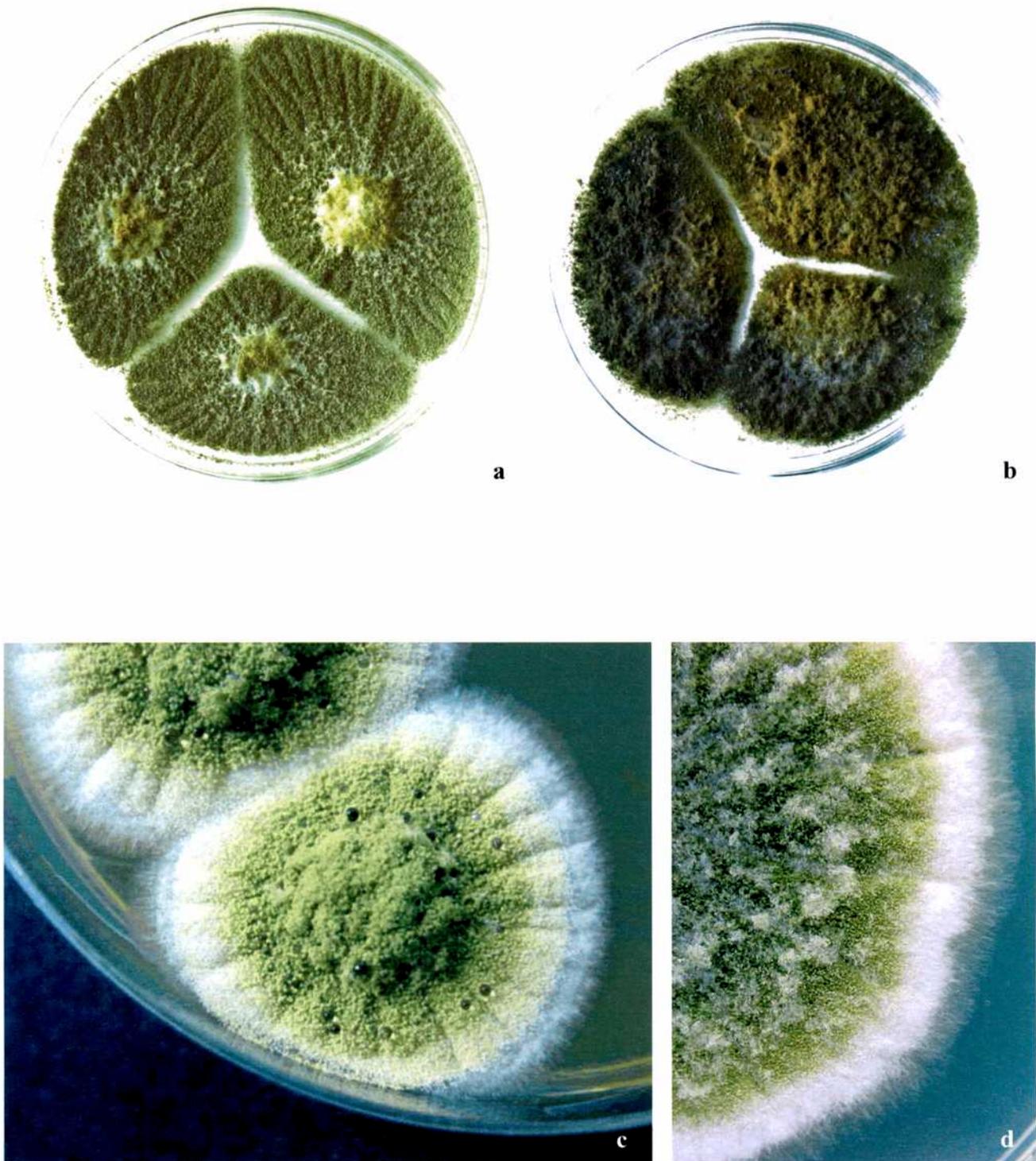
(“large”) producen menor cantidad de esclerocios de mayor tamaño ( $> 400\mu\text{m}$  de diámetro) y menor cantidad de aflatoxinas (Saito *et al.*, 1986; Bayman & Cotty, 1993).

La diferenciación precisa de estas especies relacionadas dentro de la sección *Flavi* es importante para determinar el potencial de producción de toxinas y los tipos de toxinas que pueden estar presentes cuando éstas contaminan los alimentos.

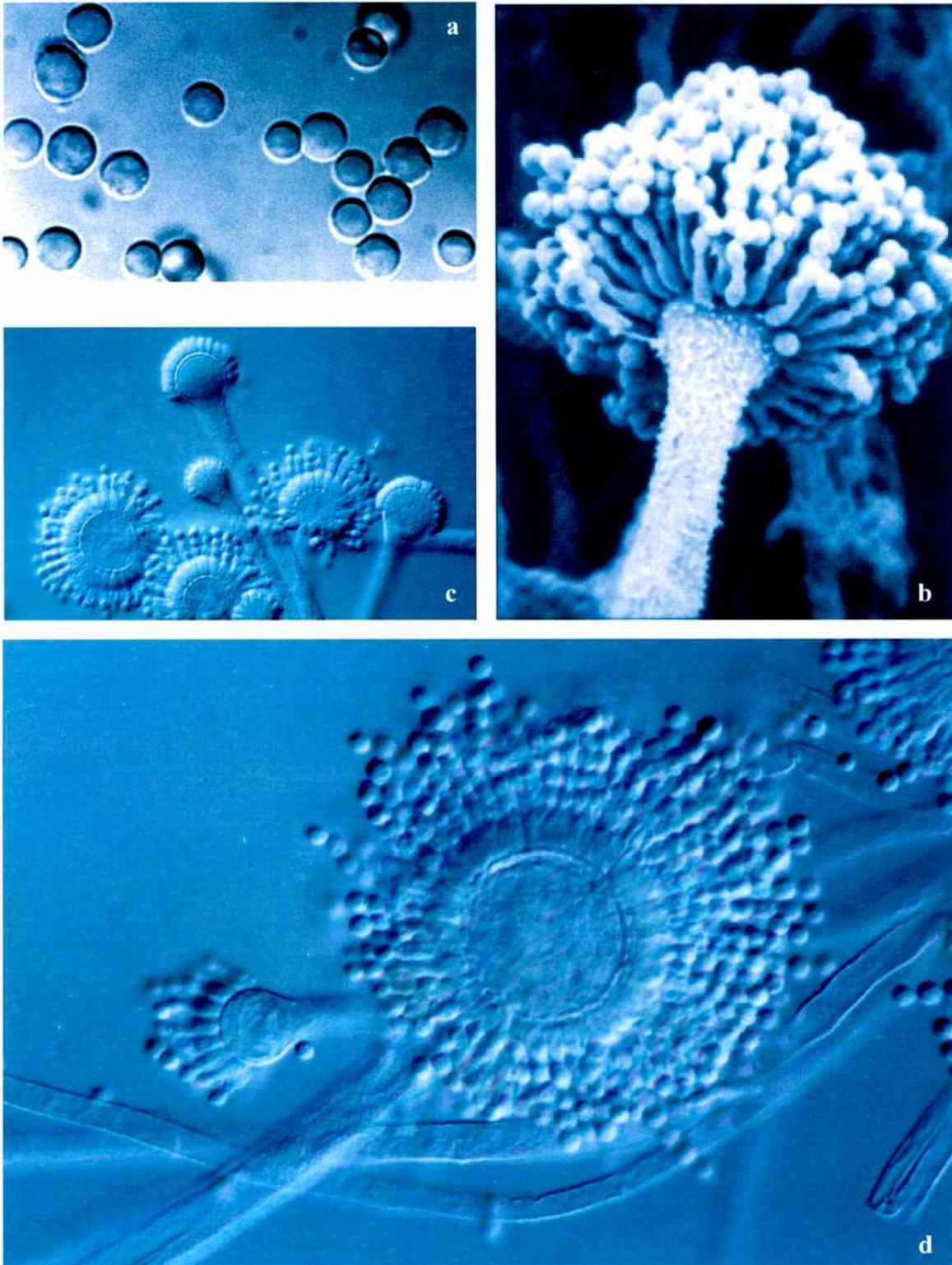
**Tabla I.4. Características diferenciales de *A. flavus*, *A. parasiticus* y *A. nomius***

Especie	Conidios	Esclerocios	Toxinas
<i>A. flavus</i>	Lisos a moderadamente rugosos, variables en tamaño	Grandes o pequeños, globosos	AFB <sub>1</sub> , AFB <sub>2</sub> , CPA
<i>A. parasiticus</i>	Visiblemente rugosos, pequeña variación en tamaño	Grandes, globosos	AFB y AFG
<i>A. nomius</i>	Similares a <i>A. flavus</i>	Pequeños, elongados (en forma de balas)	AFB y AFG

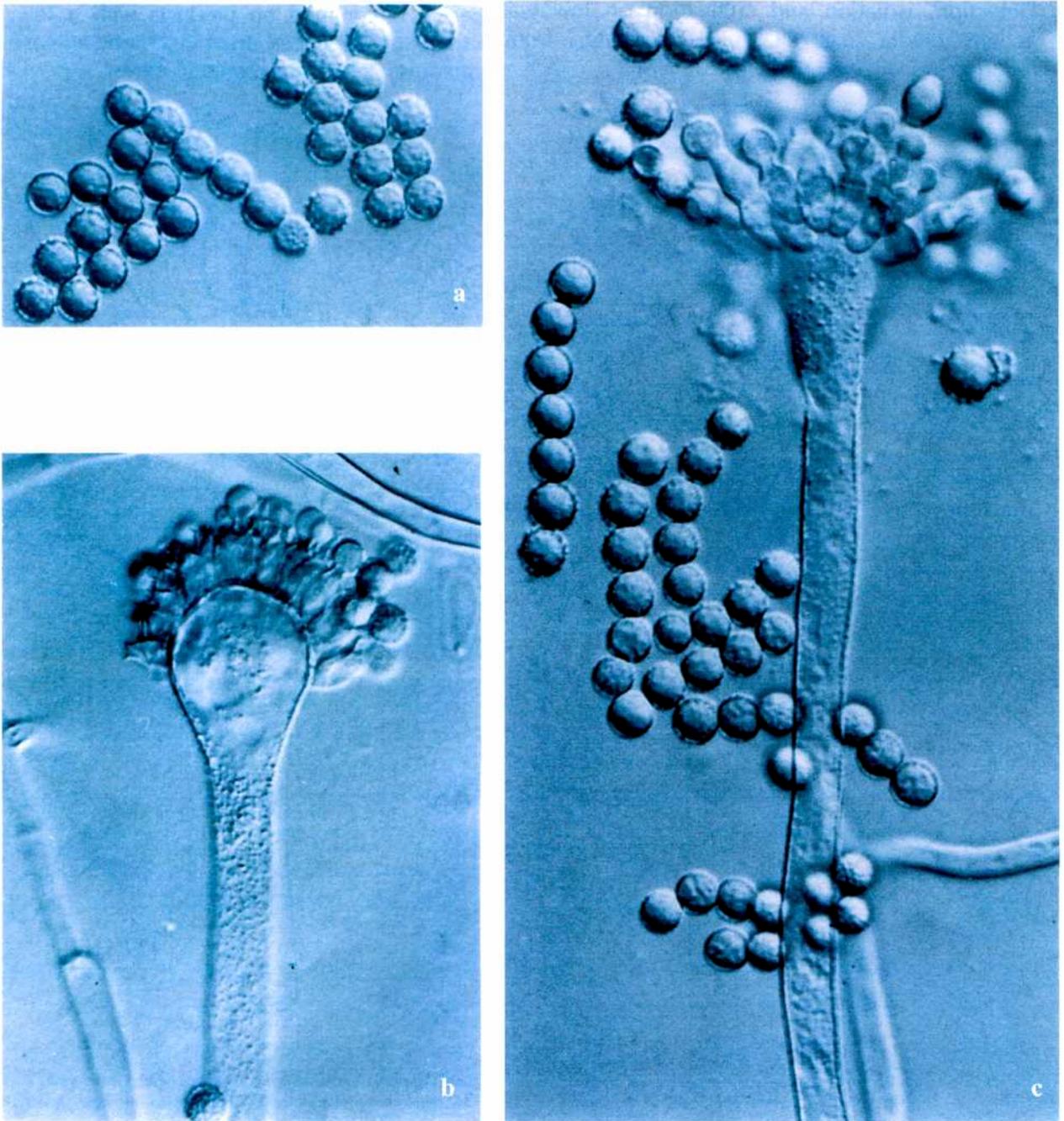
(Hocking, 1997)



**Figura I.6. Colonias de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*. a) Colonia de *A. flavus* en CYA; b) Colonia de *A. parasiticus* en CYA; c) detalle de colonia de *A. flavus*; d) detalle de colonia de *A. parasiticus*.**



**Figura I.7. Características microscópicas de *A. flavus*. a) Conidios; b) Vesícula; c) Vesículas con métulas y fiálides en desarrollo; d) Cabezuela madura.**



**Figura I.8. Características microscópicas de *A. parasiticus*. a) Conidios; b) Vesícula; c) Estípite, vesícula y conidios.**

#### I.2.4.4. Toxinas

##### A. Aflatoxinas

Las aflatoxinas son metabolitos secundarios con una extremadamente alta actividad biológica, producidos en la naturaleza solo por *Aspergillus* sección *Flavi*, es decir por *A. flavus*, *A. parasiticus* y la especie más recientemente descubierta, *A. nomius*. Las cuatro principales aflatoxinas producidas naturalmente son B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub>. Las letras B y G se refieren a los colores fluorescentes azul (blue) y verde (green) producidos por estos compuestos bajo la luz UV en las placas de cromatografía delgada, mientras que los subíndices 1 y 2 se refieren al patrón de separación en las placas de cromatografía. Cuando las aflatoxinas B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub> son ingeridas por vacas lecheras, una proporción de alrededor del 1% es hidrolizada y excretada en leche como aflatoxinas M<sub>1</sub> y M<sub>2</sub>, que son compuestos de menor toxicidad que las moléculas predecesoras pero de gran importancia por el consumo de leche de vaca por infantes. Debido a su alta toxicidad, en la mayoría de los países se han establecido bajos límites para aflatoxinas en alimentos para humanos y animales (ICMSF, 1996).

##### A.1. Estructura

Las aflatoxinas son derivados de las difuranocumarinas (Büchi & Rae, 1969), es decir, contienen un núcleo cumarina fusionado a un bifurano y a una estructura pentanona en el caso de las aflatoxinas B, que está sustituida por una lactona de seis miembros en las aflatoxinas G. Las aflatoxinas M<sub>1</sub> y M<sub>2</sub> son el producto metabólico hidroxilado de las B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub> (figura I.9). En estado puro son polvos cristalinos que se descomponen al alcanzar el punto de fusión (B<sub>1</sub>:268-269°C; B<sub>2</sub>: 286-289°C; G<sub>1</sub>:244-246°C; B<sub>2</sub>: 237-240°C) (Detroy *et al.*, 1971)

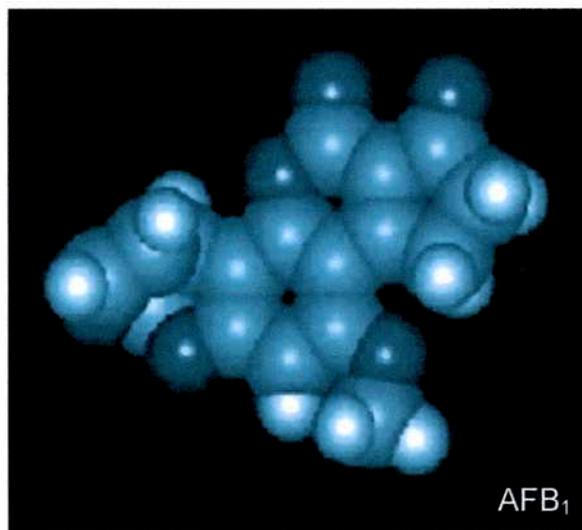
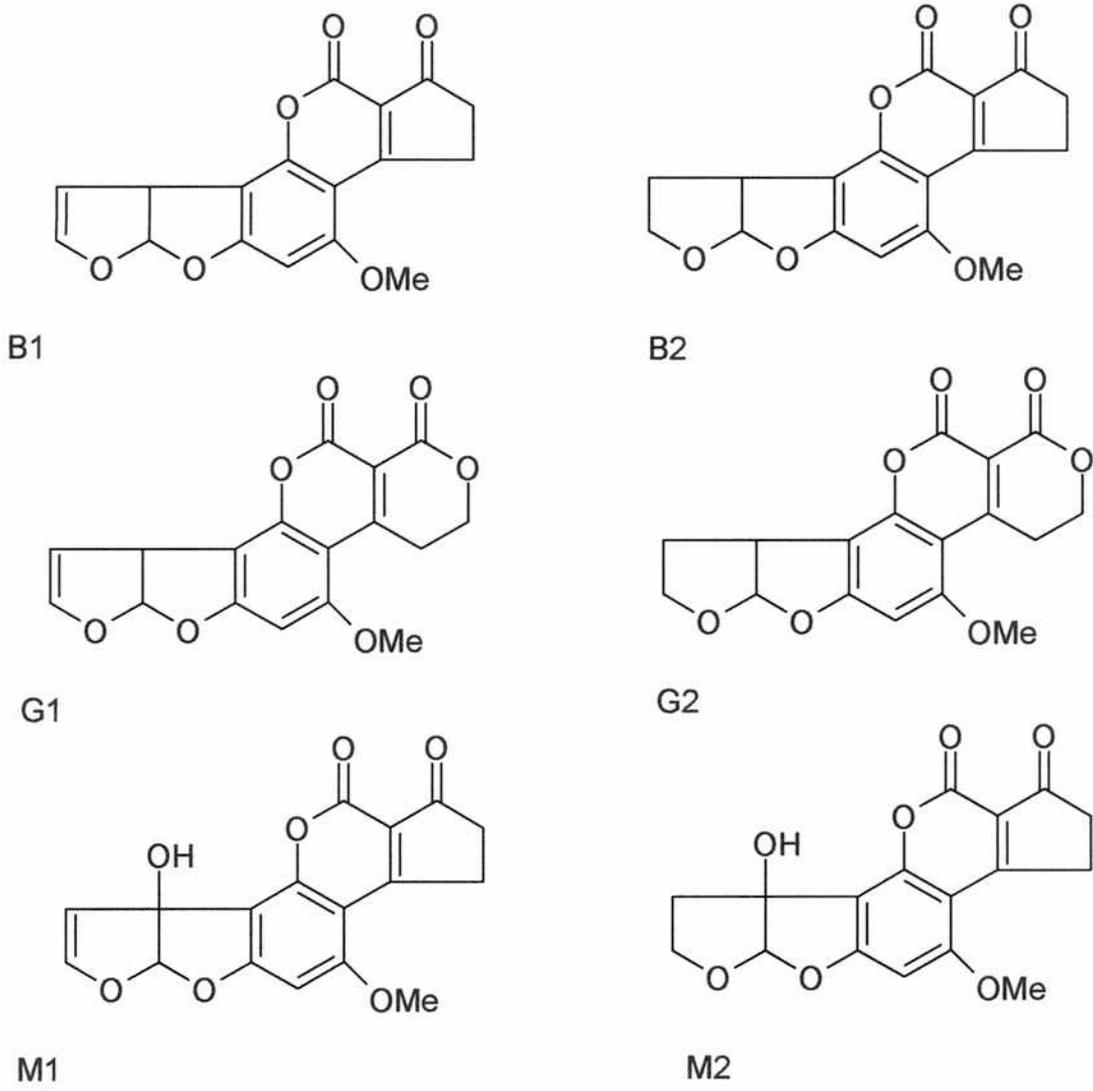


Figura I.9. Estructura química de las aflatoxinas y modelo molecular de AFB<sub>1</sub>

## A.2. Toxicidad

Las aflatoxinas son tóxicas tanto en forma aguda como crónica en animales y el hombre. Producen distintos efectos, tales como daño agudo en el hígado, cirrosis, inducción de tumores y teratogénesis. (Stoloff, 1977). Quizás la mayor importancia de las aflatoxinas en la salud humana son sus efectos inmunosupresores, ya sea solas o en combinación con otras micotoxinas (Pier, 1991). La inmunosupresión puede incrementar la susceptibilidad a las enfermedades infecciosas, especialmente en poblaciones en las cuales la ingestión de aflatoxinas es crónica, y puede interferir con la producción de anticuerpos en respuesta a la inmunización en animales y probablemente también en niños (Hocking, 1997).

La toxicidad aguda en humanos después de la ingestión de aflatoxinas ha sido observada raramente (Shank, 1978). En 1967, 26 taiwaneses en dos comunidades rurales se enfermaron de una aparente intoxicación alimentaria. Diecinueve eran niños, de los cuales tres murieron. Aunque no se realizaron exámenes post-mortem, el arroz de los hogares afectados contenía alrededor de 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de  $\text{AFB}_1$ , y ésta fue probablemente responsable de la epidemia.

En 1974 una epidemia de hepatitis que afectó a 400 personas en la India, de los cuales 100 fallecieron, fue muy probablemente producida por aflatoxinas (Krisnamachari *et al.*, 1975). La epidemia fue rastreada hasta el maíz fuertemente contaminado con *A. flavus* que contenía hasta 15  $\text{mg}/\text{kg}$  de aflatoxinas. El consumo de las toxinas por algunos de los adultos afectados fue estimado entre 2-6  $\text{mg}$  por día, por lo cual se concluyó que la dosis letal aguda para humanos adultos es del orden de 10 $\text{mg}$ .

Más recientemente, se reportaron las muertes de 13 niños chinos en el estado de Perak, al noroeste de Malasia, aparentemente debidas a la ingestión de fideos

contaminados (Lye *et al.*, 1995). La presencia de aflatoxinas fue confirmada en muestras post-mortem de tejidos de los pacientes.

Una enfermedad infantil del Norte de Africa y otros lugares (kwashiorkor), también conocida como malnutrición por falta de energía proteica, es normalmente atribuida a deficiencias nutricionales, pero se demostró que también puede estar relacionada con la ingesta de aflatoxinas (Hendrickse *et al.*, 1982). El daño hepático inducido por aflatoxinas puede causar en niños con kwashiorkor una reducción en la capacidad de asimilar las dietas elevadas en proteínas que se suelen recomendar para la cura de esta enfermedad (Newell, 1983).

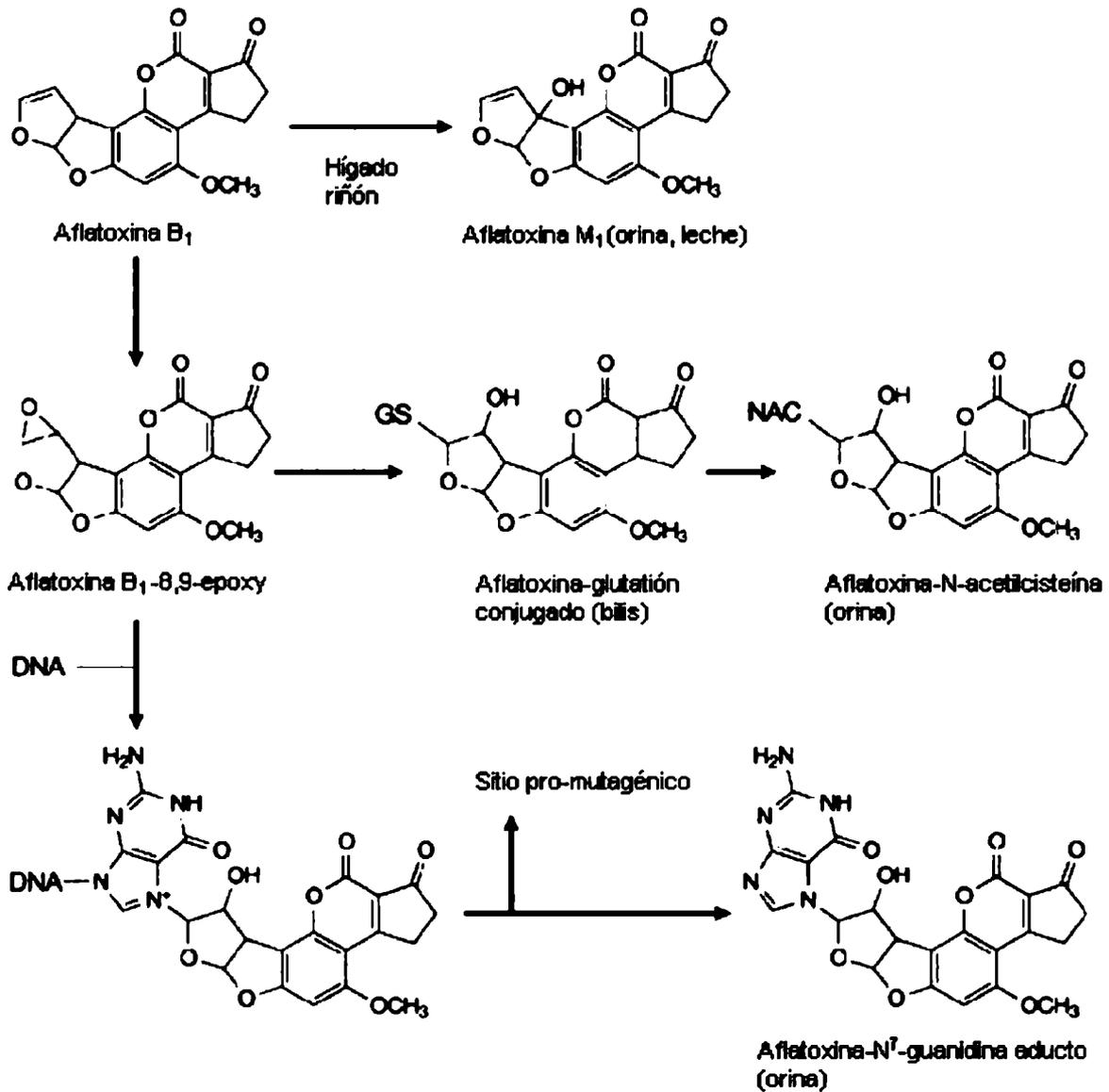
Se ha demostrado que la aflatoxina B<sub>1</sub> es el más potente carcinógeno hepático en varias especies animales. El cáncer de hígado humano tiene una alta incidencia en Asia central y partes del sudeste de Asia, y estudios en varios países de Africa y Tailandia mostraron una correlación entre el logaritmo de la ingesta de aflatoxinas y la ocurrencia de cáncer de hígado humano (van Rensburg, 1977). Esa correlación no ha podido ser demostrada para poblaciones en áreas rurales de Estados Unidos, a pesar de la ocurrencia de considerables cantidades de aflatoxinas en maíz (Stoloff, 1983; Stoloff & Friedman, 1976). La contradicción entre las conclusiones de estos autores se resolvió en su momento por un descubrimiento posterior que sugería que la exposición al virus de la hepatitis B antes o simultáneamente era un prerrequisito para la inducción de esta forma de cáncer de hígado en humanos. Campbell (1983) demostró que las aflatoxinas y la hepatitis B son aparentemente carcinógenas y la probabilidad de cáncer de hígado en humanos es alta solamente en áreas donde ambas son frecuentes. Sin embargo, existe evidencia a favor de la hipótesis de que altas ingestas de aflatoxinas guardan relación de

causa-consecuencia con altas incidencias de cáncer, aún en ausencia de la hepatitis B (Groopman *et al.*, 1988; Hatch *et al.*, 1993, Peers *et al.*, 1987).

En animales, se ha observado que las aflatoxinas causan varios síndromes, incluyendo cáncer de hígado, colon, y riñón en ratas, ratones, monos, patos y truchas (Ellis *et al.*, 1991). Ingestas regulares de bajos niveles de aflatoxinas pueden producir bajas conversiones de alimentos, baja ganancia de peso y pobres rendimientos en la producción de leche por el ganado vacuno (Bryden, 1982). Se ha descubierto que los primates son capaces de detoxificar aflatoxinas por vías metabólicas que no existen en animales superiores (Masri, 1984). La toxicidad de las aflatoxinas en humanos es en realidad menor de lo que se suponía inicialmente. Sin embargo, su carcinogenicidad en animales es tan alta que debe realizarse todo esfuerzo posible para monitorear los niveles en alimentos humanos y para reducirlos lo más posible. Los límites regulatorios para aflatoxinas seguirán siendo establecidos a niveles muy bajos.

### A.3. Mecanismo de acción

La aflatoxina B<sub>1</sub> es metabolizada por el sistema oxidasa de función mixta microsomal en el hígado, lo que lleva a la formación de intermediarios altamente reactivos, uno de los cuales es la 2,3-epoxi-aflatoxina B<sub>1</sub> (Smith & Moss, 1985). La unión de estos intermediarios reactivos al DNA resulta en la interrupción de la transcripción y proliferación anormal de células, que conlleva a la mutagénesis o carcinogénesis (figura I.10). Las aflatoxinas inhiben también la absorción de oxígeno en los tejidos, actuando en la cadena de transporte de electrones e inhibiendo varias enzimas, lo que resulta en una producción reducida de ATP (Ellis *et al.*, 1991).



**Figura L10. Mecanismo de toxicidad de la aflatoxina B<sub>1</sub>**

#### A.4. Biosíntesis

La síntesis de aflatoxinas no tiene una función evidente en el crecimiento primario y el metabolismo de los organismos, por lo cual es considerado un proceso secundario. Todavía no se ha podido confirmar el rol biológico de las aflatoxinas en la supervivencia ecológica del microorganismo fúngico. Sin embargo, al ser tóxicas para ciertos potenciales competidores en el ecosistema, implican un beneficio en la supervivencia del hongo.

El modo de acción, metabolismo y biosíntesis de las aflatoxinas ha sido extensamente estudiado. Las aflatoxinas son producidas por una ruta biosintética común con la esterigmatocistina, a partir de un precursor policetónico (figura I.11) (Klich & Cleveland, 2000). Son sintetizadas a través de la vía de los policétidos, comenzando con la condensación de una unidad de acetilo con dos unidades de malonilo y la pérdida de dióxido de carbono (Cole, 1986). El hexanoato resultante es unido a una enzima y reacciona sucesivamente con 7 unidades de malonato para dar un intermediario policétido que es sometido a ciclación y aromatización para dar ácido norsolorínico. Este metabolito sufre una serie de reacciones de óxido-reducción altamente organizadas para formar las aflatoxinas (Ellis *et al.*, 1991).

Sin embargo, los principales pasos bioquímicos y los correspondientes componentes genéticos de la síntesis de AFB<sub>1</sub> han sido elucidados a nivel molecular recién en la última década. Varias enzimas específicas asociadas con conversiones de precursores en la camino de biosíntesis han sido parcialmente purificadas. Estudios genéticos demostraron que la biosíntesis de aflatoxinas es un proceso altamente complejo gobernado por genes agrupados en un cluster en una región de 75 kilobases del DNA. La regulación de la transcripción es controlada por una proteína codificada

por el gen *aflR*. Los efectos de posición cromosomal, así como un gran número de otros genes reguladores están sujetos al control nutricional y ambiental (Yu *et al.*, 2002).

#### A.5. Control e inactivación

El control de las aflatoxinas en materias primas generalmente se basa en técnicas de “screening” que separan las nueces, granos o semillas afectados. En maíz, algodón e higos, el “screening” para aflatoxinas puede hacerse por examinación bajo la luz UV: aquellas partículas que fluorescen pueden estar contaminadas. En el caso del maní, este método no es útil porque el maní por sí solo fluoresce bajo la luz UV. Los maníes con aflatoxinas son segregados por máquinas electrónicas de selección por color que detectan maníes decolorados.

Las aflatoxinas pueden ser parcialmente destruidas por varios tratamientos químicos. Se ha comprobado que agentes oxidantes como el ozono u el peróxido de hidrógeno remueven las aflatoxinas de harinas de maní contaminadas (Weng *et al.*, 1994). Aunque el ozono resulta efectivo para la remoción de AFB<sub>1</sub> y AFG<sub>1</sub> bajo las condiciones aplicadas (100°C por 2 hs), no se observó efecto alguno sobre AFB<sub>2</sub>, y el tratamiento redujo el contenido de lisina de la harina. El tratamiento con peróxido de hidrógeno resultó en una destrucción del 97% de las aflatoxinas en harina de maní desgrasada (Screenivasamurthy *et al.*, 1967). El método químico más práctico para la destrucción de aflatoxinas parece ser el uso de gas de amonio anhidro a elevadas temperaturas y presiones, con un 95 al 98% de reducción en aflatoxinas totales (Van Egmond, 1991). Esta técnica es utilizada comercialmente para la detoxificación de alimento para animales en Senegal, Francia y los Estados Unidos (Smith & Moss, 1985; Van Egmond, 1991).

El método más efectivo de control de aflatoxinas en materias primas, especialmente en maní, es la prevención de la contaminación de las plantas con cepas de mohos aflatoxigénicas. El progreso hacia el logro de este objetivo consiste en una estrategia de control biológico: la infección temprana de las plantas con cepas no toxicogénicas de *A. flavus* para prevenir el posterior ingreso de las cepas toxicogénicas (Chourasia & Sinha, 1994; Cotty, 1994; Cotty *et al.*, 1994). La aplicación de estas estrategias requiere el conocimiento previo de las características de las poblaciones autóctonas de *A. flavus*, especialmente en relación a su capacidad invasiva y su potencial toxicogénico.

Las aflatoxinas son una de las pocas micotoxinas cubiertas por la legislación. En varios países se imponen límites estatales sobre la cantidad de aflatoxinas que pueden estar presentes en ciertos alimentos. En los años siguientes al descubrimiento de las aflatoxinas, los límites fijados para aflatoxinas en alimentos, inicialmente coincidían con el límite de detección del método químico de análisis. En países importadores, fue al principio, de 5 µg/kg, luego en algunos casos se redujo a 1 µg/kg (van Egmond, 1989). Sin embargo, pronto resultó evidente que los países productores no podían lograr esos límites, por ello, los Estados Unidos fijaron 20 µg/kg y Australia 15 µg/kg como límites prácticos que permitirían reducir la ingestión de aflatoxinas al menor nivel posible, sin destruir las industrias mániseras en esos países (ICMSF, 2002).

El límite impuesto para los países de occidente varía en general entre 5 y 20 µg/kg para aflatoxina B<sub>1</sub> en varios alimentos para humanos, incluyendo maní y derivados del maní, con cantidades variables en alimentos para animales, pero hasta 300 µg/kg permitido en alimentos para ganado vacuno y ovino en los Estados Unidos (Gilbert, 1991).

**Tabla I.5. Niveles para aflatoxinas totales en alimentos establecidos por la U.S. Food and Drug Administration (1996)**

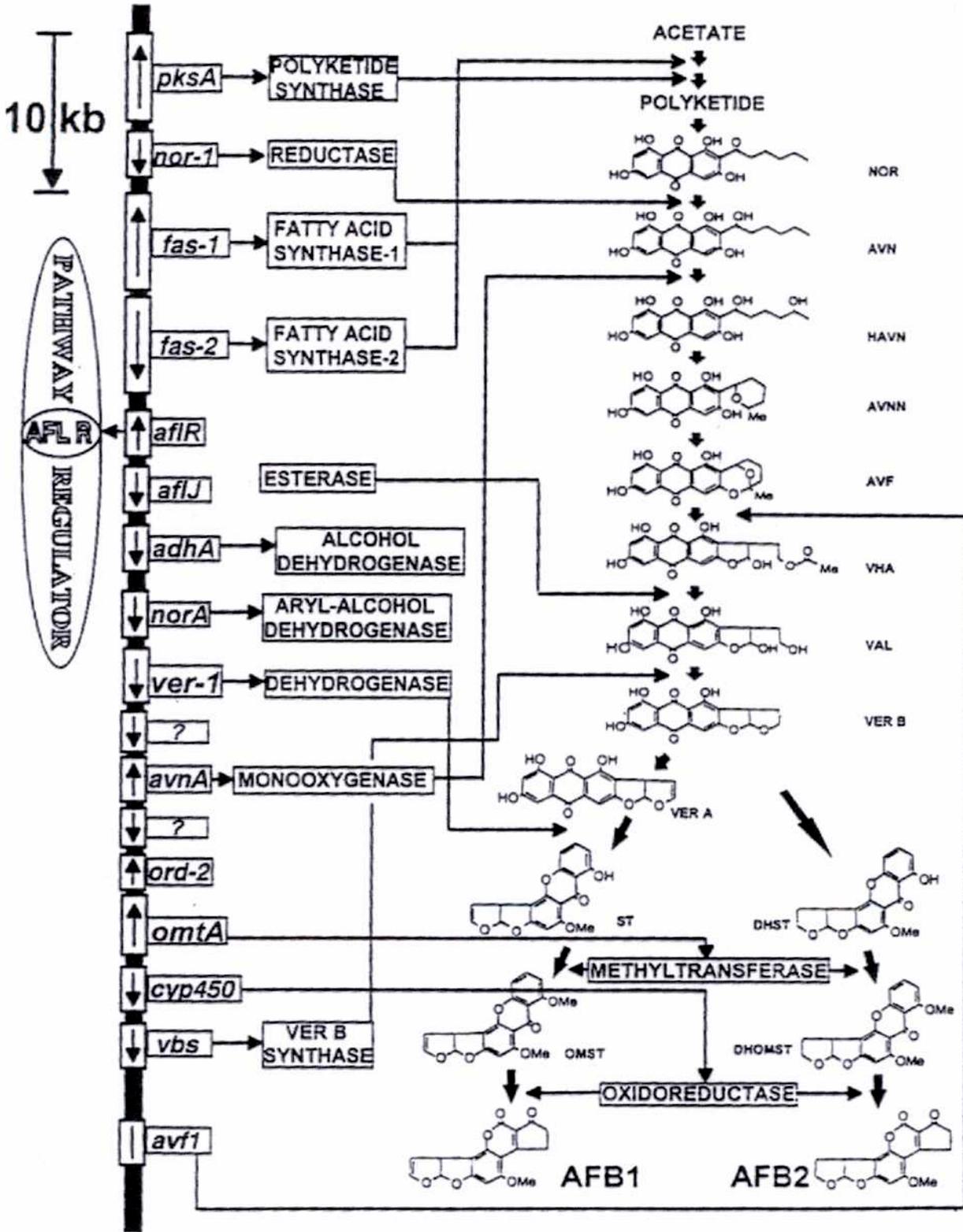
Alimento	Concentración ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
Todos los productos, excepto leche, destinados a consumo humano	20
Maíz para animales inmaduros y ganado bovino lechero	20
Productos de maíz y maní para ganado bovino, porcino y avícola maduros	100
Productos de maíz y maní para ganado porcino destinado a carne	200
Productos de maíz y maní para ganado bovino destinado a carne	300
Harina de semillas de algodón (como ingrediente de alimento balanceado)	300
Otros alimentos para consumo animal	20
Leche	0.5 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Aflatoxina M<sub>1</sub>

**Tabla I.6. Medias y rangos en 1987 y en 1996 de máximos niveles tolerados (ng/g) para aflatoxinas y número de países que poseen regulaciones para ellas.**

	1987			1996		
	Media	Rango	Nº de países	Media	Rango	Nº de países
B <sub>1</sub> en alimentos para humanos	4	0-50	29	4	0-30	33
B <sub>1</sub> +B <sub>2</sub> +G <sub>1</sub> +G <sub>2</sub> en alimentos para humanos	7	0-50	30	8	0-50	48
B <sub>1</sub> en alimentos para niños	0,2	0-5	4	0,3	0-5	5
M <sub>1</sub> en leche	0,05	0-1	13	0,05	0-1	17
B <sub>1</sub> en alimentos para animales	30	5-1000	16	20	5-1000	19
B <sub>1</sub> +B <sub>2</sub> +G <sub>1</sub> +G <sub>2</sub> en alimentos para animales	50	10-1000	8	50	0-1000	21

(Van Egmond, 1999)



(Klich & Cleveland, 2000)

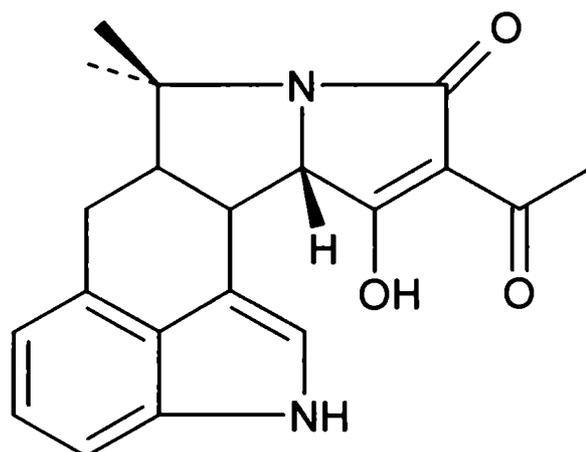
Figura I.11. Biosíntesis de aflatoxinas

## B. Acido ciclopiazónico

El ácido ciclopiazónico (CPA) fue originalmente aislado de un cultivo identificado como *Penicillium cyclopium* durante un análisis de rutina de hongos toxicogénicos (Holzapfel, 1968). La potencial importancia del CPA como un contaminante natural de alimentos se volvió evidente con reportes de su producción por varios mohos, ya sea los comúnmente hallados en productos agrícolas o los que se utilizan para la producción de alimentos fermentados. Los mohos productores de CPA incluyen *A. flavus*, *A. versicolor*, *A. tamarisii* y varias especies de *Penicillium* utilizadas en la producción de salchichas fermentadas en Europa. Se ha demostrado que *P. camemberti*, utilizado para la producción del queso Camembert, y *A. oryzae*, que se emplea en la producción de salsa de soja en Oriente, son productores de CPA (CAST, 2003). Esta micotoxina se ha encontrado naturalmente en maíz (Gallagher *et al*, 1978), queso (Le Bars, 1979), maní (Lansden & Davidson, 1983) y semillas de girasol (Ross *et al.*, 1991). Fue encontrado en mijo (*Paspalum scrobiculatum* L.), implicado en una intoxicación humana en la India (Rao & Husain, 1985). También hay evidencias de que el CPA ha estado involucrado, junto con las aflatoxinas, en la enfermedad X de los pavos (Turkey "X" disease) en Inglaterra en 1960 (Bradburn *et al*, 1994; Cole, 1986).

### B.1. Estructura

El CPA es un ácido indol-tetrámico, que forma complejos con iones metálicos (Scott, 1992). Posee una  $\beta$ -dicetona y una  $\beta$ -hidroxi  $\alpha$ ,  $\beta$ -cetona insaturada, con evidencia de ser este último grupo el responsable de su actividad quelante. Su estructura química (figura I.12) fue dilucidada por Holzapfel (1968), quien lo describió como un compuesto ópticamente activo, de punto de fusión 245-256°C.



**Figura I.12. Estructura química del ácido ciclopiazónico**

### B.2. Toxicidad

Su rol en la salud humana aún no ha sido dilucidado, siendo el caso de intoxicación en la India el único dato documentado de sus efectos en humanos. El vehículo de la toxina fue mijo, y los síntomas observados, náuseas y mareos.

Sin embargo, la evidencia de su influencia en enfermedades animales es fuerte (Cole, 1986). Los efectos biológicos del CPA en ratas, perros, cerdos, ovejas, gallinas ponedoras y pollos han sido ampliamente descritos (Bryden, 1991) La tabla I.7 muestra los datos de LD<sub>50</sub> (una dosis única de una sustancia requerida para causar la mortalidad del 50% de una población) del CPA para distintas especies animales. Los signos clínicos de intoxicación incluyen anorexia, diarrea, pirexia, deshidratación, pérdida de peso, ataxia, inmovilidad y espasmos al morir. Examinaciones histológicas de tejidos de animales expuestos al CPA revelaron hiperemia del tracto alimentario, hemorragias y ulceración focal. Se observó extendida necrosis en la mayoría de los tejidos, incluyendo hígado, bazo, riñones, páncreas y miocardio (Cullen *et al.*, 1988;

Dorner *et al.*, 1983; Lomax *et al.*, 1984; Nuehring *et al.*, 1985; Purchase, 1971). Cullen *et al.* (1988) hallaron degeneración del músculo esquelético caracterizado por inflamación de la miofibra o fragmentación en pollos a los que les fue suministrado CPA.

El CPA tiene la capacidad de quelar cationes metálicos debido a su estructura de ácido tetrámico (Gallagher *et al.*, 1978). La quelación de cationes como el calcio, magnesio y hierro pueden ser importantes mecanismos de toxicidad del CPA. En gallinas ponedoras, se ha demostrado que el CPA perturba la formación normal de la cáscara del huevo, de manera que las gallinas en cuyas dietas se incorpora el CPA ponen huevos con cáscaras muy delgadas o con grietas visibles (Bryden, 1991). Aproximadamente el 50% de una dosis de CPA administrada por vía oral o intraperitonealmente se distribuye al músculo esquelético de ratas y pollos en unas pocas horas (Norred *et al.*, 1988). Otros estudios han demostrado que residuos de CPA pueden transferirse a la leche y los huevos (Dorner *et al.*, 1983). Estos datos sugieren que los humanos se hallan expuestos a la ingesta de CPA a través del consumo de estos alimentos.

Como el CPA es producido por *A. flavus* y puede ser encontrado junto con aflatoxinas producidas por la misma especie, el posible rol del CPA en algunas aflatoxicosis diagnosticadas necesita ser más profundamente analizado. Cole (1986) realizó un estudio retrospectivo del caso de la enfermedad X de los pavos y encontró que algunos de los síntomas clínicos descriptos no son consistentes con los que se conoce como producidos por las aflatoxinas. Una característica prominente de dicha enfermedad descrita por Blount (1960; 1961) y por Siller & Ostler (1961) y que no lo es de aflatoxicosis es la enteritis hemorrágica y la inflamación del riñón. Estudios

toxicológicos posteriores demostraron que los principales órganos “target” del CPA son el hígado, riñón, y el tracto gastrointestinal. Probablemente la principal evidencia de los efectos tóxicos agudos del CPA en la enfermedad de los pavos fue descripta por Blount (1960) y corresponde a la postura característica adoptada por las aves cuando murieron. El cuello estaba arqueado y la cabeza echada hacia atrás (opisthotonus), y las patas extendidas completamente hacia atrás. En los estudios posteriores se observó que esta característica distintiva era producida en pollitos de un día solamente por el CPA y que esta condición se observa en el momento de la muerte, a diferencia de lo que ocurre con otras micotoxinas, como los penitrems, con los que también se observa una postura rígida, pero no al morir el animal. Esta evidencia apoya la hipótesis de que el CPA fue el agente etiológico para una parte de la clásica enfermedad denominada “Turkey X disease”.

Finalmente, como el CPA es producido por cepas de *A. flavus*, también productoras de aflatoxinas, debe considerarse la posibilidad de un efecto sinérgico cuando ambas micotoxinas son producidas en el mismo alimento.

**Tabla I.7. LD<sub>50</sub> del CPA para distintas especies animales**

Animal	Sexo	Edad	Vía	LD <sub>50</sub> (mg/kg)
Ratas	Masculino	-	Intraperitoneal	2,3
Ratas	Masculino		Oral	36,0
Ratas	Femenino	-	Oral	63,0
Pollitos	Masculino	1 día	Oral	12,0
Pollitos	Femenino	1 día	Oral	12,1
Pavos	Masculino	1 día	Oral	19,0
Pavos	Femenino	1 día	Oral	17,9
Patos	Masc.- Fem.	1 día	Oral	38,6
Codornices	Masculino	6 semanas	Oral	69,6

(Purchase, 1967; Wilson *et al.*, 1989)

### B.3. Mecanismo de acción

La toxicidad y los síntomas de la intoxicación con CPA pueden atribuirse a su capacidad de alterar el flujo normal de calcio intracelular a través de la inhibición de la forma reticular de la bomba de  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa.

El CPA no mostró teratogenicidad en ratones, y no es considerado un cancerígeno. A pesar de los cambios patológicos inducidos por CPA en bazo o en la bursa de Fabricius, no parece haber un efecto en el sistema inmune. Estudios in vitro implican un potencial efecto inmunomodulatorio del CPA, pero en todos esos trabajos se utilizaron concentraciones muy elevadas de CPA y estos hallazgos no pudieron ser confirmados con estudios in vivo.

#### I.2.4.5. Distribución de especies de *Aspergillus* sección *Flavi* en la naturaleza y los alimentos

*A. flavus* es ubicuo en la naturaleza. Desde el descubrimiento de las aflatoxinas, se ha convertido en el hongo más ampliamente reportado en alimentos, lo que refleja su importancia económica y sanitaria, así como su ocurrencia universal. *A. parasiticus* parece estar menos ampliamente distribuido (Klich & Pitt, 1988a); la verdadera dimensión de su ocurrencia es complicada de evaluar por la tendencia en la bibliografía de reportar *A. flavus* y *A. parasiticus* como *A. flavus* sin una cuidadosa discriminación. *A. nomius* es la especie menos común dentro de la sección *Flavi*.

*A. flavus* y *A. parasiticus* presentan una especial afinidad por las nueces y las oleaginosas, aunque la razón para esto aún no es clara. Maní, maíz y algodón son los principales cultivos contaminados por *A. flavus*, siendo en maní la especie más comúnmente aislada y en maíz la segunda (después de *Fusarium moniliforme*). *A. nomius* fue reportada en ambos sustratos. Los aislamientos de *A. parasiticus* a partir de alimentos son relativamente poco frecuentes. Se lo ha encontrado, en bajas cantidades, en maíz, maní y soja (Pitt & Hocking, 1997).

Los cereales son también un sustrato común para el crecimiento de *A. flavus* pero, en contraste con las nueces y las oleaginosas, el deterioro de pequeños granos de cereales por *A. flavus* es casi siempre el resultado de un manejo descuidado o un secado o almacenamiento inadecuado, y los niveles de aflatoxinas en los granos pequeños raramente son significativos (Stoloff, 1977). Las especias a veces contienen *A. flavus* (Pitt & Hocking, 1985) y los recuentos viables suelen ser bastante elevados. Sin embargo, las cantidades de especias que se consumen son tan bajas que la presencia de aflatoxinas no parece representar un verdadero peligro.

En algunos países se utilizan procedimientos de selección y de limpieza (clean-up) para reducir la concentración de aflatoxinas a niveles bajos en alimentos que supongan un riesgo potencial. En maní, en donde el crecimiento fúngico está normalmente acompañado por una decoloración de la semilla, esto incluye el uso de sofisticados equipos de clasificación por color. Muestreos de base estadística, la toma de muestras grandes y representativas, la homogeneización antes del submuestreo y la realización de ensayos estandarizados de aflatoxinas se utilizan para asegurar que los cultivos y alimentos susceptibles cumplan los estrictos requerimientos de las leyes sanitarias en países exportadores e importadores. Los países subdesarrollados son generalmente menos afortunados; en muchos de ellos, donde las nueces y el maíz que se encuentran por debajo de los estándares deben ser consumidos sin ninguna forma de selección o inspección, la ingestión de aflatoxinas es a menudo muy alta, especialmente en zonas rurales. Pueden producirse cantidades significativas de aflatoxinas en maní, maíz y otras nueces y oleaginosas, especialmente en algunos países tropicales donde los cultivos pueden crecer bajo condiciones marginales y donde las instalaciones de secado y almacenamiento son limitadas (ICMSF, 1997; Hocking, 1997).

### I.3. FACTORES QUE CONDICIONAN EL DESARROLLO DE HONGOS Y LA PRODUCCION DE MICOTOXINAS

Los hongos son importantes causas de pérdidas tanto de materia seca como de calidad de los granos, especialmente en climas tropicales donde las lluvias pueden impedir el secado correcto y las altas temperaturas hacen que el almacenamiento prolongado se vuelva más difícil. Por otro lado, su presencia en los alimentos implica el riesgo de la contaminación con micotoxinas, por lo cual el control del desarrollo de hongos y la producción de micotoxinas resulta imprescindible para obtener alimentos en buen estado nutricional, organoléptico e higiénico-sanitario. Además, dicho control apunta a reducir las pérdidas económicas que el deterioro fúngico ocasiona.

Los efectos combinados de pérdidas por alimentos para humanos y para animales causados por las micotoxinas disminuyen el abastecimiento y elevan el precio de varios productos agrícolas. Las micotoxinas también demandan gastos en investigaciones, legislaciones, evaluaciones y mecanismos de control. Una estimación tentativa de los costos debido a la contaminación con micotoxinas en los Estados Unidos, provista por la U.S. Food and Drug Administration (2000), establece el costo anual por contaminación de cultivos con micotoxinas en un rango de U\$S 418 millones a U\$S 1,66 billones. Adicionalmente, los costos de mitigación y las pérdidas de ganado podrían sumar otros U\$S 472 millones a la suma antes estipulada (CAST, 2003).

En nuestro país, dada la importancia alimentaria y económica que reviste el cultivo de granos, y en particular el del maní, estos conceptos cobran especial relevancia.

Las numerosas investigaciones realizadas sobre micotoxinas permiten afirmar que la mejor forma de control es la prevención, ya que resulta muy difícil eliminar los

metabolitos secundarios tóxicos de los alimentos una vez que se han sintetizado. Los métodos de detoxificación propuestos no han resultado satisfactorios, dado que la mayoría de estos contaminantes son muy estables al calor y a otros agentes físicos y químicos (Smith & Moss, 1985). Por otro lado, los procesos de detoxificación, además de remover la toxina, no deben dejar ningún tipo de residuo tóxico o carcinogénico en el producto final y deben preservar el valor nutritivo y la aceptabilidad del producto, sin alterar propiedades tecnológicas importantes del mismo (Mehan *et al.*, 1991).

Es de gran relevancia, por lo tanto, controlar la producción de micotoxinas en alimentos, y, para lograrlo, es necesario entender cómo influyen los principales factores ambientales y sus interacciones sobre la producción de micotoxinas.

La actividad acuosa ( $a_w$ ), la temperatura y el tiempo son parámetros críticos en la producción de micotoxinas. Es difícil, y a la vez un tanto arbitrario, tratar de estudiar por separado el efecto de estos factores. La temperatura óptima, al igual que las temperaturas máxima y mínima que permiten el crecimiento del hongo y la producción de micotoxinas, son dependientes de la composición y de las condiciones de humedad del sustrato. Es la interacción entre estos parámetros y otros tales como disponibilidad de oxígeno y nutrientes, lo que condiciona el desarrollo de los hongos y la formación de toxinas (Fernández Pinto, 1986).

La actividad fúngica está principalmente determinada por la disponibilidad de agua en el sustrato y la temperatura. Los hongos toleran mejor las condiciones adversas de un factor cuando el otro está en su nivel óptimo. Por ejemplo, generalmente pueden crecer a menores  $a_w$  cerca de la temperatura óptima de crecimiento de lo que pueden tolerar a mayores o menores temperaturas. Consecuentemente, modificando ciertos

factores en los granos almacenados se puede lograr un almacenamiento seguro sin necesidad de recurrir a medidas más extremas (Lacey & Magan, 1991).

### **I.3.1. Temperatura**

Tal como sucede con otros metabolitos secundarios, la temperatura óptima para el crecimiento fúngico difiere de la temperatura óptima para la producción de las toxinas (Northolt *et al.*, 1976).

En el caso de las aflatoxinas, se ha demostrado que la temperatura óptima y el tiempo necesario para la producción de estas toxinas varían según los sustratos y las cepas empleadas. Los trabajos encontrados en la bibliografía presentan resultados dispares, en parte debido a que en muchos casos no se ha hecho distinción entre las especies *A. flavus* y *A. parasiticus*, las condiciones experimentales han sido diferentes, y además, algunos autores se refieren a la producción de aflatoxinas totales, en tanto que otros consideran la producción de las toxinas individuales.

En general se ha observado que las condiciones óptimas y limitantes para el crecimiento y para la producción de AFB<sub>1</sub> son similares para *A. flavus* y *A. parasiticus*. Ambos crecen a temperaturas en el rango de 10-12°C a 42-43°C, con un óptimo cercano a 32-33°C (Ayerst, 1969). La producción de aflatoxinas ocurre en el rango de 12 a 40°C (Diener & Davis, 1967; Koehler *et al.*, 1985; Northolt *et al.*, 1977). Según Diener & Davis (1977), la temperatura óptima para la producción de aflatoxinas por *A. flavus* en maníes esterilizados fue de 25°C con incubación de 7 a 9 días, mientras que *A. parasiticus* produjo grandes cantidades de aflatoxinas a 30°C durante períodos de incubación de 5 a 21 días. Las temperaturas limitantes para la producción de aflatoxinas fueron de 12°C y 41°C. Schindler *et al* (1967), trabajando con dos cepas de *A. flavus* en

medio agar mosto, encontraron que la máxima producción de aflatoxinas ocurría a 24°C para ambas cepas. La menor temperatura a la que observaron producción de toxina fue 13°C, en tanto que no la observaron a 2, 7, 41, 46 y 52°C. Diener & Davis (1967) determinaron que la temperatura óptima de producción de AFB<sub>1</sub> (24°C) es menor que la de crecimiento. La producción de AFG<sub>1</sub> es óptima a 30°C, de manera que la proporción de AFB<sub>1</sub> y AFG<sub>1</sub> varía con la temperatura (tabla I.8).

**Tabla I.8. Efecto de la temperatura en la proporción de AFB<sub>1</sub> y AFG<sub>1</sub>**

Temperatura de incubación (°C)	Proporción de aflatoxina B <sub>1</sub> a G <sub>1</sub>
15 – 18	1:1
25	2:1
28	4:1
32	12:1

(Diener & Davis, 1967)

Con respecto a la producción de CPA, no se han encontrado datos en la bibliografía acerca de la temperatura limitante para su producción por *A. flavus*. La influencia de la temperatura sobre la producción de esta micotoxina ha sido estudiada en combinación con el efecto de la actividad de agua ( $a_w$ ), por lo cual se describirá más adelante.

### I.3.2. Actividad de agua

De los microorganismos que colonizan los granos, los hongos son los más tolerantes a baja disponibilidad de agua y son, consecuentemente, importantes agentes de deterioro.

El contenido de agua, expresado como un porcentaje del peso húmedo o el peso seco de un sustrato, es la medida de agua más fácil de determinar en un material (Christensen *et al.*, 1969). El contenido de agua en sustratos como los granos consiste de agua ligada, retenida por uniones químicas muy fuertes con el sustrato, y del agua libre, que está unida mucho más débilmente. El agua libre está más disponible para el crecimiento microbiano y el metabolismo que el agua ligada, pero la facilidad con la que puede ser removida depende del contenido de agua del sustrato. El grado de unión también varía con diferentes sustratos, lo que implica que el contenido acuoso no es un buen indicador de la disponibilidad de agua. En materiales higroscópicos, como los granos, una buena medida de la disponibilidad de agua es la actividad acuosa ( $a_w$ ). La  $a_w$  es la relación entre la presión de vapor de agua en un sustrato (P) y la presión de vapor del agua pura ( $P_o$ ) a la misma temperatura y presión, como lo expresa la fórmula:

$$a_w = P / P_o$$

El concepto de  $a_w$  fue introducido por Scott (1957) y constituye una buena medida de la disponibilidad de agua en un sustrato para los organismos que lo colonizan y pueden crecer en él.

Sólo por encima de  $a_w$  0,60 pueden ocurrir las reacciones bioquímicas y el crecimiento microbiano. Cada microorganismo tiene un valor limitante de actividad de agua, por debajo de la cual no puede crecer. En términos generales, los hongos son capaces de crecer a valores de  $a_w$  menores que los que limitan el desarrollo de bacterias y levaduras. Algunos hongos, denominados xerofílicos, son capaces de crecer a valores bajos de  $a_w$ . Según Pitt (1975), los hongos xerofílicos son aquellos capaces de crecer a valores de  $a_w$  inferiores a 0,85, en determinadas condiciones experimentales. De

acuerdo a este autor, *A. flavus* puede considerarse dentro de esta categoría, ya que su  $a_w$  limitante es 0,78.

El límite de  $a_w$  para la producción de toxinas está por encima del valor que limita el crecimiento. Es decir, el crecimiento de estos hongos no se ve necesariamente acompañado de la síntesis de las toxinas, sobre todo a bajos niveles de  $a_w$ , y lo mismo sucede en los extremos del rango de temperaturas que permiten el crecimiento.

Los valores de  $a_w$  limitantes no se han determinado para todas las micotoxinas conocidas. Además, se debe tener en cuenta que los valores óptimos y limitantes para la producción de micotoxinas son afectados por la temperatura, sustrato, presencia de oxígeno, disponibilidad de nutrientes, etc. Estudiando la producción de aflatoxina B<sub>1</sub> en maní, Diener & Davis (1977) encontraron un valor óptimo a  $a_w$  0,95, mientras que no se produjeron cantidades detectables a  $a_w$  0,85 e inferior. Northolt *et al* (1977), trabajando con diferentes cepas de *A. flavus* en agar extracto de malta de  $a_w$  ajustada mediante el agregado de diferentes solutos, señala como valor óptimo  $a_w$  0,99, siendo  $a_w$  0,87 el valor más bajo al que ocurre la producción de aflatoxina B<sub>1</sub>. Estas aparentes diferencias muestran que la capacidad de un hongo para producir micotoxinas en condiciones de estrés debido a la baja  $a_w$ , depende del sustrato. Por eso es difícil extrapolar los resultados obtenidos sobre medios de cultivo en el laboratorio a lo que sucede en sustratos naturales. Si se trabaja con distintas cepas, las diferencias también son debidas a las características de cada una de ellas (Beuchat, 1983).

**Tabla I.9. Mínimas  $a_w$  para el crecimiento y la producción de micotoxinas por algunas especies fúngicas**

Especie	Micotoxina	$a_w$ mínima	
		Crecimiento	Producción de toxina
<i>Aspergillus flavus</i>	Aflatoxinas	0,78 – 0,84	0,84
<i>Aspergillus parasiticus</i>		0,84	0,87
<i>Aspergillus ochraceus</i>	Ocratoxina A	0,77	0,85
<i>Penicillium verrucosum</i>		0,80 – 0,81	0,83 – 0,86
<i>Aspergillus ochraceus</i>	Acido penicílico	0,77	0,88
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>		0,82 – 0,85	0,97
<i>Penicillium patulum</i>	Patulina	0,81	0,95
<i>Penicillium expansum</i>		0,82 – 0,84	0,99
<i>Aspergillus clavatus</i>		-	0,99

(Lacey y Magan, 1991)

La tabla I.9 compara las  $a_w$  mínimas para crecimiento y producción de micotoxinas para algunas especies fúngicas. Los efectos de la  $a_w$  y la temperatura en la producción de micotoxinas a menudo difieren de aquellos sobre la germinación y el crecimiento y pueden diferir también para dos toxinas producidas por la misma especie y por una misma toxina producida por dos especies diferentes. Por ejemplo, la producción de ocratoxina A por *A. ochraceus* en alimento balanceado para aves fue máxima a 30°C y 0,95  $a_w$ , mientras que la producción de ácido penicílico por la misma especie fue favorecida por 22°C y 0,90  $a_w$  (Bacon *et al.*, 1973). Por otro lado, Sosa *et al.* (2002) determinaron que las condiciones óptimas para la producción de CPA por *Penicillium commune* en un medio en base a extracto de carne eran 30°C y 0,96  $a_w$ , mientras que, según Gqaleni *et al.* (1996), la mayor producción de la misma toxina, pero por *A. flavus* en maíz ocurrió a 20°C y 0,98  $a_w$ .

En el caso de *A. flavus* y *A. parasiticus*, la actividad acuosa óptima para el crecimiento es cercana a 0,99, y la mínima ha sido reportada como 0,80 (Ayerst, 1969), 0,82 y 0,83 (Northolt *et al.*, 1977; Pitt & Miscamble, 1995). Las aflatoxinas generalmente se producen en mayores cantidades a altos niveles de  $a_w$  (0.98 a 0.99), con inhibición de la producción de la toxina a una  $a_w$  cercana a 0.85 (Diener & Davis, 1967; Koehler *et al.*, 1985; Northolt *et al.*, 1977).

En cuanto a los efectos de la  $a_w$  sobre la producción de CPA por *A. flavus* en sustratos naturales, la información bibliográfica es muy escasa. El trabajo de Gqaleni *et al.* (1996) evalúa la producción de CPA por *A. flavus* en maíz, en un rango de elevadas actividades acuosas (0,90; 0,95 y 0,98), y observa que el CPA se produce a todos los niveles de  $a_w$  estudiados a las temperaturas de 20, 25 y 30°C. La máxima producción ocurrió a una  $a_w$  de 0,98 y 20°C, mientras que la cantidad producida disminuyó considerablemente a  $a_w$  0,90 y 30°C. Según estos autores, combinaciones de alta  $a_w$  y bajas temperaturas favorecen la producción de CPA.

En medios de laboratorio, Gqaleni *et al.* (1997), también observaron un incremento de la producción de CPA con el aumento de la  $a_w$ , aunque en este sustrato, las condiciones óptimas de producción fueron  $a_w$  0,996 y 25°C. La menor producción observada por estos autores fue a  $a_w$  0,90, en las condiciones extremas de temperatura, 37°C y 20°C, siendo 37°C la menos favorable de las dos. A  $a_w$  0,85 no se observó crecimiento en los medios de cultivo empleados.

Es notable destacar las diferencias observadas entre los resultados de estos autores, lo cual confirma que el efecto de la temperatura sobre la producción de micotoxinas es dependiente del sustrato, al igual que de la  $a_w$  del mismo, como se ha mencionado anteriormente.

Es evidente la necesidad de ampliar los datos respecto de los efectos de los factores ambientales en la producción de ambas micotoxinas por *A. flavus* para prevenir la contaminación de los alimentos. Muchos experimentos han sido realizados en medios sintéticos, otros solamente involucran la producción de una única micotoxina por una cepa de *A. flavus*. Se ha demostrado que distintas cepas difieren en su capacidad de producción de toxinas y en sus condiciones óptimas de producción. Además, estas condiciones están determinadas también por el sustrato en el que se evalúa la formación de micotoxinas.

Los estudios tendientes a ampliar el conocimiento de la influencia de todos estos factores en un sustrato como el maní constituyen una importante contribución en relación a la prevención de la contaminación y a la planificación del manejo seguro de este producto.

#### I.4. OBJETIVOS

El cultivo de maní en nuestro país reviste de gran importancia económica, ya que la Argentina se encuentra entre los principales exportadores de maní a nivel mundial. El maní confitería argentino y sus productos derivados son demandados en los mercados más exigentes del mundo.

Debido a la presencia de cepas de *Aspergillus* sección *Flavi* productoras de aflatoxinas y CPA como componentes de la micobiota del maní, y por ser esta oleaginosa reconocida a nivel mundial como un sustrato susceptible a la contaminación con aflatoxinas, se consideró de interés estudiar los factores que condicionan la producción simultánea de dichas micotoxinas en este sustrato.

Teniendo en cuenta estos antecedentes se planteó como objetivo principal del presente trabajo de Tesis, el estudio de la influencia de los factores ambientales ( $a_w$ , temperatura y tiempo) sobre la co-producción de aflatoxinas y ácido ciclopiazónico en maní.

Para ello se establecieron los siguientes objetivos parciales:

1. Estudiar la distribución de cepas de *Aspergillus* sección *Flavi* en maní cosechado en la zona núcleo manisera de nuestro país.
2. Evaluar la capacidad toxicogénica de las cepas aisladas de maní a fin de establecer la posibilidad de co-ocurrencia natural de aflatoxinas y ácido ciclopiazónico en dicho sustrato.
3. Poner a punto un método analítico eficaz para la determinación de CPA en maní.
4. Investigar la co-ocurrencia natural de aflatoxinas y CPA en maní cosechado en nuestro país.

5. Estudiar la influencia de la actividad acuosa, la temperatura y el tiempo sobre la co-producción de aflatoxina B<sub>1</sub> y CPA en maní.

# II

## MATERIALES Y METODOS

---

CAPITULO

## II.1. ESTUDIO DE LA DISTRIBUCION DE *ASPERGILLUS* SECCION *FLAVI*

### II.1.1. Sustrato

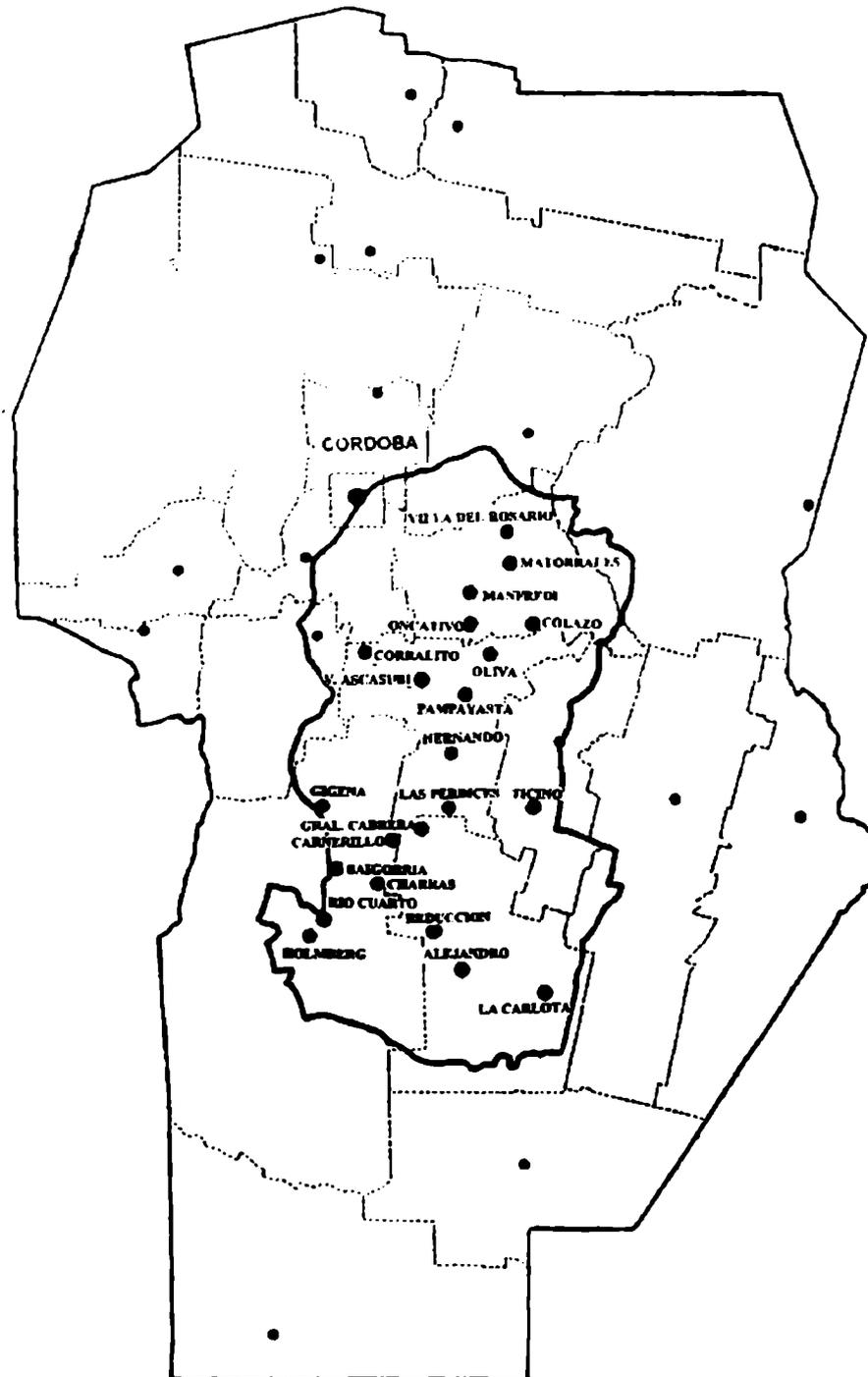
Se analizaron 57 muestras de maní provenientes de 31 localidades ubicadas en la zona manisera de la provincia de Córdoba (figura II.1). El muestreo fue realizado por personal de la Estación Experimental Regional Agropecuaria Manfredi del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). El mismo se realizó a nivel de productores y/o acopiadores. Las mismas correspondían a la cosecha 1998 y los aislamientos se realizaron durante los dos meses posteriores a su recolección.

### II.1.2. Aislamientos

Se empleó el método de plaqueo directo en Agar Malta Sal (MSA) y en Agar Diclorán Glicerol 18% (DG18). Se analizaron 100 granos por muestra colocando 5 granos en cada caja. Se los incubó a 25°C y 30°C realizando observaciones diarias. Se aislaron los *Aspergillus* de color verde amarillento, típico del grupo *Aspergillus* sección *Flavi*. Las cepas aisladas se transfirieron a placas de Agar Papa Dextrosa (PDA) y Agar Czapek Extracto de Levadura (CYA) y se incubaron a 25°C durante 7 días para ser sometidas a su identificación.

### II.1.3. Identificación

Se utilizó la clave de Pitt & Hocking (1985) y las sugerencias de Klich & Pitt (1988b). Cada cepa fue sembrada en Agar Czapek Extracto de Levadura (CYA), Agar Extracto de Malta (MEA) y Agar Glicerol 25% Nitrato (G25N) e incubada a 25°C en todos los medios y a 37°C y 5°C en CYA. La observación se realizó a los 7 días de



**Figura II.1. Zona manisera núcleo argentina (provincia de Córdoba)**

incubación. Se midieron los diámetros de las colonias en los tres medios de cultivo incubados a las diferentes temperaturas, se registró el color del anverso y el reverso de las colonias, su textura, presencia de pigmentos y la presencia de esclerocios. Las características microscópicas observadas fueron: presencia de cabezuelas con métulas y fiálides, o con fiálides solamente; tamaño y rugosidad de los conidios y largo y rugosidad de los estípites.

#### **II.1.4. Determinación de la capacidad toxicogénica**

Para la detección de las micotoxinas producidas por las cepas en estudio se utilizó el método de “plug” para micotoxinas extracelulares e intracelulares desarrollado por Filtenborg *et al.* (1983). Se cortó con sacabocado un pequeño cilindro (plug) de la colonia desarrollada en agar CYA de 7-10 días de incubación a 25°C. El plug se colocó sobre un cromatofolio de sílica gel 60 con el lado del agar contra el gel para la detección de aflatoxinas y el lado del micelio contra el gel para el CPA. En este caso, se agregaron una o dos gotas de cloroformo al micelio previa aplicación del plug en la placa cromatográfica para extraer la toxina. Luego de la aplicación se dejó secar la mancha y se desarrolló la placa. En el caso del CPA la placa fue previamente sumergida en una solución de ácido oxálico 10% en metanol y secada en estufa a 100°C.

La detección de las micotoxinas se realizó por cromatografía en capa delgada en cromatofolios de sílica gel 60. Como solvente de desarrollo para aflatoxinas se utilizó una mezcla de cloroformo-acetona (90+10) y para CPA una mezcla de tolueno-acetato de etilo-ácido fórmico (5+4+1) (Fernández Pinto *et al.*, 2001). Las aflatoxinas se visualizaron bajo luz UV (366 nm) y el CPA bajo luz visible luego del tratamiento de las placas con reactivo de Erlich y el subsecuente desarrollo de manchas azules.

Los resultados negativos o dudosos para aflatoxinas fueron confirmados empleando arroz como sustrato según la técnica de Shotwell *et al.*, (1966) y con maní como sustrato para el caso del CPA. Para evaluar la producción de CPA en maní se tomaron 25 g de material, se le agregaron 10 ml de agua destilada y se autoclavó a 121°C durante 30 minutos. A los granos así tratados se los inoculó con 1 ml de una suspensión de esporas de la cepa en estudio ( $10^6$  esporas/ml) preparada según Pitt, J.I. & Hocking, A.D. (1997) y se incubó durante 7 días a 30°C. Luego de la incubación se agregaron 125 ml de una mezcla de metanol-agua (55+45), 0,5 ml de ácido fosfórico 85% y 50 ml de hexano. La mezcla se homogeneizó en licuadora a elevada velocidad durante dos minutos y se filtró. Se tomaron 25 ml de la fase acuosa y se particionaron dos veces con 25 ml de cloroformo. El extracto se llevó a sequedad en evaporador rotatorio a 60°C y presión reducida. El extracto seco se redisolvió en el volumen de cloroformo adecuado y se sembró en el cromatofolio. El solvente de desarrollo y las condiciones de visualización fueron las mismas que las empleadas en el método del plug.

## II.2. DESARROLLO DE UN METODO ANALITICO PARA LA DETERMINACION DE ACIDO CICLOPIAZONICO EN MANI

### II.2.1. Preparación y cuantificación del patrón de ácido ciclopiazónico

A partir de 5 mg de ácido ciclopiazónico puro (SIGMA Chemical Co., St. Louis, MO, USA, C1017) se practicaron las diluciones correspondientes para obtener soluciones de 50 µg/ml, 25 µg/ml y 5 µg/ml en metanol. Cada una de las soluciones se cuantificó espectrofotométricamente utilizando un equipo Hewlett Packard 845x UV-Vis System y celdas de 1 cm de longitud. La absorbancia del CPA se midió a 284 nm ( $\log \epsilon = 4.31$ , peso molecular 336) (Le Bars, J., 1979).

### II.2.2. Selección de un método para el análisis de ácido ciclopiazónico en maní

Se probaron distintos métodos seleccionados de bibliografía para el análisis de ácido ciclopiazónico en maní o en otros sustratos con la correspondiente adaptación del método para su aplicación en maní. Se realizaron modificaciones de los mismos para mejorar su rendimiento y aumentar la reproducibilidad del método. En cada uno de los métodos ensayados se evaluó la posibilidad de detección simultánea de aflatoxinas y ácido ciclopiazónico.

#### II.2.2.1. Métodos de extracción evaluados

##### a) Método BF modificado (figura II.2)

Se extrajeron 25 g de maní a elevada velocidad en licuadora durante 2 minutos, con una mezcla de 125 ml de metanol-agua (55+45), 0,5 ml de ácido fosfórico 85% y 20 ml de hexano. Luego de filtrar se tomaron 25 ml de la fase acuosa (inferior) y

se extrajeron con 25 ml de cloroformo en ampolla de decantación agitando un minuto. Se decantó la fase clorofórmica (inferior) y se evaporó a 60°C y presión reducida hasta sequedad en evaporador rotatorio Büchi 011 (Suiza). El extracto seco se resuspendió en el volumen de cloroformo adecuado y se sembró en el cromatofolio correspondiente.

b) Método de Lansden (1986) (figura II.3)

Se molieron los granos de maní para obtener una muestra homogénea de 50g. Se adicionaron 300 ml de éter de petróleo y se agitó durante cuatro horas en shaker. Se filtró al vacío sobre papel de fibra de vidrio, enjuagando con dos porciones de 100 ml de éter de petróleo. Se dejó secar la harina en el Buchner haciendo vacío y luego se interrumpió el vacío y se dejó secando toda la noche. Se tomó la harina seca con 250 ml de una mezcla de metanol-cloroformo (20+80) y 0,5 ml de ácido fosfórico y se agitó en shaker durante 30 minutos. Se filtró a través de papel Whatman N° 4, se tomaron 50 ml del filtrado y se llevaron a ampolla de decantación junto con 50 ml de una solución de bicarbonato de sodio 0,5 N. Luego de agitar vigorosamente durante 30 segundos se centrifugó a 1000 rpm durante 15 minutos. Se dejó decantar y se separó la fase inferior (fase clorofórmica) que se guardó para determinación de aflatoxinas. La fase superior se neutralizó con 7 ml de ácido clorhídrico concentrado y se extrajo 2 veces con porciones de 25 ml de cloroformo, agitando 15 segundos y centrifugando cada vez a 800 rpm durante 15 minutos. Se combinaron las dos porciones de cloroformo y se llevaron a sequedad en evaporador rotatorio a 60°C y presión reducida. El extracto se redisolvió en 500 µl de cloroformo y se sembró en el cromatofolio correspondiente.

c) Método de Gorst-Allman & Steyn (1979) (figura II.4)

Se molieron los granos de maní para obtener una muestra homogénea de 100g. Se extrajeron con 400 ml de una mezcla de metanol-cloroformo (1:1) a elevada velocidad en licuadora en 4 sesiones de 1 minuto respectivamente. Se filtró la mezcla y el filtrado fue llevado a sequedad en evaporador rotatorio a presión reducida y 60°C. El residuo resultante se particionó con 200 ml de una mezcla de n-hexano y metanol 90% (1:1). La fase de hexano se descartó y la fase de metanol se evaporó a sequedad en evaporador rotatorio. El residuo se particionó en 200 ml de una mezcla de cloroformo-agua (1:1) y la fase clorofórmica se extrajo con una solución saturada de bicarbonato de sodio (3 x 100 ml). La fase clorofórmica se concentró y se guardó para la determinación de aflatoxinas. La fase acuosa se acidificó a pH 2 con HCl 0,5 N y se extrajo con cloroformo (3 x 100 ml). El extracto clorofórmico se concentró y se utilizó para la determinación de ácido ciclopiazónico.

d) Método de Prasongsidh *et al.* (1998) (figura II.5)

Se extrajeron 25 g de maní con 25 ml de una mezcla de metanol-bicarbonato de sodio 2% (7:3) a elevada velocidad en licuadora durante 3 minutos. Se filtró la mezcla y el filtrado se desgrasó con 100 ml de hexano en ampolla de decantación agitando vigorosamente durante 1 minuto. La fase acuosa se acidificó a pH 3 con HCl 6N y se extrajo con 100 ml de cloroformo. El extracto se evaporó a sequedad en evaporador rotatorio a presión reducida y 60°C.

e) Método de Prasongsidh *et al.* modificado (figura II.6)

Se extrajeron 25 g de maní con 100 ml de una mezcla de metanol-bicarbonato de sodio 2% (7:3) a elevada velocidad en licuadora durante 3 minutos. La mezcla se centrifugó a 1500 rpm durante 15 minutos y se filtró. El filtrado se desgrasó 2 veces con porciones de 50 ml de hexano en ampolla de decantación agitando vigorosamente durante 1 minuto. A la fase acuosa se le agregaron 25 ml de una solución de KCl 10% y se acidificó a pH 2 con HCl 6N. La solución se transfirió cuantitativamente a una ampolla de decantación, donde se extrajo 2 veces con 25 ml de cloroformo respectivamente, agitando suavemente durante 1 minuto. Se decantó la fase clorofórmica (fase inferior) y se filtró sobre sulfato de sodio anhidro. El extracto se evaporó a sequedad en evaporador rotatorio a presión reducida y 60°C.

#### II.2.2.2. Métodos de purificación del extracto ensayados

A los fines de purificar el extracto obtenido por los métodos de extracción ensayados se procedió a la limpieza del mismo por medio de columnas cromatográficas comerciales. Las columnas utilizadas y los métodos de purificación se detallan a continuación:

- a) Columna Extrelut 3 (Merck, Darmstadt, Germany), Método de Prasongsidh *et al.* (1998). Se redisolvió el extracto en 5 ml de cloroformo y se purificó el mismo por medio de una columna EXTRELUT 3 con el agregado de 10 ml de dietil éter y 5 ml de una mezcla de cloroformo-acetona (1:1). El CPA se eluyó con 10 ml de una mezcla de cloroformo-metanol (75:25), que fue posteriormente evaporada a sequedad.

- b) Columna Extrelut 3 (Merck, Darmstadt, Germany), Método FA 880062, Extraction of aflatoxins from peanut butter (Chromatography Merck, application notes). Se redisolvió el extracto en 2 ml de diclorometano. Se acondicionó la columna con 9 ml de una mezcla de dietil éter-hexano (3:1). El lavado se realizó con 5 ml de una mezcla de tolueno-ácido acético (9:1) y 5 ml de dietil éter-hexano (3:1). La elución se realizó con 10 ml de una mezcla de diclorometano-acetona (9:1), que luego se evaporó a sequedad.
- c) Columna Adsorbex RP-18 (Merck, Darmstadt, Germany), Método EN 880046, Extraction of phenoxy acid herbicides from water (Chromatography Merck, application notes). Se redisolvió el extracto en 5ml de metanol-agua (7:3) y se ajustó a pH 2 con HCl. La columna se acondicionó con 6 ml de metanol y 3 ml de agua ajustada a pH 2. El lavado se realizó con 1 ml de agua ajustada a pH 2, luego de lo cual se secó la columna bajo vacío durante 10 minutos. Posteriormente se eluyó con 2 porciones de 0,5 ml de metanol, que luego se llevó a sequedad.

### II.2.2.3. Cromatografía en capa delgada (TLC)

La detección de ambas micotoxinas se realizó por cromatografía en capa delgada, utilizando cromatofolios de sílica gel 60 sin indicador fluorescente. En el caso del CPA los cromatofolios fueron previamente sumergidos en una solución de ácido oxálico 2% en metanol y secados en estufa a 100°C durante 10 minutos.

Para el desarrollo de las placas cromatográficas se evaluaron diversos sistemas de solventes:

- a) Benceno-ácido acético-metanol (90+5+7) (Trucksess *et al.*, 1987)

- b) Cloroformo–metilisobutilcetona (4:1) (Gallagher *et al.*, 1978)
- c) Tolueno-acetato de etilo-ácido fórmico (5+4+1) (Dorner *et al.*, 1983)
- d) Tolueno-acetato de etilo-diclorometano-ácido fórmico (70:50:50:20) (Gqaleni *et al.*, 1996b)
- e) Cloroformo-acetona (9:1) (Gorst-Allman & Steyn, 1979)
- f) Acetato de etilo-2-propanol-amoniaco (50+15+10) (Lansden, 1986)
- g) Acetato de etilo-2-propanol-amoniaco (80:15:10) (Gorst-Allman & Steyn, 1979)
- h) Acetato de etilo-2-propanol-amoniaco (40+30+20)

Las aflatoxinas se visualizaron bajo luz UV a 366 nm. Para la detección del CPA se estudiaron los siguientes reveladores:

- a) Reactivo de Erlich (1g de p-dimetilaminobenzaldehído en 75 ml de etanol 96% y 25 ml de HCl (c)). Luego de 5 minutos de rociar la placa cromatográfica con el reactivo, el CPA desarrolla manchas de color azul.
- b) FeCl<sub>3</sub> 3% en etanol. El CPA desarrolla color rojo anaranjado luego de 5 minutos de ser rociado con el revelador. (Gorst-Allman & Steyn, 1979)
- c) Revelador de Prochazka (formaldehído 35%, HCl 25%, Etanol 96% (1:1:2)). La placa cromatográfica rociada con el revelador se seca a temperatura ambiente y posteriormente se lleva a una estufa de 100°C por un período de 5 a 10 minutos, luego de lo cual el CPA se visualiza bajo luz UV a 366 nm como un compuesto fluorescente de color amarillo anaranjado. (Dr. Mario Vega, Universidad de Concepción, Chile; comunicación personal)

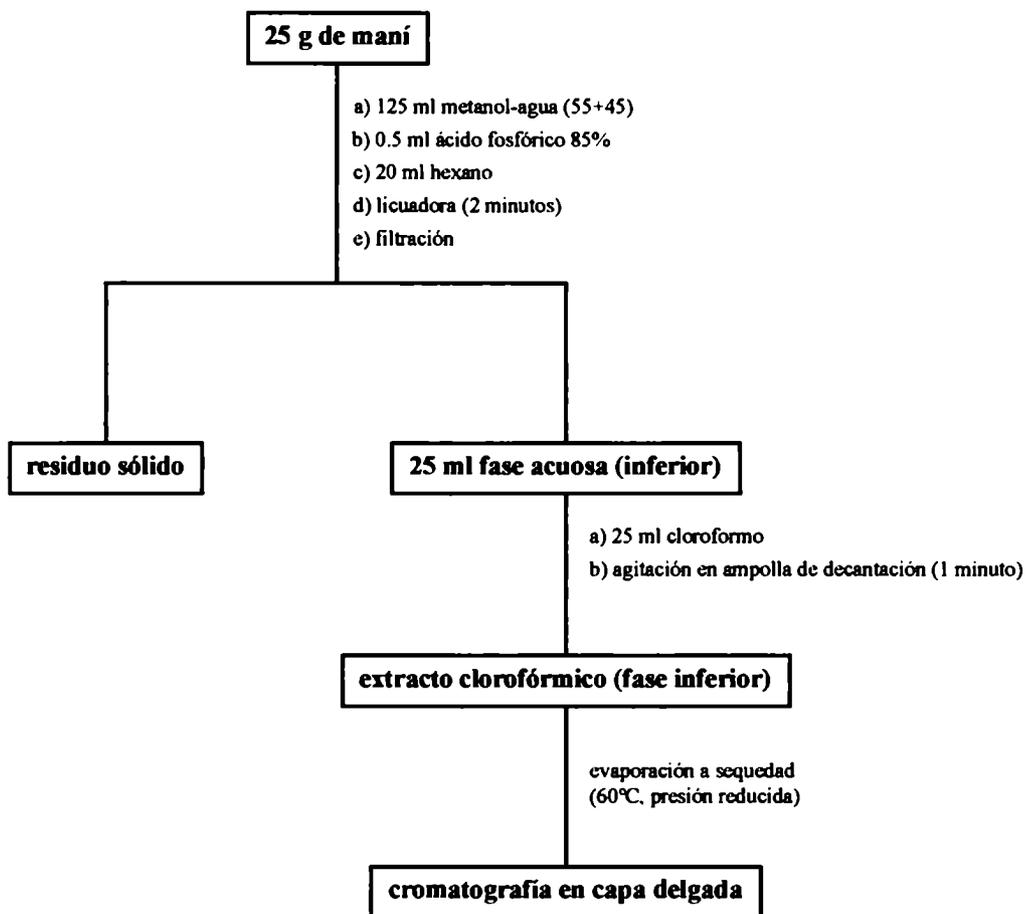


Figura II.2. Método BF modificado

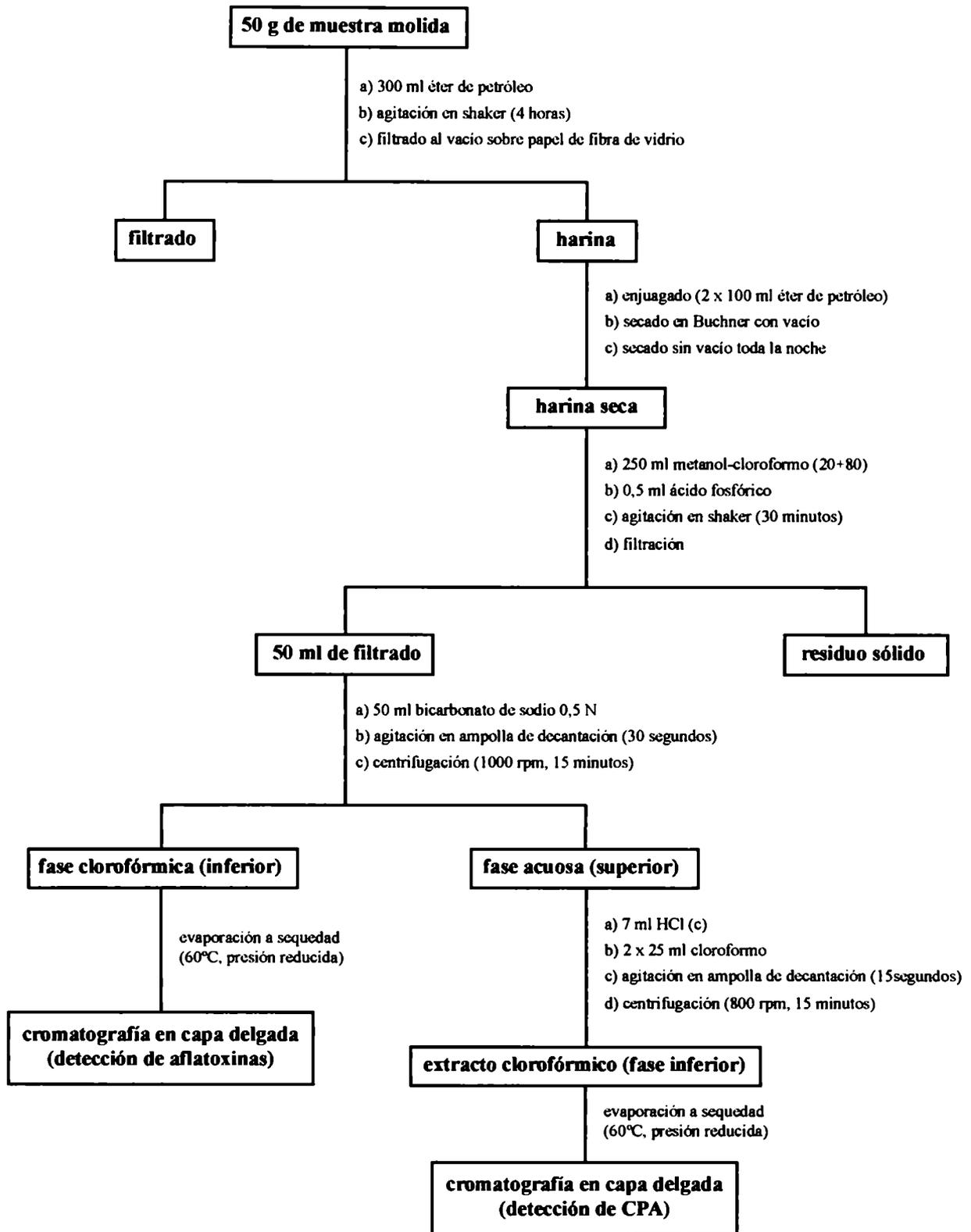


Figura II.3. Método de Lansden

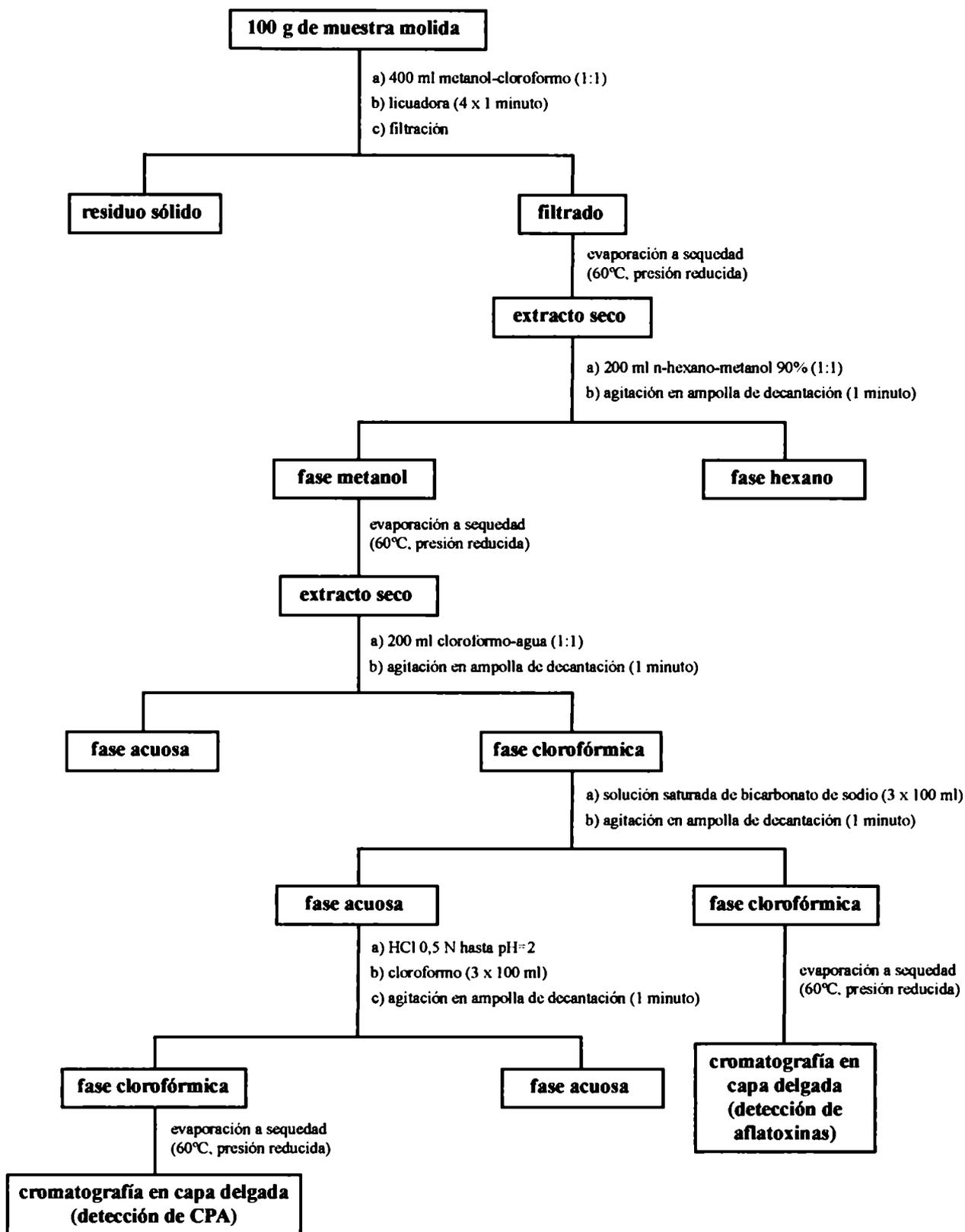


Figura II.4. Método de Gorst-Allman y Steyn

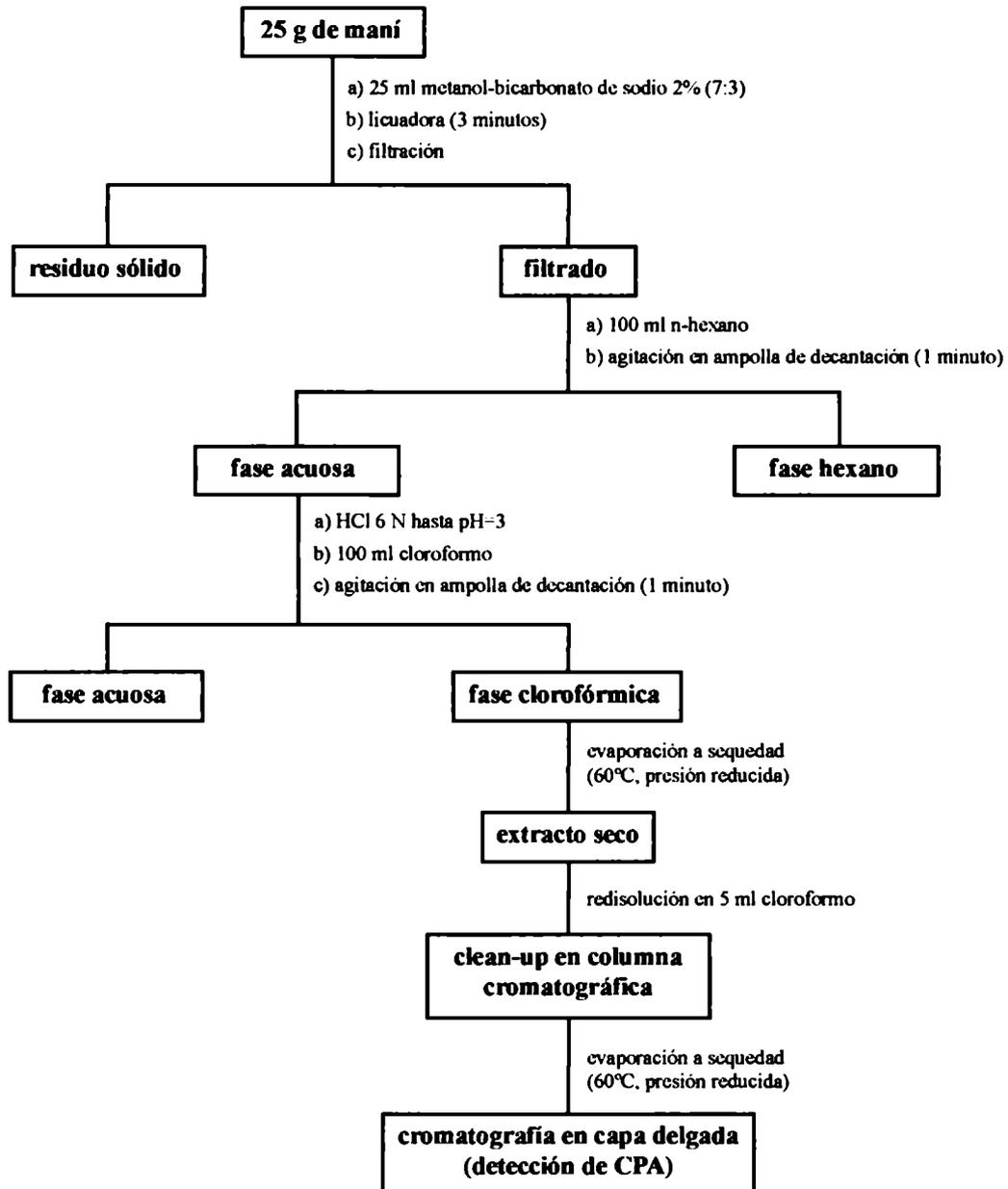
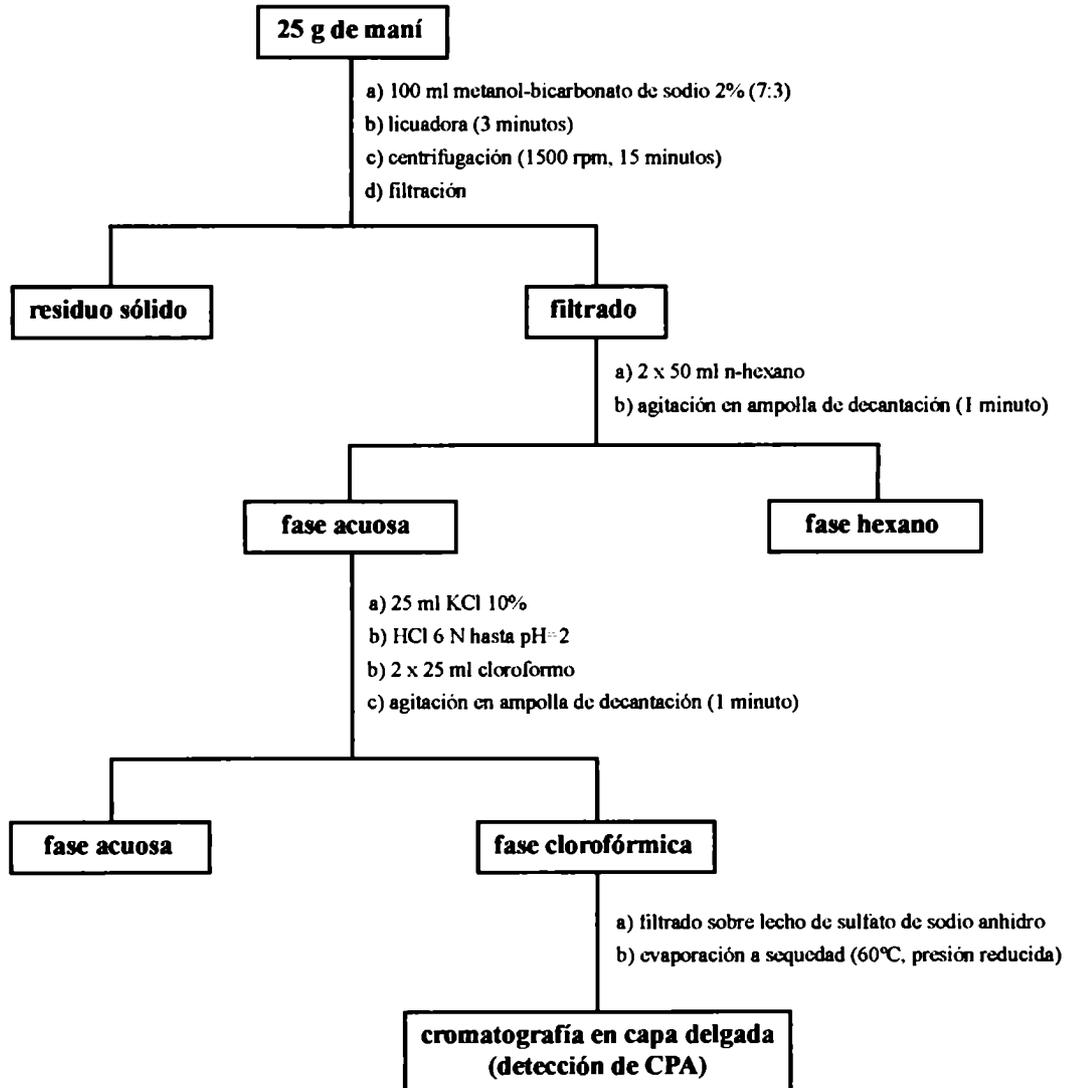


Figura II.5. Método de Prasongsidh *et al.*



### **II.2.3. Estudio del método de Prasongsidh *et al.* modificado para el análisis de ácido ciclopiazónico en maní**

#### **II.2.3.1. Recuperación**

Se evaluó el porcentaje de recuperación del método de Prasongsidh *et al.* modificado para ácido ciclopiazónico y para aflatoxina B<sub>1</sub> con el fin de determinar si el método podría ser aplicado a la detección simultánea de ambas micotoxinas. Se obtuvieron muestras fortificadas utilizando soluciones patrón de aflatoxina B<sub>1</sub> y de ácido ciclopiazónico, las cuales fueron agregadas a 25 g de maní en las cantidades correspondientes para alcanzar los niveles de contaminación deseados para ambas toxinas (100 µg/kg, 200 µg/kg y 500 µg/kg). Para cada nivel de contaminación se hicieron análisis por quintuplicado.

Los resultados se analizaron utilizando el método de los cuadrados mínimos y por medio de un ANOVA de la regresión lineal. La relación lineal entre la cantidad de toxina hallada por el método en estudio y la realmente presente en las muestras se analizó por medio del coeficiente de Pearson; a partir de la pendiente de la recta de regresión se evaluó la recuperación y sus límites de confianza. El límite de detección se obtuvo de la recta de regresión lineal considerando tres desviaciones estándar de la ordenada al origen (FAO, 1991).

#### **II.2.3.2. Repetibilidad**

Se evaluó la repetibilidad del método para el análisis de ácido ciclopiazónico. Para ello se fortificaron muestras de maní con una solución patrón de CPA en la cantidad adecuada para lograr un nivel de contaminación de 200 µg/kg. Se practicaron diez análisis sobre muestras de 25 g de este material. Los resultados se analizaron por

medio del cálculo del promedio, desviación estándar y desviación estándar relativa (RSD<sub>r</sub>).

## II.3. ESTUDIO DE LA CO-OCURRENCIA NATURAL DE AFLATOXINAS Y ACIDO CICLOPIAZONICO EN MANI

### **II.3.1. Muestras de maní**

Se analizaron 50 muestras de maní provenientes de la zona manisera de la provincia de Córdoba. El muestreo fue realizado por personal de la Estación Experimental Regional Agropecuaria Manfredi del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) a nivel de productores y/o acopiadores. Las mismas correspondían a la cosecha 1998. Cada muestra de 1 kg de maní fue molida para producir una pasta homogénea y luego se tomó una muestra representativa de 25 g para cada análisis. Todos los análisis se efectuaron por duplicado.

### **II.3.2. Análisis de aflatoxinas**

La determinación de aflatoxinas se realizó por el Método Oficial de la AOAC para análisis de aflatoxinas en maní (método BF, 970.45, AOAC). Se extrajeron 25 g de muestra con 125 ml de una mezcla de metanol-agua (55+45), 50 ml de hexano y 1 g de NaCl a elevada velocidad en licuadora durante 1 minuto. La mezcla se centrifugó a 2000 rpm durante 5 minutos y se tomaron cuantitativamente 25 ml de la fase acuosa, que se transfirieron a una ampolla de decantación. Las aflatoxinas se extrajeron con 25 ml de cloroformo, agitando durante 1 minuto. El extracto clorofórmico se llevó a sequedad en evaporador rotatorio a presión reducida y 60°C.

La detección y cuantificación de aflatoxinas se realizó por cromatografía en capa delgada. Se utilizaron cromatofolios de sílica gel 60 sin indicador fluorescente. Se trabajó con una solución patrón de aflatoxinas de las siguientes concentraciones: 0,5

$\mu\text{g/ml}$  de AFB<sub>1</sub> y AFG<sub>1</sub>; 0,1  $\mu\text{g/ml}$  de AFB<sub>2</sub> y AFG<sub>2</sub>, y se sembraron volúmenes mayores que 1  $\mu\text{l}$  y menores que 10  $\mu\text{l}$ . El extracto se redisolvió en benceno-acetonitrilo (98+2), y en aquellos casos en que fue necesario se realizaron las diluciones correspondientes; distintas alícuotas del extracto redisolto se sembraron en la placa cromatográfica junto con masas conocidas de patrón y se sembraron puntos con estándar interno. Se utilizaron jeringas Hamilton de 2  $\mu\text{l}$  y 10  $\mu\text{l}$ . Como solvente de desarrollo se utilizó una mezcla de cloroformo-acetona (9+1). La cuantificación se llevó a cabo por comparación visual de las manchas; éstas fueron observadas en cuarto oscuro bajo luz UV (366 nm) con una lámpara Desaga UV131.000. Las aflatoxinas se visualizan como manchas fluorescentes de color azul las aflatoxinas “B” y de color verdoso las “G”, en orden decreciente de R<sub>f</sub>: B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub>. La presencia de aflatoxinas en las muestras positivas se confirmó desarrollando la placa cromatográfica en otro sistema de solventes (tolueno-acetato de etilo-ácido fórmico, 5:4:1) y por el Método Oficial de la AOAC 975.37, en el cual se obtuvo el derivado con ácido trifluoroacético, que se observa como manchas fluorescentes de color azul con un R<sub>f</sub> de aproximadamente  $\frac{1}{4}$  del de las aflatoxinas. Además se roció la placa con ácido sulfúrico (25%) que produce un viraje en la fluorescencia de las aflatoxinas de azul o azul-verdoso a amarillo y permite descartar falsos positivos.

La concentración de aflatoxinas en las muestras positivas se expresó en  $\mu\text{g/kg}$ .

### **II.3.3. Análisis de ácido ciclopiazónico**

Para el análisis de ácido ciclopiazónico se utilizó el método que en el presente trabajo se denominó de “Método de Prasongsidh *et al.*” modificado. Para la extracción del CPA se aplicó la técnica descrita en II.2.2.1.e).

La detección y cuantificación de CPA y aflatoxinas se realizó por cromatografía en capa delgada. Se utilizaron cromatofolios de sílica gel 60 sin indicador fluorescente, previamente sumergidos durante diez minutos en una solución de ácido oxálico 2% en metanol y secados en estufa a 100°C durante diez minutos. Se trabajó con una solución patrón de 25 µg/ml de CPA, sembrando volúmenes entre 0,5 y 2 µl. El extracto seco se redisolvió en metanol, y en aquellos casos en que fue necesario se realizaron las diluciones correspondientes; distintas alícuotas del extracto redisoluelto se sembraron en la placa cromatográfica junto con masas conocidas de patrón y se sembraron puntos con estándar interno. Se utilizaron jeringas Hamilton de 2 µl y 10 µl. Como solvente de desarrollo se utilizó una mezcla de acetato de etilo-2-propanol-amoníaco (40+30+20). Luego del desarrollo las placas se secaron durante 5 minutos a 50°C para evaporar el amonio y se rociaron con Reactivo de Erlich, con el subsecuente desarrollo de manchas de color azul. La evaluación se realizó luego de 10 minutos de desarrollo de color y la cuantificación se llevó a cabo por comparación visual de las manchas. En las muestras positivas la presencia de CPA se confirmó por el espectro de absorción del compuesto sin derivatizar (máximo de absorción  $\lambda=280$  nm) y del derivado obtenido de la reacción con dimetilaminobenzaldehído (máximo de absorción  $\lambda=546$  nm). Además se realizó como prueba confirmatoria una corrida bidimensional en TLC según la técnica de Matsudo & Sasaki (1995). Se sembró la muestra, el estándar y el estándar interno en una placa cromatográfica a 10 cm del borde y se desarrolló con una mezcla de hexano-dietil éter (6:1) hasta el borde. Luego se dejó secar y se cortó la parte superior a 9 cm del borde para remover las impurezas no polares. La porción restante de la placa se invirtió y se desarrolló hacia el lado contrario con una mezcla de cloroformo-metilisobutilcetona (4:1) hasta el borde. Se dejó secar y se reveló con Reactivo de

Erich, con el subsecuente desarrollo de manchas de color azul. Luego de 10 minutos de desarrollo de color se compararon los  $R_f$  del estándar, el estándar interno y la muestra.

La concentración de CPA en las muestras positivas se expresó en  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .

## II.4. ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LA ACTIVIDAD ACUOSA, LA TEMPERATURA Y EL TIEMPO DE INCUBACION SOBRE LA CO-PRODUCCION DE AFLATOXINA B<sub>1</sub> Y ACIDO CICLOPIAZONICO EN MANI

### II.4.1. Sustrato

Se emplearon muestras de maní confitería variedad “runner” cultivados en la provincia de Córdoba durante las campañas 2001-2002. Se recibieron los granos de maní fuera de la vaina. Las muestras fueron analizadas por SENASA para verificar ausencia de contaminación con aflatoxinas. Se aplicó el método analítico desarrollado durante el presente trabajo para determinar la ausencia de CPA (método de Prasongsidh *et al.* modificado).

### II.4.2. Selección del procedimiento de desinfección

#### II.4.2.1. Tratamiento con hipoclorito de sodio

Una muestra de 50 g de maní se transfirió a un matraz estéril y se efectuó una desinfección superficial de los granos sumergiéndolos un minuto en hipoclorito de sodio 5% y enjuagándolos tres veces con agua estéril. Se secaron en flujo laminar, sobre una hoja de papel de filtro estéril (Fernández Pinto, 1986).

#### II.4.2.2. Tratamiento con radiación gamma

Se distribuyeron granos de maní en porciones de 50 g dentro de bolsas de polietileno estériles (Whirl-Pak WP1065 NIT Laboratory Products). Las muestras fueron irradiadas con una fuente de <sup>60</sup>Co en la Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA) recibiendo las siguientes dosis: 4 kGy, 6 kGy y 8 kGy.

### II.4.2.3. Evaluación de los métodos de desinfección

#### a) Determinación del porcentaje de granos contaminados por mohos

Se examinaron todos los tratamientos de desinfección y una muestra control sin tratamiento alguno. En cada caso se depositaron asépticamente 100 granos de maní sobre la superficie de diez cajas de Petri con Agar Extracto de Malta. Luego de 7 días de incubación a 25°C se determinó el porcentaje de granos en los cuales se detectó crecimiento fúngico.

#### b) Determinación de la viabilidad de las semillas

Se examinaron todos los tratamientos de desinfección y una muestra control sin tratamiento alguno. En cada caso se depositaron asépticamente 100 granos de maní en una cámara húmeda. Esta consistía en una caja de Petri estéril, conteniendo una base de algodón en su interior y sobre él un papel de filtro de diámetro apropiado. Se agregaron 10 ml de agua estéril para humedecer la cámara de manera de tener un ambiente apropiado para la germinación de las semillas. Los granos se distribuyeron a razón de 10 por caja. Luego de 7 días de incubación a 25°C se determinó el porcentaje de semillas germinadas.

### **II.4.3. Acondicionamiento de los granos a diferentes niveles de actividad acuosa**

Los granos de maní se distribuyeron en bolsas de polietileno (80 cm x 40 cm x 40  $\mu$ m) a razón de 2,5 kg por bolsa, que a su vez fueron introducidas en otra bolsa de las mismas características. Este material se desinfectó por tratamiento con radiación gamma

a una dosis de 6 kGy en la CNEA (fuente de  $^{60}\text{Co}$ , actividad = 416.790 Curies, tasa de dosis = 28,50 kGy/h, dosis máxima = 6 kGy, dosis máxima = 8 kGy).

La humedad de los granos de maní desinfectados se determinó por triplicado en muestras de aproximadamente 2 g por secado en estufa de vacío a 60°C durante 7 días. De acuerdo al contenido de humedad, a 2,5 kg de este maní se agregó la cantidad de agua estéril necesaria, según los datos obtenidos de isothermas de sorción de agua (Karon & Hillery, 1949), para ajustar el nivel de actividad acuosa a los siguientes valores: 0,86; 0,88; 0,92 y 0,94. El material se mezcló exhaustivamente dentro de las bolsas de polietileno y se dejó estabilizar a 7°C en un recipiente hermético durante siete días. Con el objeto de verificar la estabilización de los granos al nivel de  $a_w$  deseado, se confirmó que el valor de la misma no presentara modificaciones ( $\pm 0,005$  unidades) durante dos mediciones consecutivas.

#### **II.4.4. Determinación de la actividad acuosa de los granos**

Se utilizó el ensayo de licuefacción de los cristales salinos (FAO, 1991) para verificar que el material se encontrara dentro del intervalo de actividad acuosa requerido.

Las determinaciones de  $a_w$  de los granos por debajo de un nivel de 0,90 se llevaron a cabo con un higrómetro Vaisala Humicap HMI31 (Vaisala Oy PL 26 SF00421, Helsinki, Finlandia) equipado con un sensor HMP35. Se utilizaron como patrón soluciones saturadas de NaCl ( $a_w=0,753$ ), KBr ( $a_w=0,809$ ), KCl ( $a_w=0,843$ ), KNO<sub>3</sub> ( $a_w=0,927$ ) y K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ( $a_w=0,973$ ) en equilibrio a 25°C (Troller & Scott, 1992). La curva de calibración se obtuvo por regresión lineal.

Las mediciones a un nivel de  $a_w$  mayor a 0,90 se efectuaron por el método de Landrock-Proctor, determinando gravimétricamente los cambios en el contenido acuoso de muestras del material luego de haberse equilibrado con atmósferas de humedad relativa conocida. Estas atmósferas se obtuvieron mediante la utilización de soluciones saturadas de las sales inorgánicas previamente mencionadas. Por medio de una curva de calibración se determina la humedad relativa que no causaría modificación en el peso de la muestra y, en consecuencia, la  $a_w$  de la muestra (Adams & Moss, 1995).

#### **II.4.5. Microorganismos**

Se utilizaron cuatro cepas autóctonas de *Aspergillus flavus* productoras de AFB<sub>1</sub> y CPA seleccionadas entre 70 aislamientos del grupo *Aspergillus* sección *Flavi* obtenidas en la primera parte del presente trabajo (II.1). El sustrato de donde provenían, así como las técnicas empleadas para su aislamiento e identificación han sido previamente descritas en las secciones II.1.1., II.1.2. y II.1.3. del presente trabajo respectivamente.

#### **II.4.6. Determinación de la capacidad toxicogénica de las cepas utilizadas**

A los fines de seleccionar para el presente trabajo cepas fuertemente productoras tanto de CPA como de AFB<sub>1</sub> se evaluó su capacidad toxicogénica en maní. Se seleccionaron 7 de las 70 cepas aisladas de maní para cuantificar la producción de ambas micotoxinas en dicho sustrato.

Se colocaron muestras de 25 g de maní desinfectado en sendos erlenmeyers de 250 ml, se agregaron 5 ml de agua estéril y se inoculó con una suspensión de esporas de cada una de las cepas en estudio. Se cuantificó el inóculo utilizando una cámara de

Neubauer (Fischer, 1954) verificando en todos los casos que la suspensión de esporas se encontrara en el orden de  $10^6$  esporas/ml. Se incubó a 25°C y se retiraron muestras para el análisis a los 7 y a los 14 días de incubación.

La extracción de aflatoxina B<sub>1</sub> se realizó por el Método Oficial de la AOAC para análisis de aflatoxinas en maní (método BF, 970.45, AOAC) descrito previamente en II.3.2. La determinación de CPA se realizó por el método de Prasongsidh *et al.* modificado según la técnica descrita en II.3.3. La concentración de ambas micotoxinas se expresó en µg/kg.

#### **II.4.7. Preparación y cuantificación del inóculo**

En el presente trabajo se utilizó un inóculo cóctel combinando las cuatro cepas de *Aspergillus flavus* seleccionadas para esta etapa del trabajo de investigación. Las cuatro cepas elegidas se incubaron en tubos inclinados de Agar Extracto de Malta (MEA) durante 7 días a 25°C. A cada tubo se le adicionaron 2,5 ml de una solución ajustada con glicerol al nivel de  $a_w$  correspondiente y se agitó en Vortex durante 30 segundos para cosechar los conidios. Las suspensiones de los cuatro tubos se reunieron para obtener una suspensión madre; ésta se diluyó con la solución de glicerol de  $a_w$  correspondiente al material a inocular hasta obtener un título de  $10^6$  esporas/ml. Este valor se determinó cuantificando el inóculo en una cámara de Neubauer (Fischer, 1954).

#### **II.4.8. Inoculación**

El maní desinfectado y acondicionado a las actividades acuosas correspondientes se distribuyó asépticamente en erlenmeyers de 250 ml a razón de 25 g por erlenmeyer. La inoculación se realizó por sextuplicado para cada combinación de  $a_w$ , T y tiempo de

incubación estudiados. Cada erlenmeyer se inoculó con 1 ml de la suspensión de esporas de  $a_w$  idéntica al sustrato y título  $10^6$  esporas/ml, y se agitó vigorosamente para lograr una distribución homogénea del inóculo.

#### **II.4.9. Incubación**

Los erlenmeyers inoculados se incubaron a las temperaturas seleccionadas ( $20 \pm 0,2^\circ\text{C}$ ;  $25 \pm 0,2^\circ\text{C}$  y  $30 \pm 0,2^\circ\text{C}$ ) en oscuridad en incubadoras Sanyo Modelo MIR-253. Los materiales estabilizados a los niveles de  $a_w$ : 0,86; 0,88; 0,92 y 0,94 se incubaron durante períodos de 7, 14, 21 y 28 días respectivamente. Durante el período de incubación los cultivos se mantuvieron en bandejas metálicas dentro de bolsas de polietileno (80 cm x 40 cm x 40  $\mu\text{m}$ ). En cada caso se incluyeron en las mismas bandejas recipientes conteniendo una solución de  $a_w$  ajustada con glicerol, preparada según Gonzalez (1984), de idéntico nivel que el material inoculado. Estas soluciones fueron renovadas diariamente.

#### **II.4.10. Análisis de micotoxinas**

Para cada combinación de  $a_w$ , temperatura y tiempo de incubación se realizó un análisis por triplicado de cada una de las micotoxinas estudiadas. Para la extracción y cuantificación de aflatoxina B<sub>1</sub> se aplicó el Método Oficial de la AOAC para análisis de aflatoxinas en maní (método BF, 970.45, AOAC) descrito previamente en II.3.2. La determinación de CPA se realizó por el método de Prasongsidh *et al.* modificado según la técnica descrita en II.3.3.

La concentración de ambas micotoxinas se expresó en  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Para cada punto se calculó el promedio de los resultados de los tres ensayos correspondientes.

#### **II.4.11. Análisis estadístico**

Los resultados obtenidos para la producción de AFB<sub>1</sub> y CPA en las condiciones estudiadas fueron analizados por medio de un ANOVA de 3 factores, con un diseño factorial, empleando el paquete de software estadístico STATISTICA, versión 5.0, StatSoft, Inc.

Las comparaciones a posteriori entre las medias de los distintos tratamientos se efectuaron mediante el test de Tukey a un nivel de significación del 5%.

Se aplicó un modelo de regresión de cuadrados mínimos para elaborar gráficos de superficies de respuesta para evaluar las tendencias en la producción de AFB<sub>1</sub> y CPA (STATISTICA, versión 5.0).

# III

## RESULTADOS Y DISCUSION

---

CAPITULO

### III.1. ESTUDIO DE LA DISTRIBUCION DE *ASPERGILLUS* SECCION *FLAVI*

#### III.1.1. Distribución geográfica de las cepas

La primera etapa del presente trabajo consistió en un estudio de la distribución de las especies toxicogénicas de *Aspergillus* sección *Flavi* en cultivos de maní procedentes de las diferentes localidades del área manisera núcleo argentina, ubicada en la región centro-sur de la provincia de Córdoba (figura II.1). De las 57 muestras analizadas, provenientes de 31 localidades, se aislaron en total 70 cepas (Tabla III.1). *A. flavus* se aisló del 67% de las muestras analizadas, en tanto que *A. parasiticus* estuvo presente en el 30% de las mismas. *A. nomius*, una especie relativamente poco frecuente en la naturaleza, no fue aislada de ninguna muestra. Se encontraron cepas de *A. flavus* y/o *A. parasiticus* en el 74% de las muestras analizadas. En base a estos resultados, se puede afirmar que las cepas de *A. flavus* y *A. parasiticus* están ampliamente distribuidas en la zona manisera de la provincia de Córdoba.

Por otra parte, se constató que, si bien *A. flavus* es la especie aflatoxigénica predominante, *A. parasiticus* representa un porcentaje considerable de los aislamientos obtenidos de maní, a diferencia de lo encontrado en otros sustratos (Diener & Davis, 1970; Bresler *et al.*, 1995; Vaamonde *et al.*, 2003) en los cuales la mayoría de las cepas productoras de aflatoxinas corresponde a la especie *A. flavus* y se aíslan, en general, muy pocas cepas de *A. parasiticus*.

**Tabla III.1. Cepas de *Aspergillus* sección *Flavi* aisladas de 31 localidades de la zona manisera argentina**

Localidad	N° de muestras analizadas	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus parasiticus</i>
		N° de cepas aisladas	N° de cepas aisladas
Alejandro Roca	4	2	-
Baigorria	1		1
Bengolea	2		
Carnerillo	2	1	2
Charras	1	1	
Chucul	1		
Colazo	2	4	
Corralito	1		
El Durazno	1		
General Cabrera	3	1	1
Gigena	1	1	1
Hernando	4		
Holmberg	3	2	
La Carlota	1	1	
Las Acequias	2		
Las Perdices	2	4	
Los Molles	1		
Manfredi	3	2	1
Matorrales	2	2	
Oliva	2		1
Oncativo	1	2	-
Pampayasta	1		2
Reducción	2	1	
Río Cuarto	4	5	19
Tegua V. M.	1		
Ticino	1	4	
Ucha	1	-	
Villa Ascasubi	1	2	
Villa del Rosario	1	4	
Villa María	4	3	
Villa Nueva	1	-	-
<b>Total</b>	<b>57</b>	<b>42</b>	<b>28</b>

### III.1.2. Capacidad toxicogénica

Casi todas las cepas de *A. parasiticus* aisladas resultaron productoras de aflatoxinas del grupo B (B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub>) y del grupo G (G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub>) (Tabla III.2). Las cepas de *A. parasiticus* son generalmente aflatoxigénicas, y producen los dos tipos de aflatoxinas (AFB y AFG), aunque no producen ácido ciclopiazónico. Algunos autores señalan que las cepas no toxicogénicas de *A. parasiticus* son extremadamente poco frecuentes (Blaney *et al.*, 1989; Horn *et al.*, 1996; Tran-Dinh *et al.*, 1999). En el presente trabajo sólo 3 cepas de *A. parasiticus* resultaron no toxicogénicas. Estos microorganismos nativos no aflatoxigénicos pueden ser de interés para desarrollar estrategias de control biológico con el fin de reducir la contaminación con aflatoxinas en el maní cultivado en la región. El control biológico de la contaminación con aflatoxinas consiste en la exclusión por el agregado al suelo de cepas no toxicogénicas altamente competitivas de *A. parasiticus* y/o *A. flavus* para competir con las cepas nativas productoras de micotoxinas.

**Tabla III.2. Capacidad toxicogénica de cepas de *A. parasiticus* aisladas de la zona manisera argentina**

Localidad	Nº de cepas aisladas	Nº de cepas toxicogénicas	Perfil de producción de micotoxinas
Baigorria	1	-	-
Carnerillo	2	2	B <sub>1</sub> /B <sub>2</sub> /G <sub>1</sub> /G <sub>2</sub>
General Cabrera	1	1	B <sub>1</sub> /B <sub>2</sub> /G <sub>1</sub> /G <sub>2</sub>
Gigena	1	1	B <sub>1</sub> /B <sub>2</sub> /G <sub>1</sub> /G <sub>2</sub>
Manfredi	1	1	B <sub>1</sub> /B <sub>2</sub> /G <sub>1</sub> /G <sub>2</sub>
Oliva	1	-	-
Pampayasta	2	2	B <sub>1</sub> /G <sub>1</sub> /G <sub>2</sub>
Río Cuarto	19	18	B <sub>1</sub> /G <sub>1</sub> (14); B <sub>1</sub> /G <sub>1</sub> /G <sub>2</sub> (3); B <sub>1</sub> /B <sub>2</sub> /G <sub>1</sub> /G <sub>2</sub> (1)
Total	28	25	

Con respecto a *A. flavus*, se observó una considerable variabilidad en su potencial de producción de micotoxinas, resultados que mostraron concordancia con datos de bibliografía (Hesseltine *et al.*, 1970; Bayman & Cotty, 1993; Egel *et al.*, 1994; Cotty & Cardwell, 1999; Horn & Dorner, 1999). En base a la combinación de micotoxinas producidas (AFB +/-, AFG +/- y CPA +/-) se pueden establecer cinco quimiotipos de *A. flavus* (Tabla III.3). El quimiotipo II se considera atípico porque, en general, el CPA es producido por *A. flavus* solo o en combinación con aflatoxinas de tipo B, pero no junto con aflatoxinas de tipo G.

**Tabla III.3. Quimiotipos de *Aspergillus flavus* basados en la producción de aflatoxinas y CPA.**

Quimiotipo	Micotoxinas		
	AFB	AFG	CPA
I	+	-	+
II	+	+	+
III	+		
IV			+
V	-	-	-

Como se puede observar en la tabla III. 4, la incidencia de cepas de *A. flavus* aflatoxigénicas (quimiotipos I, II y III) fue elevada (76%). El porcentaje de cepas productoras de aflatoxinas suele ser variable de acuerdo al sustrato. Schroeder & Boller (1973) evaluaron la producción de aflatoxinas por cepas de *A. flavus* aisladas de maní, algodón, arroz y sorgo, y reportaron un alto porcentaje de cepas productoras en maní. En general, la proporción de cepas aflatoxigénicas de *A. flavus* aisladas de maní y de suelos de cultivos de maní suele ser elevada (Lisker *et al.*, 1993; Horn *et al.*, 1996). Otros cultivos menos susceptibles que esta oleaginosa a la contaminación con

aflatoxinas, tales como la soja, el trigo y el amaranto presentan una menor proporción de cepas aflatoxicogénicas (Bresler *et al.*, 1995; Vaamonde *et al.*, 2003), lo cual podría sugerir que la capacidad toxicogénica de los hongos que componen la microbiota es un factor importante en relación a la contaminación natural de los diferentes sustratos.

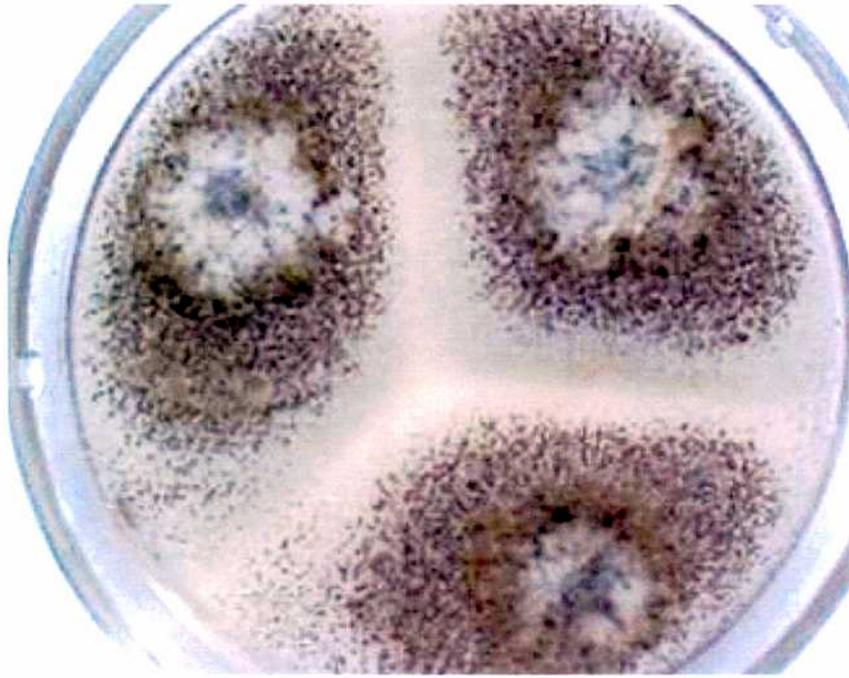
La incidencia de cepas de *A. flavus* productoras de CPA aisladas (quimiotipos I, II y IV) fue aún mayor (90%). Estudios de otros autores sobre la producción de CPA por *A. flavus* aislados de maní también mostraron altas proporciones de cepas productoras de CPA (Blaney *et al.*, 1989; Horn *et al.*, 1996). En el presente trabajo, el mayor porcentaje de cepas aisladas correspondieron al quimiotipo I (AFB+, CPA+) (Tabla III.4). Este resultado sugiere la posibilidad de co-ocurrencia de aflatoxinas y CPA en maní. Aunque los estudios sobre la producción de CPA por cepas de *A. flavus* son menos frecuentes que los referidos a la producción de aflatoxinas, es evidente que una alta proporción de las cepas tienen la capacidad de producir CPA. Esta característica ha sido observada no solamente en las cepas aisladas de maní, sino también de otros sustratos tales como trigo, soja (Vaamonde *et al.*, 2003) y maíz (Resnik *et al.*, 1996a).

**Tabla III.4. Incidencia de *Aspergillus flavus* aislados de maní en los distintos quimiotipos.**

Quimiotipo	Número de cepas de <i>A. flavus</i>	Porcentaje de cepas de <i>A. flavus</i>
I	24	57 %
II	5	12 %
III	3	7 %
IV	9	21 %
V	1	2 %

Las cepas de *A. flavus* que producen aflatoxinas del grupo B pero no CPA (quimiotipo III) fueron menos frecuentes, alcanzando apenas un 7% del total de cepas analizadas. En 1999, Horn & Dorner detectaron sólo un 0,6% de este tipo de cepas y en 1989, Blaney *et al.* hallaron sólo una cepa de 38 analizadas (2,6%) que producía AFB<sub>1</sub> solamente.

Cinco de las cepas aisladas correspondieron al quimiotipo II, el cual, como se mencionó anteriormente puede ser considerado atípico. Estas cepas son similares morfológicamente a *A. flavus* pero producen aflatoxinas del grupo B y G en conjunción con CPA. Varios autores han mencionado previamente que algunas cepas de *A. flavus* producían aflatoxinas B y G (Hesseltine *et al.*, 1970; Saito *et al.*, 1986; Klich & Pitt, 1988b; Saito & Tsuruta, 1993; Vaamonde *et al.*, 1995; Cotty & Cardwell, 1999), pero no han hecho referencia a la producción de CPA. Todas las cepas pertenecientes al quimiotipo II aisladas en el presente trabajo corresponden al tipo S de acuerdo al número y tamaño de los esclerocios (Tabla III.5) La superficie de las colonias se vio de color marrón debido a la gran cantidad de microesclerocios (figura III.1). Presentaron muy escasos conidióforos y el color de los pocos conidios presentes fue similar a los de *A. flavus* (verde amarillento). Cepas con características similares fueron aisladas de suelos de Tailandia (Saito *et al.*, 1986) y fueron denominadas *Aspergillus flavus* var. *parvisclerotigenus* (Saito & Tsuruta, 1993), pero la cepa tipo de este taxón no era productora de aflatoxinas del tipo G. La mayoría de las cepas de *A. flavus* productoras de AFG han sido relacionadas con el fenotipo S. En un estudio de cepas tipo S aisladas de América del Norte y África Occidental, Cotty & Cardwell (1999) hallaron que más del 40% de las cepas tipo S de África Occidental producían tanto AFB como AFG, mientras que las de América del Norte solo producían AFB.



**Figura III.1. Colonias de cepas de *A. flavus* quimiotipo II.**

**Tabla III.5. Características de las cepas atípicas.**

Cepa	Promedio de esclerocios (Nº/cm <sup>2</sup> )	Diámetro de esclerocios $\pm$ SD ( m) <sup>(+)</sup>	AFB <sub>1</sub>	AFB <sub>2</sub>	AFG <sub>1</sub>	AFG <sub>2</sub>	CPA
M32N4/BAFC490*	207,8 <sup>(1)</sup>	297,8 $\pm$ 70,9 <sup>(1)</sup>	+	-	+	-	+
M38N3/BAFC657*	242,6 <sup>(1)</sup>	215,71 $\pm$ 76,7 <sup>(1)</sup>	+	-	+	-	+
M35N2/BAFC589*	268,67 <sup>(1)</sup>	245,14 $\pm$ 54,0 <sup>(1)</sup>	+	-	+	+	+
M11N2	230,3 <sup>(2)</sup>	282,4 $\pm$ 53,4 <sup>(2)</sup>	+	-	+	+	+
M5N11	189,69 <sup>(2)</sup>	232,29 $\pm$ 89,0 <sup>(2)</sup>	+	-	+	+	+

\*BAFC: Cultivo de Colección de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

(1) Datos de Novas y Cabral (2002).

(2) Novas, M.V. (comunicación personal).

(+) Promedio basado en 26 esclerocios.

El patrón atípico de producción de micotoxinas de las cepas del quimiotipo II (AFB+, AFG+, CPA+) había sido detectado previamente por Blaney *et al.* (1989) en algunas cepas aisladas de maní en Queensland, Australia. También había sido reportado por Geiser *et al.* (2000), quien llevó a cabo un análisis filogenético de *A. flavus* y *A. oryzae*, incluyendo cepas provenientes de diferentes orígenes geográficos (California, Texas, Nigeria, Australia).

Tres de las cepas aisladas en el presente trabajo pertenecientes al quimiotipo II (cepas BAFC490, BAFC657 y BAFC589) fueron incluidas en un estudio de compatibilidad vegetativa de cepas de *A. flavus* aisladas de maní en Argentina (Novas & Cabral, 2002) y formaron un grupo único y exclusivo de compatibilidad vegetativa, lo que sugiere que puedan tener un origen clonal común.

Las poblaciones de *A. flavus* son extremadamente diversas desde el punto de vista genético (Bayman & Cotty, 1993; Egel *et al.*, 1994; Geiser *et al.*, 2000). Estudios filogenéticos basados en la caracterización de secuencias de DNA de cinco regiones diferentes del genoma en cepas aisladas de suelos de maní de Australia demostraron la existencia de dos subgrupos llamados grupo I y II (Geiser *et al.*, 1998). Estos resultados fueron confirmados por posteriores análisis filogenéticos de 33 cepas tipo S y L de *A. flavus* procedentes de varias regiones del mundo (Geiser *et al.*, 2000). Tran-Dinh *et al.* (1999) examinaron las relaciones genéticas entre cepas toxicogénicas y no toxicogénicas por medio de RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) análisis y encontraron una separación similar de las cepas de *A. flavus* en dos grupos diferenciados, uno abarcando las cepas toxicogénicas y el otro las no toxicogénicas. El grupo II incluyó las cepas tipo S productoras de AFB, AFG y CPA, aunque unas pocas cepas dentro de este grupo no producían AFG. Los resultados obtenidos por Geiser *et al.* (2000) demostraron que *A. flavus*, como está actualmente definido, representa una

agrupación no monofilética de al menos dos grupos mayoritarios (I y II) y sugirieron que pueden ser necesarios algunos cambios taxonómicos. Estos autores concluyeron que el grupo II merece ser reconocido como una nueva especie.

Las cepas atípicas aisladas en el presente trabajo fueron estudiadas recientemente a nivel molecular y todas ellas se ubicaron en el grupo II (D. Carter, comunicación personal). Cepas con estas características no son frecuentes (sólo 5 de 42 en el presente trabajo) y hasta ahora no han sido encontradas en otro sustrato que no sea el maní (Vaamonde *et al.*, 2003). Asimismo, se encuentra escasa información en la bibliografía sobre este tipo de cepas. Egel *et al.* (1994) sugirieron que estos clones son relativamente raros y menos frecuentemente detectados en nichos relacionados con la agricultura, en los cuales los clones más comunes deben estar mejor adaptados. Hasta el momento, las cepas del grupo II productoras de AFG han sido aisladas en Australia, el Sudeste de Asia y Africa, pero no en América del Norte (Geiser *et al.*, 2000). En el presente trabajo de Tesis se demostró la presencia de este taxón en Argentina, confirmando así su prevalencia en el Hemisferio Sur. Asimismo, se reafirmó que este tipo de cepas parece estar asociado con cultivos de maní.

## III.2. DESARROLLO DE UN METODO ANALITICO PARA LA DETERMINACION DE ACIDO CICLOPIAZONICO EN MANI

### III.2.1. Selección del método para el análisis de ácido ciclopiazónico en maní

#### III.2.1.1. Evaluación de métodos de extracción

La determinación cuantitativa de ácido ciclopiazónico en la matriz alimenticia presenta dificultades tanto en la etapa de extracción como en la purificación de los extractos, de tal modo que no existen al presente métodos oficiales para el análisis de esta toxina en alimentos. Por esta razón, y a fin de contar con un método cuantitativo que tuviera un desempeño analítico adecuado en el sustrato en estudio, fue necesario probar algunos de los diversos métodos que han sido propuestos para el análisis de CPA en diferentes sustratos.

Se evaluó además la posibilidad de emplear un único método analítico para detectar y cuantificar simultáneamente aflatoxinas y CPA, con el fin de determinar la co-ocurrencia de ambas micotoxinas en maní.

La mayoría de los métodos empleados para la detección y cuantificación de CPA consisten en procedimientos de partición basados en la naturaleza ácida de esta toxina.

El método BF, propuesto originalmente para el análisis de aflatoxinas en maní, se modificó con el agregado de ácido fosfórico 85%, para aumentar la solubilidad del CPA en la fase metanol-agua y permitir su co-extracción de la matriz junto con las aflatoxinas. El agregado de ácido fosfórico para la extracción de micotoxinas ácidas ha sido empleado previamente por Wilson *et al.* (1976) para la detección simultánea de aflatoxinas, citrinina, ácido penicílico, y otras micotoxinas en maíz, porotos y maní. El método resultó eficaz para la determinación de aflatoxinas, pero el CPA se recuperó en

muy bajas cantidades, por lo que se descartó la posibilidad de emplearlo para el presente trabajo.

El método de Lansden (1986), propuesto originalmente para la determinación de CPA en maní y maíz, consiste en un desgrasado de la muestra con éter de petróleo y la extracción de CPA y aflatoxinas con una mezcla de metanol-cloroformo y ácido fosfórico. La partición del CPA con bicarbonato de sodio y cloroformo permite separar las aflatoxinas del CPA, y luego recuperar éste en otra fase clorofórmica mediante la acidificación con ácido clorhídrico concentrado. Este método requiere tiempos excesivamente prolongados para la determinación (el secado del éter de petróleo se debe realizar durante toda la noche), y presenta dificultades experimentales, como la formación de una emulsión cuando a la fase metanol-cloroformo-ác. fosfórico se le adiciona bicarbonato de sodio, emulsión que persiste aún luego de la centrifugación a 1000 rpm durante 15 minutos. Lansden (1986) señala que a mayor concentración de lípidos en el extracto se vuelve más difícil particionar el CPA extraído en la fase acuosa básica, en parte por la formación de una emulsión. Con más del 50% del aceite inicial en el extracto, se forma una emulsión estable a la centrifugación durante períodos prolongados a la máxima velocidad de centrifugación que permite el equipo. Esto resulta en un descenso importante en el porcentaje de recuperación del CPA. Luego de sucesivas repeticiones del método sólo se logró una recuperación del 50% para CPA, por lo que también este método fue descartado.

El método de Gorst-Allman & Steyn (1979), originalmente propuesto para la detección de trece micotoxinas, consiste en una extracción con una mezcla de metanol-cloroformo, desgrasado con hexano, partición con bicarbonato en una mezcla de cloroformo-agua (fase que se utiliza para la detección de aflatoxinas) y obtención del CPA en la fase acuosa, con posterior acidificación con ácido clorhídrico 0,5 N y

extracción con cloroformo. Este método también presentó muchas dificultades experimentales, resultó prolongado por las sucesivas etapas de secado que requiere entre las particiones con solventes, y no produjo resultados satisfactorios por la baja recuperación del CPA, que no fue mayor del 45%.

El método de Prasongsidh *et al.* (1988) originalmente propuesto para análisis de CPA en leche, consiste en una extracción con una mezcla metanol-bicarbonato de sodio, desgrasado con hexano, acidificación de la fase acuosa y extracción con cloroformo. Este método, si bien dio mejores resultados que los anteriores, no resultó completamente satisfactorio, debido a la formación de emulsiones, tanto en la mezcla metanol-bicarbonato de sodio-hexano, como en la mezcla metanol-cloroformo. Esto resulta en complicaciones experimentales, mayores tiempos para la determinación y disminución en la recuperación del CPA. A fin de mejorar su rendimiento se practicaron las siguientes modificaciones: a) se incorporó una etapa de centrifugación de la mezcla metanol-bicarbonato-hexano, para reducir la formación de emulsiones y aumentar la eficiencia del desgrasado; b) se reemplazó el lavado con 100 ml de hexano por 2 lavados con 50 ml de hexano, para aumentar la efectividad del desgrasado; c) se incorporó el agregado de una solución de KCl 10% a la fase acuosa como efecto “salting-out” para reducir la formación de emulsiones con cloroformo; d) se modificó el pH final de la fase acuosa de 3 a 2 para asegurar que la mayor parte del CPA presente se encuentre en la fase clorofórmica y aumentar la recuperación; y e) se reemplazó el lavado final con 100 ml de cloroformo por 2 lavados con 25 ml de cloroformo cada uno. Este método, esquematizado en la Figura II.6, es el que en el presente trabajo se denominó “Método de Prasongsidh *et al.* modificado”, y fue el que se seleccionó para la determinación de ácido ciclopiazónico en maní.

### III.2.1.2. Evaluación de métodos de purificación del extracto

A los fines de lograr una mayor purificación del extracto obtenido por los distintos métodos de extracción ensayados, se procedió a evaluar el desempeño de diversas columnas cromatográficas comerciales para la limpieza del mismo.

Inicialmente se pretendía combinar alguno de los métodos de extracción evaluados en la etapa anterior, cuyos resultados no habían sido los deseados, por obtenerse extractos sucios, con impurezas que dificultaban la detección y la cuantificación del CPA en la etapa de TLC, con una limpieza por columna, a fin de mejorar dicha detección.

En todos los casos ensayados se obtuvieron resultados poco satisfactorios, ya que el CPA era eluído en la misma fase que las impurezas que se deseaban separar. La falla de los métodos de limpieza utilizados puede deberse a que la principal interferencia en la determinación de CPA en maní se debe a los lípidos polares que se extraen de la matriz, y por su naturaleza, permanecen en la misma fase que el CPA durante las sucesivas etapas de extracción. Este efecto es más evidente cuanto mayor es la concentración de aceite en la matriz. Lansden (1986) señala las dificultades que causan los lípidos en la extracción de CPA cuando se encuentran en altas concentraciones y señala que aún a porcentajes menores de aceite se observa un descenso en la recuperación del CPA, posiblemente debido a la formación de microemulsiones y algún efecto de apareamiento iónico entre los nitrógenos del CPA y ácidos grasos libres ionizados.

Al no obtenerse mejoras con el uso de columnas para una etapa de limpieza, se procedió, en cambio, a ensayar las modificaciones necesarias al método de extracción a fin de obtener un extracto final lo suficientemente limpio como realizar una adecuada detección y cuantificación por TLC. Finalmente, luego de las modificaciones señaladas

previamente, el método de Prasongsidh modificado, fue el que dio los mejores resultados para la detección y cuantificación de CPA.

### III.2.1.3. Cromatografía en capa delgada

El CPA, como todos los ácidos tetrámicos, se encuentra en la forma de un complejo quelato metálico en aquellos extractos crudos que no han sido tratados con ácido fuerte (Gallagher *et al.*, 1978). Una consecuencia de su capacidad quelante se evidencia en su comportamiento en TLC. El ácido migra lentamente con bajos valores de Rf y con una extensa cola en TLC de sílica gel con varios sistemas de solventes. Este comportamiento es claramente el resultado de la formación de un complejo metálico con la toxina. Al impregnar las placas de sílica gel con ácido oxálico, el CPA migra con mucho mayor Rf y como una mancha compacta, sin formación de cola. Esto se debe a que el ácido oxálico compite efectivamente con el CPA por los sitios catiónicos en la matriz de sílica gel.

Como solventes de desarrollo se evaluaron distintos sistemas de solventes presentes en la bibliografía. En el sistema de benceno-ácido acético-metanol (90+5+7) (Trucksess *et al.*, 1987), el CPA presenta un Rf bajo con una mancha poco definida, por la interferencia de impurezas que no se separan eficientemente. El sistema empleado por Gallagher *et al.* (1978) logra un Rf más elevado para el CPA y una buena separación de las impurezas, pero al ser revelada con reactivo de Erlich, la placa cromatográfica toma un color rosado, de difícil diferenciación con la mancha púrpura del CPA, por su bajo contraste. Los sistemas en base a tolueno, acetato de etilo y ácido fórmico (Dorner *et al.*, 1983; Gqaleni *et al.*, 1996b) y el sistema de cloroformo-acetona (Gorst-Allman & Steyn, 1979) tampoco produjeron una buena separación ni la obtención de una mancha de bordes claramente definidos. Los mejores resultados se obtuvieron con los sistemas

de acetato de etilo-2-propanol-amoníaco. Se probaron las distintas combinaciones propuestas por otros autores (Lansden, 1986; Gorst-Allman & Steyn, 1979) y modificaciones de éstas, hasta lograr la máxima separación del CPA de las impurezas e interferencias y una mancha bien definida que permitiera una cuantificación eficiente. De todas las combinaciones ensayadas, la más conveniente resultó ser: acetato de etilo-2-propanol-amoníaco (40+30+20), por lo cual fue la seleccionada para el presente trabajo.

Con respecto a los reveladores que se evaluaron en el presente trabajo, el mejor resultado se obtuvo con el Reactivo de Erlich, por lo que se lo utilizó para la detección y cuantificación de CPA por TLC.

### **III.2.2. Desempeño analítico del método de Prasongsidh *et al.* modificado**

#### **II.2.2.1. Recuperación**

Con el fin de determinar la posibilidad de emplear un único método para la detección y cuantificación de aflatoxinas y CPA en muestras de maní, se evaluó la recuperación del método de Prasongsidh *et al.* modificado para CPA y AFB<sub>1</sub> a distintos niveles de fortificación. En la tabla III.6 se pueden observar las características de desempeño analítico del método en muestras de maní fortificadas con CPA a los niveles de 100 µg/kg, 200 µg/kg y 500 µg/kg, y analizadas por quintuplicado, mientras que la tabla III.7 muestra las mismas características en muestras de maní fortificadas con AFB<sub>1</sub> a los mismos niveles.

En las figuras III.2 y III.3 se presentan los gráficos de regresión lineal entre las cantidades de toxina halladas y las cantidades de toxina agregadas, para CPA y AFB<sub>1</sub> respectivamente, de cuya pendiente se obtuvo la recuperación total del método para sendas toxinas en el intervalo analizado.

**Tabla III.6. Desempeño analítico del método de Prasongsidh *et al.* modificado para determinación de CPA en maní**

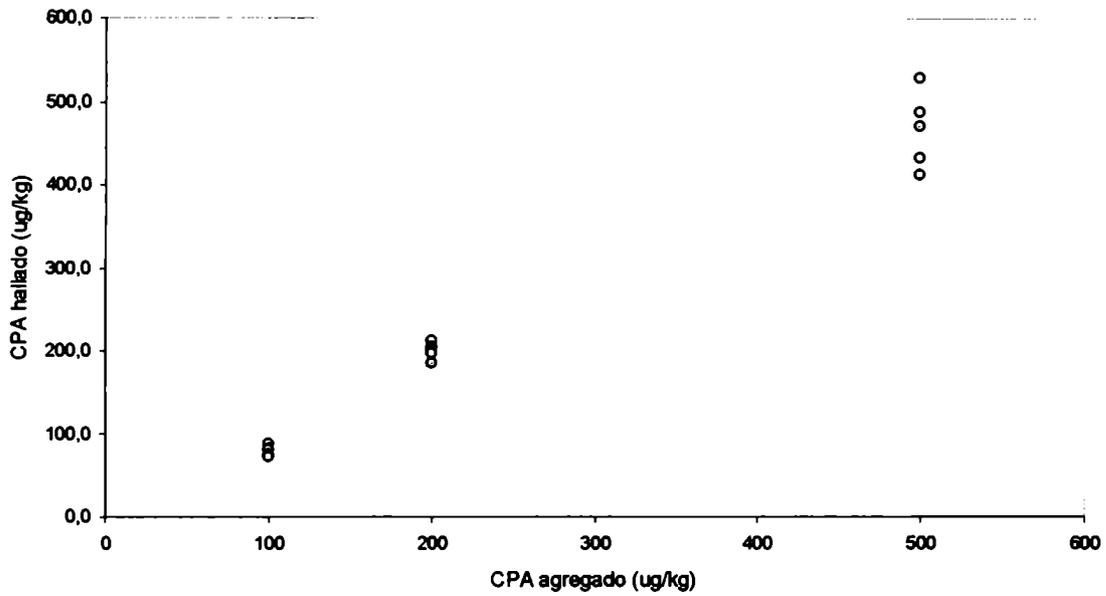
Nivel de fortificación (µg/kg)	Valores hallados (µg/kg)	Valor hallado promedio (µg/kg)	Desviación estándar	RSD <sub>r</sub> *	Recuperación
500	411,5	465,8	45,74	9,8%	93%
	487,0				
	469,6				
	432,8				
	528,0				
200	211,6	198,6	10,08	5,1%	99%
	184,0				
	202,8				
	198,8				
	196,0				
100	88,0	77,3	7,01	9,1%	77%
	80,8				
	73,6				
	72,0				
	72,0				

\* Relative standard deviations

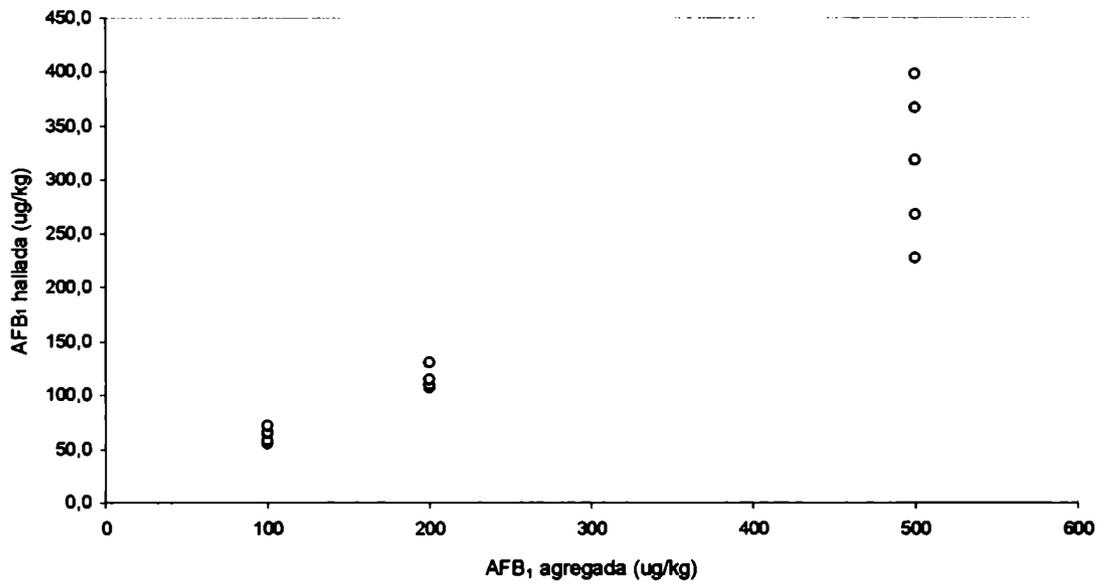
**Tabla III.7. Desempeño analítico del método de Prasongsidh *et al.* modificado para determinación de AFB<sub>1</sub> en maní**

Nivel de fortificación (µg/kg)	Valores hallados (µg/kg)	Valor hallado promedio (µg/kg)	Desviación estándar	RSD <sub>r</sub> *	Recuperación
500	227,5	315,7	69,67	22,1%	63%
	318,5				
	268,0				
	366,5				
	398,0				
200	107,2	133,4	41,50	31,1%	66%
	109,4				
	114,0				
	205,8				
	130,4				
100	63,7	62,4	6,62	10,6%	62%
	54,7				
	57,0				
	65,2				
	71,2				

\* Relative standard deviations



**Figura III.2. Regresión lineal de la relación entre CPA hallado y CPA agregado en maní.**



**Figura III.3. Regresión lineal de la relación entre AFB<sub>1</sub> hallada y AFB<sub>1</sub> agregada en maní.**

En la tabla III.8 se presentan los resultados del análisis de regresión lineal para CPA y AFB<sub>1</sub> respectivamente. El límite de detección del método fue calculado como tres desvíos estándar de la ordenada al origen obtenida por el método de cuadrados mínimos.

**Tabla III.8. Resultados del análisis de la regresión lineal**

	CPA		AFB <sub>1</sub>
R	0,9866	R	0,9300
R <sup>2</sup>	0,9733	R <sup>2</sup>	0,8648
Ordenada	-7 ± 13	Ordenada	3 ± 22
Pendiente	0,95 ± 0,04	Pendiente	0,63 ± 0,07
Recuperación promedio	95%	Recuperación promedio	63%
Límite de detección	45 µg/kg	Límite de detección	105 µg/kg

De acuerdo a los criterios aceptados por la AOAC para métodos de análisis, el porcentaje de recuperación promedio del método debe estar en el rango de 80-110% cuando la concentración de analito varía entre 100 µg/kg y 10.000 µg/kg. La precisión del método, que se evalúa a través de la desviación estándar relativa (RSD<sub>r</sub>), está establecida en un máximo del 15% para 100 µg/kg y del 11% para 1.000 µg/kg.

El método para el análisis de CPA en maní se encuentra dentro de los valores aceptados por la AOAC, ya que el porcentaje de recuperación promedio es del 95%, y el RSD<sub>r</sub> varía entre 5,1% y 9,8% para los diferentes niveles de contaminación. Para el nivel de 200 µg/kg se trabajó también con muestras fortificadas sobre las que se practicaron diez análisis independientes. Los resultados de los mismos se muestran en la tabla III.9. La desviación relativa estándar (RSD<sub>r</sub>) también resultó dentro de los valores aceptables (6,8%).

**Tabla III.9. Resultados del estudio de repetibilidad del método para determinación de CPA en maní**

Muestra	CPA ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Resultados	
1	246,6		
2	200,6	Nivel de contaminación	200 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
3	207,5		
4	207,5	Cantidad de repeticiones	10
5	194,1		
6	200,6	Promedio	209,42 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
7	204,0		
8	211,1	Desviación estándar	14,21
9	211,1		
10	211,1	RSD <sub>r</sub>	6,8%

En cuanto a la aplicación de este mismo método para el análisis de aflatoxinas en maní, en cambio, no se obtuvieron resultados aceptables. Los porcentajes de recuperación a los distintos niveles de contaminación ensayados son más bajos de los valores deseados, y el porcentaje de recuperación promedio del método es del 63%, es decir que se encuentra fuera del rango de aceptación establecido por la AOAC para esa concentración de analito.

Tampoco la precisión del método resultó dentro de los valores aceptables, ya que el RSD<sub>r</sub> es de 10,6% para 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (aún dentro de lo aceptable), pero a 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$  se eleva hasta 31,1% y a 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$  aún se mantiene por encima del 20%.

En base a estos resultados se decidió no utilizar este método para la detección simultánea de aflatoxinas y CPA, sino emplearlo solamente para la detección y cuantificación de CPA en maní, para lo cual el método demostró tener un muy buen desempeño analítico. En cambio, para el análisis de aflatoxinas se decidió aplicar el Método Oficial de la AOAC 970.45, BF (Best Foods) para análisis de aflatoxinas en maní y productos derivados de maní. El límite de detección de este método es de 2

$\mu\text{g}/\text{kg}$ , con una recuperación superior al 80% según estudios colaborativos (Stack, 1974).

### III.3. ESTUDIO DE LA CO-OCURRENCIA NATURAL DE AFLATOXINAS Y ACIDO CICLOPIAZONICO EN MANI

El ácido ciclopiazónico ha sido hallado como contaminante natural en maíz (Gallagher *et al.*, 1978), maní (Lansden & Davidson, 1983), queso (LeBars, 1979) y mijo (Rao & Husain, 1985).

En cultivos de Argentina se aíslan frecuentemente cepas de *A. flavus* capaces de producir altos niveles de CPA. Resnik *et al.* (1996 a) hallaron que 33 de 34 cepas de *A. flavus* aisladas de maíz produjeron CPA en dicho sustrato a niveles en el rango de 833 a 10.000 µg/kg, mientras que sólo 5 cepas produjeron AFB<sub>1</sub> en un rango de 29-115 µg/kg. Vaamonde *et al.* (1996) reportaron que el 93% de 45 cepas de *A. flavus* (30 cepas aisladas de maní y 15 de trigo) producían CPA y el 60% de las aisladas de maní producían CPA y aflatoxinas simultáneamente.

La ocurrencia natural de aflatoxinas en maíz y maní cultivado en Argentina ha sido detectada (Resnik *et al.*, 1996 b, Varsavsky *et al.*, 1985), pero no se encuentran reportes de la ocurrencia de CPA. Teniendo en cuenta la alta frecuencia de aislamientos de cepas de *A. flavus* capaces de producir aflatoxinas y/o CPA, se propuso como uno de los objetivos del presente trabajo investigar la co-ocurrencia de estas toxinas en muestras de maní.

La tabla III.10 muestra los resultados obtenidos del análisis de 50 muestras de maní con el fin de determinar la co-ocurrencia natural de CPA y aflatoxinas. La frecuencia de contaminación con ambas micotoxinas fue relativamente baja, aunque los niveles de contaminación son similares a los reportados por otros autores.

**Tabla III.10. Incidencia de la contaminación con CPA y aflatoxinas en muestras de maní**

	Muestras positivas	Porcentaje de contaminación	Niveles de contaminación ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
CPA	2	4 %	493-4300
AF totales	4	8 %	8-1250

En uno de los primeros informes sobre la ocurrencia de CPA como contaminante natural de maní, Lansden y Davidson (1983) encontraron esta toxina en 21 de 27 muestras de maní sin cáscara en un rango de 6,525 a 32  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , y en 4 de 21 muestras de maníes sanos maduros en un rango de 32 a 130  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . A diferencia del presente trabajo, sus resultados indicaron que la contaminación con CPA puede ocurrir sin la producción simultánea de aflatoxinas. Urano *et al.* (1992) encontraron CPA en el 51% de 45 muestras de maíz contaminadas con un rango de 25 a 2800  $\mu\text{g}/\text{kg}$  y hallaron aflatoxinas en el 87% de las muestras (contaminadas en un nivel de 1 a 2300  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Martins & Martins (1999) hallaron menores porcentajes de estas micotoxinas en alimentos balanceados; 5 de 80 muestras estaban contaminadas con 160  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de CPA y 36 con AFB<sub>1</sub> en un rango de 1 a 16  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .

La tabla III.11 muestra los niveles de contaminación de las 4 muestras naturalmente contaminadas, 2 de ellas con CPA y aflatoxinas (tipo B y G) y 2 con aflatoxinas solamente. Este es el primer informe de ocurrencia natural de CPA y de co-ocurrencia de CPA y aflatoxinas en maní cultivado en Argentina. Algunas de las muestras, como la N° 1, mostraron una concentración de CPA relativamente alta, conjuntamente con AFB<sub>1</sub> y AFG<sub>1</sub>.

**Tabla III.11. Concentración de las toxinas individuales en las muestras contaminadas**

Muestra N°	CPA (µg/kg)	Aflatoxinas (µg/kg)			
		B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub>
1	4300	625	-	625	-
2	493	435	-	83	-
3	-	-	-	-	170
4	-	2	-	-	6

Estos resultados sugieren la necesidad de un estudio más amplio de la ocurrencia natural de este metabolito en maní cultivado en Argentina. En nuestro país, la harina de maní es utilizada como materia prima para la elaboración de alimento balanceado para aves. Podría plantearse la hipótesis de que el CPA esté involucrado en algunas patologías de etiologías desconocidas observadas en pollos. Algunos de los síntomas registrados por veterinarios son similares a los descritos cuando se estudiaron los efectos de esta toxina en animales de laboratorio, por ejemplo, erosión en estómago muscular, y “opisthotonus”, la postura característica adoptada por las aves cuando mueren, la cual, según Cole (1986), es un muy buen diagnóstico de una dosis aguda de CPA en pollos (dosis oral simple de 12 mg/kg peso corporal). Como ha sido demostrado que el CPA se acumula en el músculo de los pollos luego de dosis orales (Norred *et al.*, 1988), existe un peligro potencial de contaminación de la carne de ave y productos derivados. Se considera relevante la realización de investigaciones adicionales para determinar la concentración de CPA en alimentos para aves y alimentos para humanos, incluyendo carne, leche y huevos, en orden de evaluar el riesgo de exposición de humanos y animales a esta toxina.

### III.4. ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LA ACTIVIDAD ACUOSA, LA TEMPERATURA Y EL TIEMPO DE INCUBACION SOBRE LA CO-PRODUCCION DE AFLATOXINA B<sub>1</sub> Y ACIDO CICLOPIAZONICO EN MANI

#### III.4.1. Desinfección del sustrato

Para evaluar la influencia de la  $a_w$  y la temperatura sobre la producción de aflatoxinas y CPA en maní, fue necesario establecer el tratamiento previo del material a utilizar. En este sentido resultó crítico reducir la micota contaminante sin alterar, en lo posible, las características naturales del grano.

A tal fin se estudió la efectividad de dos técnicas diferentes de desinfección de los granos de maní con respecto a la reducción de la flora fúngica presente y a la preservación de la viabilidad de la semilla. Se evaluaron tratamientos de desinfección con dosis de radiación gamma (Cuero *et al.*, 1986) y un tratamiento de desinfección con hipoclorito de sodio (Fernández Pinto, 1986). Si bien los granos sometidos a estos tratamientos pueden diferir en ciertos aspectos de los granos naturalmente infectados, se encuentran en condiciones mucho más cercanas a su estado natural que los granos autoclavados (Cuero *et al.*, 1987). Se ha observado que en granos no autoclavados la producción de toxina suele ser menor, lo cual podría deberse a la presencia de enzimas propias de los mismos, que intervendrían en la formación de toxina o en su degradación (Shotwell *et al.*, 1978).

#### III.4.2. Evaluación de los métodos de desinfección

Como prueba de la eficacia de la desinfección de las semillas se observó el porcentaje de granos contaminados, y como control de la viabilidad de las semillas se

determinó el porcentaje de germinación de las mismas luego de recibir el tratamiento. Los resultados se muestran en la tabla III.12.

**Tabla III.12. Resultados de los tratamientos con hipoclorito de sodio y radiación gamma para la desinfección del sustrato**

Tratamiento	Semillas germinadas (%)	Semillas contaminadas (%)
control	97	100
NaClO	86	56
4 kGy	94	37
6 kGy	93	1
8 kGy	48	1

El tratamiento con hipoclorito de sodio demostró una baja efectividad como método de desinfección del sustrato, ya que el porcentaje de semillas contaminadas resultó demasiado elevado. Los tratamientos con radiación gamma con dosis de 8 kGy y 6 kGy redujeron considerablemente la flora microbiana, pero el de 8 kGy también redujo significativamente la viabilidad de las semillas. Los tratamientos con dosis de 6 kGy y 4 kGy no afectaron significativamente la germinación de las semillas respecto del control, pero en el de 4 kGy la reducción de la micota no alcanzó los niveles esperados.

De acuerdo a estos resultados se decidió emplear el tratamiento a 6 kGy para desinfectar el sustrato, ya que arrojó el menor recuento fúngico, manteniendo una elevada viabilidad de los granos.

#### **III.4.3. Selección de los microorganismos**

Las cepas de *Aspergillus flavus* utilizadas en este trabajo se seleccionaron entre el total de las cepas aisladas de maní de la zona manisera de la provincia de Córdoba, en función de la abundante producción de AFB<sub>1</sub> y CPA en dicho sustrato. Se evaluó la

producción de AFB<sub>1</sub> y CPA en maní por 7 de las cepas aisladas en la primera etapa del presente trabajo. Los análisis se efectuaron a los 7 y a los 14 días de incubación a 25°C. Los resultados se muestran en la tabla III.13.

**Tabla III.13. Producción de AFB<sub>1</sub> y CPA a los 7 y 14 días de incubación a 25°C en maní por 7 cepas seleccionadas**

Cepa	Producción a los 7 días		Producción a los 14 días	
	AFB <sub>1</sub> (µg/kg)	CPA (µg/kg)	AFB <sub>1</sub> (µg/kg)	CPA (µg/kg)
15	76,8	ND	190	1.700
16	115,2	ND	1.920	2.000
10-A	19.200	1.000	4.800	8.900
10-N°3	9.600	400	7.200	16.000
38-N°1	960	8.000	2.880	1.000
32-N°1	3.560	4.096	1.213	4.650
29-N°1	3.560	2.275	1.424	2.350

En función de estos resultados, se seleccionaron las cepas 10-A, 10-N°3, 38-N°1 y 32-N°1 para el estudio de la influencia de la actividad acuosa y la temperatura sobre la co-producción de AFB<sub>1</sub> y CPA en maní. Las mismas son fuertemente productoras de AFB<sub>1</sub> y CPA y presentan patrones de producción diferentes entre sí, constituyendo así una muestra representativa de la variabilidad natural de las cepas toxicogénicas de *Aspergillus flavus*.

#### **III.4.4. Influencia de la actividad acuosa y la temperatura sobre la co-producción de aflatoxina B<sub>1</sub> y ácido ciclopiazónico en maní**

En la actualidad es bien conocido el hecho de que algunas cepas de *Aspergillus flavus* tienen la capacidad de producir simultáneamente CPA y aflatoxinas (Luk et al., 1977; Gallagher et al., 1978). Las cepas de *A. flavus* productoras de CPA se aíslan frecuentemente a partir de maní según datos de numerosos autores (Blaney et al., 1989; Vaamonde et al., 1996; Mphande et al., 2004), y el presente trabajo demuestra que dicha frecuencia es similar entre las cepas aisladas en cultivos de nuestro país. Esto indicaría que esta toxina puede ser un metabolito más común aún que las aflatoxinas y, por lo tanto, estar presente en alimentos contaminados con las mismas. La co-ocurrencia de ambas toxinas ha sido detectada en maní (Urano et al., 1992), y en el presente trabajo se ha detectado por primera vez dicha co-ocurrencia en maní cultivado en Argentina. Por ello se ha establecido la hipótesis de que la presencia de ambas toxinas en alimentos para humanos o animales puede resultar en un efecto aditivo o sinérgico.

En vista de la creciente preocupación por la posibilidad de co-ocurrencia de aflatoxinas y CPA, y el consecuente peligro para la salud humana y animal, es importante controlar la producción de estas toxinas en productos agrícolas. Para ello, tal como ha sido señalado en I.3 es necesario entender cómo afectan su producción los distintos factores ambientales y las interacciones entre ellos.

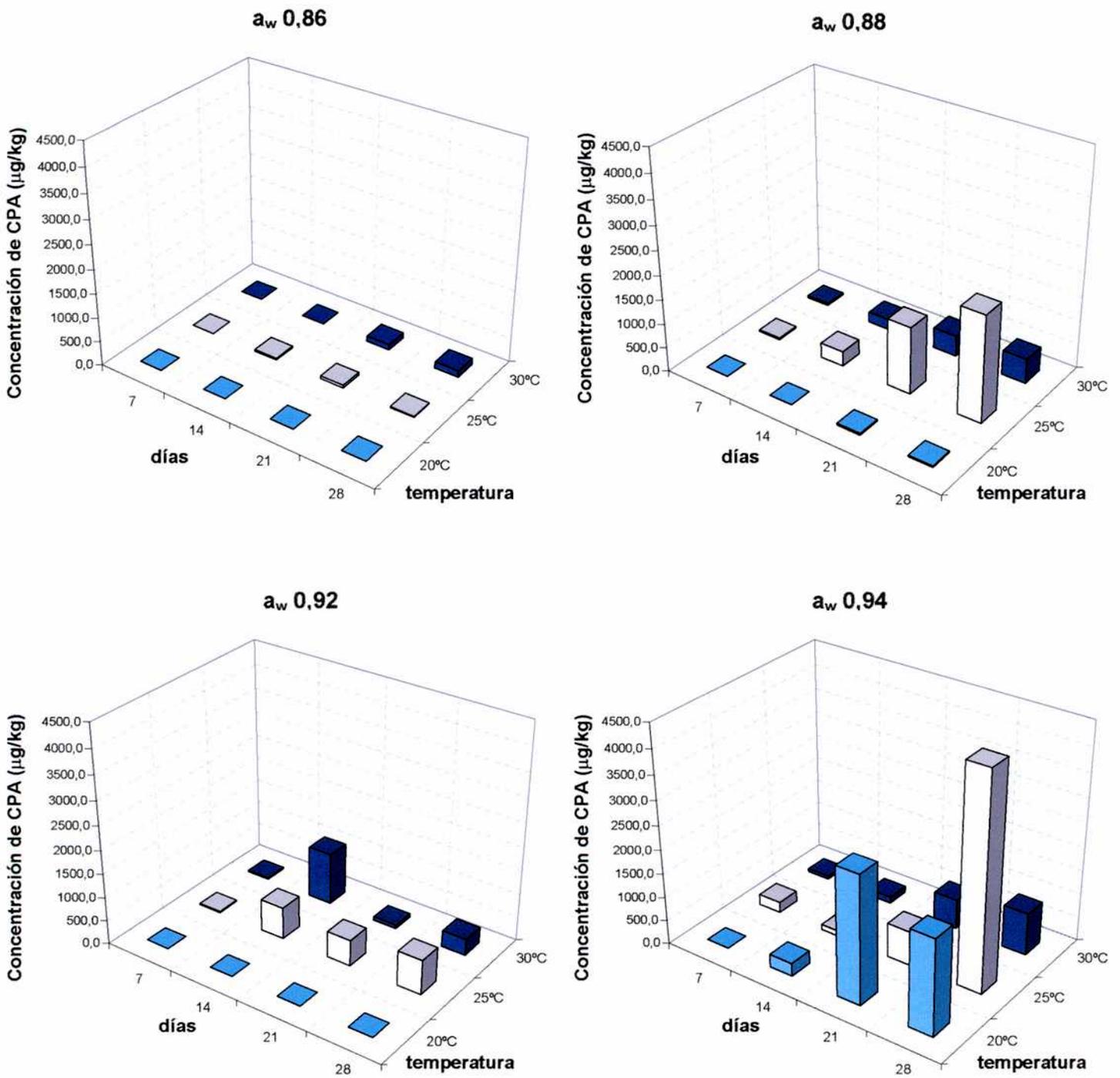
Los efectos de la temperatura y la  $a_w$  sobre la producción de aflatoxinas por *A. flavus* han sido ampliamente estudiados (ICMSF, 1996), pero hay muy poca información sobre los efectos de estos factores sobre la producción de CPA. Además, la mayoría de los trabajos publicados sobre la formación de micotoxinas abarcan el estudio de una sola toxina. Pocos trabajos han examinado cómo pueden afectar los factores

ambientales la producción de estas dos toxinas en medios de cultivo agarizados (Gqaleni *et al.*, 1997) y en sustratos naturales (Gqaleni *et al.*, 1996b).

En el presente trabajo se utilizó un experimento de diseño factorial para estudiar los efectos de la  $a_w$ , la temperatura, el período de incubación y la interacción entre estos factores sobre la co-producción de AFB<sub>1</sub> y CPA en maní utilizando un inóculo cóctel de cepas de *A. flavus*.

La influencia de la actividad acuosa sobre la producción de AFB<sub>1</sub> y CPA en maní se estudió para los niveles de  $a_w$  0,86; 0,88; 0,92 y 0,94. Los niveles de temperatura fueron 20, 25 y 30°C, y los tiempos de incubación estudiados fueron 7, 14, 21 y 28 días.

Los efectos de  $a_w$ , temperatura, tiempo de incubación y sus interacciones sobre la producción de CPA se muestran en la figura III.4 y sobre la producción de AFB<sub>1</sub> en la figura III.5. Los valores de concentración de CPA y de AFB<sub>1</sub> obtenidos a los diferentes tiempos de incubación para cada combinación de  $a_w$  y temperatura estudiados se presentan en las tablas III.14 y III.15 respectivamente.



**Figura III.4. Efecto de actividad de agua, temperatura y tiempo de incubación sobre la producción de CPA por *A. flavus* en maní.**

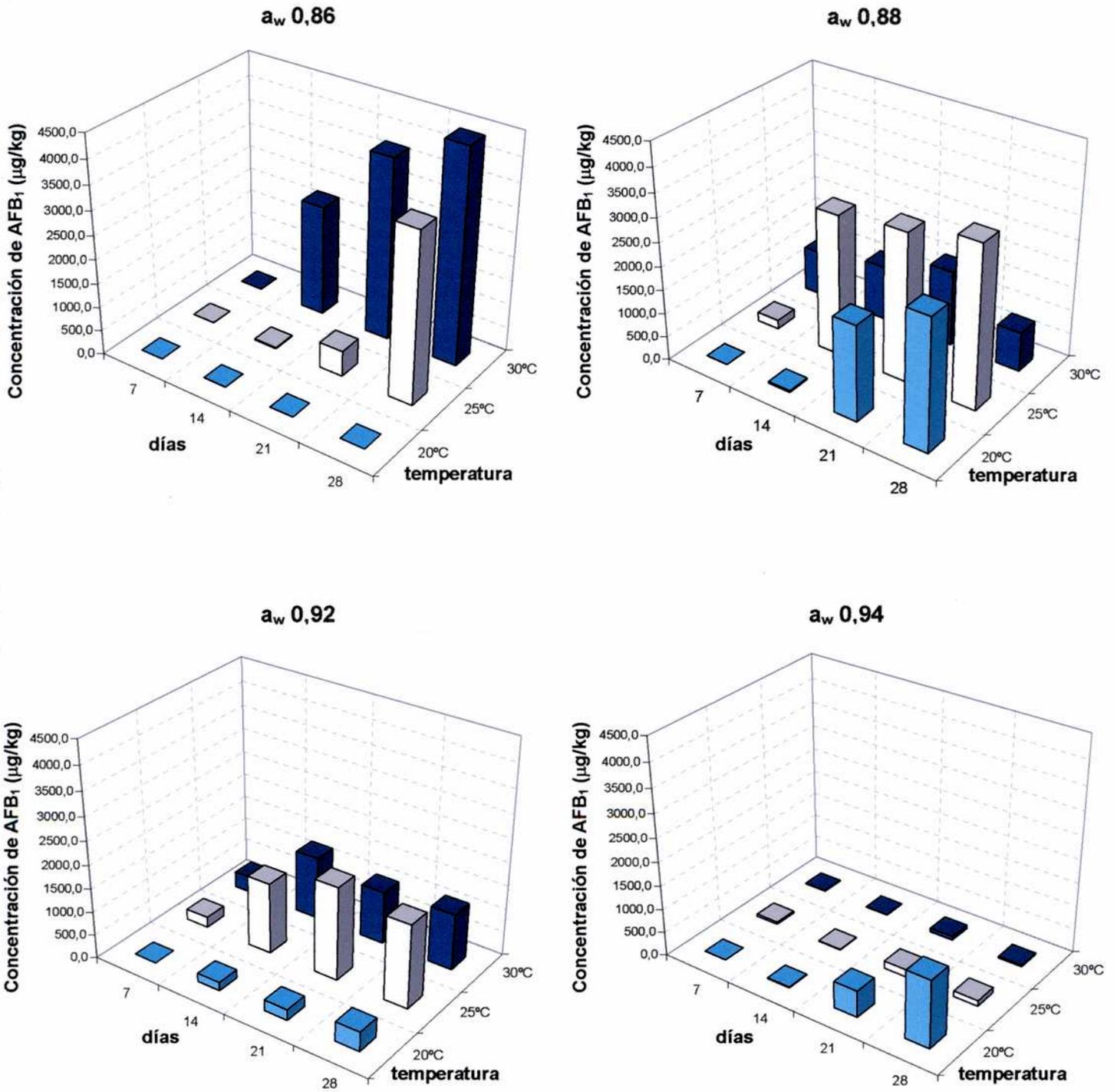


Figura III.5. Efecto de actividad de agua, temperatura y tiempo de incubación sobre la producción de AFB<sub>1</sub> por *A. flavus* en maní.

**Tabla III.14. Concentración de CPA ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) producida por *A. flavus* en maní, a diferentes tiempos de incubación en distintas condiciones de  $a_w$  y temperatura**

$a_w$	20°C				25°C				30°C			
	7 d	14 d	21d	28 d	7 d	14 d	21d	28 d	7 d	14 d	21d	28 d
0,86	ND	34 <sup>*</sup>	40 <sup>*</sup>	ND	ND	34 <sup>*</sup>	56	19 <sup>*</sup>	ND	ND	111	135
0,88	ND	ND	34 <sup>*</sup>	31 <sup>*</sup>	32 <sup>*</sup>	307	1393	2206	43 <sup>*</sup>	220	429	508
0,92	ND	ND	ND	ND	25 <sup>*</sup>	667	550	730	33 <sup>*</sup>	1090	70	342
0,94	ND	272	2684	2007	224	110	722	4469	63	132	617	891

Los datos de concentración de CPA ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) a cada set de condiciones corresponden a la media de tres replicados.

ND: no se detectó

(<sup>\*</sup>) : si bien los niveles detectados se encuentran por debajo del LD del método, la cuantificación fue posible. Se informa en carácter de aproximación.

**Tabla III.15. Concentración de AFB<sub>1</sub> ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) producida por *A. flavus* en maní, a diferentes tiempos de incubación en distintas condiciones de  $a_w$  y temperatura**

$a_w$	20°C				25°C				30°C			
	7 d	14 d	21d	28 d	7 d	14 d	21d	28 d	7 d	14 d	21d	28 d
0,86	ND	2,4	1,8 <sup>*</sup>	0,4 <sup>*</sup>	1,0 <sup>*</sup>	23,7	534,0	3530,3	4,2	2314,0	3782,5	4450,0
0,88	1,2 <sup>*</sup>	32,6	2002,5	2744,2	185,4	2966,7	3115,0	3411,7	949,3	1157,0	1591,7	830,7
0,92	ND	178,0	227,0	415,3	222,5	1505,6	1972,8	1765,2	341,2	1335,0	1112,5	1186,7
0,94	1,8 <sup>*</sup>	16,3	563,7	1424,0	47,5	14,8	156,5	118,7	13,8	6,5	80,1	31,2

Los datos de concentración de AFB<sub>1</sub> ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) a cada set de condiciones corresponden a la media de tres replicados.

ND: no se detectó

(<sup>\*</sup>) : si bien los niveles detectados se encuentran por debajo del LD del método, la cuantificación fue posible. Se informa en carácter de aproximación.

## III.4.4.1. Tratamiento estadístico de los datos

A fin de establecer si la influencia de los distintos factores estudiados ( $a_w$ , temperatura y tiempo de incubación), así como las interacciones dobles y triples entre ellos, sobre la producción de AFB<sub>1</sub> y CPA es significativa, los datos se sometieron a un análisis de la varianza de 3 factores, con un diseño factorial balanceado.

Los resultados del ANOVA para la producción de CPA se muestran en la tabla III.16 y para la producción de AFB<sub>1</sub> en la tabla III.17.

**Tabla III.16. ANOVA para la producción de CPA por *A. flavus***

Fuente de variación	grados de libertad	MS	F	p valor
$a_w$	3	5660639,5	64,31	<0,001
Temperatura	2	2963261,75	33,67	<0,001
Tiempo	3	5527371,5	62,80	<0,001
$a_w$ - Temperatura	6	1215746,63	13,81	<0,001
$a_w$ - Tiempo	9	2456023,25	27,90	<0,001
Temperatura - Tiempo	6	1721343,63	19,56	<0,001
$a_w$ - Temperatura - Tiempo	18	822844,5	9,35	<0,001
Error	96	88019,89		
Total	143			

**Tabla III.17. ANOVA para la producción de AFB<sub>1</sub> por *A. flavus***

Fuente de variación	grados de libertad	MS	F	p valor
$a_w$	3	12407516	96,23	<0,001
Temperatura	2	8664218	67,20	<0,001
Tiempo	3	15201813	117,90	<0,001
$a_w$ - Temperatura	6	7961982	61,75	<0,001
$a_w$ - Tiempo	9	1984143	15,39	<0,001
Temperatura - Tiempo	6	983523	7,63	<0,001
$a_w$ - Temperatura - Tiempo	18	2316525	17,97	<0,001
Error	96	128934,32		
Total	143			

#### III.4.4.2. Efectos e interacciones de la actividad acuosa, la temperatura y el tiempo de incubación sobre la producción de CPA en maní por *A. flavus*

El ANOVA para la producción de CPA (tabla III.16) muestra que todos los factores estudiados influyen significativamente ( $p < 0,001$ ) sobre la producción de CPA en maní por *A. flavus*. Asimismo, las interacciones entre dos de los factores y las interacciones entre los tres factores también afectan la producción de CPA de forma altamente significativa ( $p < 0,001$ ).

En todas las condiciones estudiadas se observó germinación y crecimiento de *A. flavus*, aunque a 20°C el desarrollo fue más lento, especialmente a  $a_w$  0,86.

La cantidad de CPA producida fue determinada por la compleja interacción de  $a_w$ , temperatura y tiempo de incubación, como lo muestra la figura III.4. El mayor nivel de CPA (4469  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) se produjo a  $a_w$  0,94 y 25°C luego de 28 días de incubación. También se detectó una producción considerable (2684  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) a la menor temperatura estudiada (20°C) después de 21 días en esta condición de relativamente alta  $a_w$ . Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Gqaleni *et al.* (1996b), quienes afirman que, a  $a_w$  constante, una temperatura de 20°C parece favorecer aún más que 30°C la producción de CPA en granos de maíz, tanto por *A. flavus* como por *Penicillium commune*. El mismo efecto fue observado por Sosa *et al.* (2002), quienes detectaron la máxima producción de CPA por *Penicillium commune* a 20°C en un medio a base de extracto de carne a  $a_w$  0,90. De acuerdo a Gqaleni *et al.* (1996b) la producción de CPA por *Penicillium commune* presenta un patrón similar al de la producción de CPA por *A. flavus*, en el cual una combinación de  $a_w$  alta y temperatura baja favorece la formación de mayores cantidades de CPA, mientras que una  $a_w$  baja en conjunción con una temperatura elevada resultan en una menor producción de CPA. Esto último también se verificó en los resultados obtenidos en el presente trabajo, ya que a la menor  $a_w$

evaluada (0,86) se detectaron niveles de CPA muy bajos, aún a la mayor de las tres temperaturas (30°C).

Sin embargo, a diferencia de lo observado por Gqaleni *et al.* (1996b), la tendencia con respecto a la temperatura se invirtió en las  $a_w$  intermedias (0,92 y 0,88), en las cuales se produjo mayor cantidad de CPA a 30°C que a 20°C a partir de los 14 días de incubación. Estos resultados refuerzan la importancia de las interacciones entre los factores ambientales sobre la producción de esta toxina, y remarcan la necesidad de realizar experimentos de diseño factorial para poder evaluar adecuadamente la influencia de dichos factores en el nivel de toxina producido en un sustrato natural.

En todas las  $a_w$  y temperaturas evaluadas se observó una fase lag de 7 días antes de detectar cantidades de CPA significativamente diferentes (5%) del nivel basal, excepto únicamente a  $a_w$  0,94 y 25°C, que es la combinación de  $a_w$  y temperatura a la que se produjo la máxima acumulación de dicha toxina.

En general, al disminuir la  $a_w$ , la concentración de CPA producida se redujo. A  $a_w$  0,86, durante todo el período de incubación a 20 y 25°C, la producción de CPA no presentó diferencias significativas (al 5%) con los casos que se encontraban por debajo del nivel de detección del método. La mínima producción significativamente diferente del nivel basal, se registró a  $a_w$  0,86 y 30°C, luego de 21 días (111  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) y 28 días (135  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) de incubación. Estos resultados coinciden con lo observado por Gqaleni *et al.* (1997), en la producción de CPA por *A. flavus* en un medio modelo en base a extracto de malta, quienes afirman que la concentración de CPA producida disminuye cuando desciende la  $a_w$  del medio. De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo, una  $a_w$  de 0,86 parece ser limitante para la producción de CPA tanto a 20°C como a 25°C, y resulta en niveles muy bajos de producción a 30°C.

Como puede observarse de los resultados obtenidos, la producción de CPA es el producto de la interacción entre  $a_w$ , temperatura y tiempo, siendo este último un factor tan significativo como la actividad acuosa. De ello se deduce que los análisis de micotoxinas en distintos sustratos a un tiempo fijo pueden conducir a una incorrecta interpretación de los resultados. Por ejemplo, a  $a_w$  0,94, si se realizara una única determinación de CPA a 21 días, el resultado indicaría que en esas condiciones la temperatura óptima para la producción de CPA es de 20°C (2684  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), a la cual se produce una concentración de CPA que supera en más de tres veces el nivel producido a 25°C (722  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Sin embargo, si la misma determinación se realizara a los 28 días, los resultados indicarían que la temperatura óptima es de 25°C, donde se produce una concentración de CPA de 4469  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , más del doble de lo que se observa a 20°C (2007  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). A pesar de esto, en la mayoría de los trabajos publicados sobre el tema, no se suele incluir el tiempo como un factor de variación, sino que se suele fijar un único tiempo de incubación para realizar el análisis, hecho que podría estar conduciendo a elaborar conclusiones erróneas sobre las condiciones óptimas para la producción de las micotoxinas estudiadas.

#### III.4.4.3. Efectos e interacciones de la actividad acuosa, la temperatura y el tiempo de incubación sobre la producción de AFB<sub>1</sub> en maní por *A. flavus*

El ANOVA para la producción de AFB<sub>1</sub> (tabla III.17) muestra que todos los factores estudiados influyen significativamente ( $p < 0,001$ ) sobre la producción de AFB<sub>1</sub> en maní por *A. flavus*. Lo mismo ocurre con las interacciones entre dos de los factores y las interacciones triples ( $p < 0,001$ ).

Como se observa en la figura III.5, la producción de AFB<sub>1</sub> está fuertemente determinada por la red de interacciones entre  $a_w$ , temperatura y tiempo de incubación. De la tabla de ANOVA (tabla III.17) puede apreciarse que, al igual que para la formación de CPA, el tiempo es un factor tan significativo como la  $a_w$  y la temperatura.

La respuesta fúngica a las condiciones ambientales estudiadas, fue diferente para la producción de AFB<sub>1</sub> en comparación con CPA. La máxima acumulación de AFB<sub>1</sub> se produjo a  $a_w$  0,86 y 30°C luego de 28 días de incubación (4450  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), y también se observó un nivel elevado de producción a la misma  $a_w$  y tiempo de incubación, pero a 25°C (3530,3  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Ambas temperaturas han sido señaladas por otros autores como altamente favorables para la producción de aflatoxinas (ICMSF, 1996). Se observó un fuerte efecto combinado de  $a_w$  y temperatura, ya que a  $a_w$  0,86 y baja temperatura (20°C) la producción de AFB<sub>1</sub> fue prácticamente inhibida, pues los niveles detectados no se diferencian significativamente de los que se encuentran por debajo del límite de detección del método.

En general, la acumulación de AFB<sub>1</sub> durante todo el período de incubación disminuyó con el aumento de la  $a_w$ , excepto a 20°C. La menor acumulación de AFB<sub>1</sub> se produjo a  $a_w$  0,94 a 25 y 30°C. En estas condiciones el hongo creció vigorosamente, si bien se detectaron muy bajas cantidades de AFB<sub>1</sub> durante todo el período estudiado, mientras que a 20°C el crecimiento fue más lento y menos copioso, pero se produjo una

considerable cantidad de AFB<sub>1</sub> (1424 µg/kg) a los 28 días de incubación. Como las micotoxinas son metabolitos secundarios fúngicos, las condiciones de su producción no necesariamente correlacionan con las de crecimiento de la especie productora y factores tales como inducción, inhibición por producto final, represión catabólica y regulación por fosfato son determinantes de la producción (Tuomi *et al.*, 2000).

Sin embargo, los resultados obtenidos en el presente trabajo para aflatoxina B<sub>1</sub> son inesperados y contradicen datos de otros autores, que informan que la producción de aflatoxinas aumenta cuando se incrementa la  $a_w$  (Diener & Davis, 1967; Diener & Davis, 1970; Montani *et al.*, 1988; Gqaleni *et al.*, 1996b).

Con el fin de analizar en profundidad en qué radica esta diferencia, se procedió a comparar los niveles de AFB<sub>1</sub> producida en el presente trabajo, en las condiciones estudiadas, con los valores informados por otros autores en condiciones similares. Los datos se presentan en la tabla III.18.

Como puede apreciarse, las condiciones existentes en bibliografía no son exactamente las mismas que las establecidas en el presente trabajo, lo cual dificulta la comparación. Sin embargo, en líneas generales, si tomamos las  $a_w$  más bajas, se observa que los niveles de AFB<sub>1</sub> producidos son muy similares a los hallados en el presente trabajo. Por ejemplo, a  $a_w$  0,86 y 30°C, luego de 21 días de incubación, Diener & Davis (1967) obtienen una producción de AFB<sub>1</sub> de 3800 µg/kg y 3000 µg/kg en granos de maní inmaduros y granos de maní visiblemente dañados, respectivamente, mientras que en granos maduros el nivel es significativamente menor (405 µg/kg). En el presente trabajo, en las mismas condiciones de  $a_w$ , temperatura y tiempo se produjeron 3782,5 µg/kg, un valor muy similar al de los mencionados autores, a pesar de que ellos emplean un tratamiento térmico para la desinfección de los granos. La concentración de AFB<sub>1</sub> obtenida por Montani *et al.* (1988) a  $a_w$  0,87 a la misma temperatura y 19 días de

incubación es aún mayor (4950  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Esto puede deberse a la diferencia de 0,01 de  $a_w$  y a que la cepa empleada por estos autores es *A. parasiticus* en vez de *A. flavus*.

A  $a_w$  0,88, el único dato disponible es el de Diener & Davis (1967) a 30°C y 21 días de incubación que varía de 317  $\mu\text{g}/\text{kg}$  a 1500  $\mu\text{g}/\text{kg}$  según la categoría del maní. Este valor tampoco difiere del hallado en el presente trabajo en esas condiciones (1591,7  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ).

A niveles de  $a_w$  superiores a 0,88, se empieza a notar una diferencia importante entre los valores reportados de producción de AFB<sub>1</sub> en bibliografía y los hallados en la presente investigación. Si bien no se han encontrado datos para  $a_w$  0,92, se ve que a  $a_w$  0,90 y 30°C, la variabilidad en los valores hallados por diferentes autores aumenta considerablemente. Aún para datos correspondientes al mismo sustrato, los rangos de dispersión son muy grandes. Por ejemplo en maní, Diener & Davis (1967) han obtenido concentraciones tan dispares como 3800, 11400 y 25600  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Lo mismo ocurre en maíz, donde Gqaleni *et al.* (1996b) reportan una producción de 901  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , mientras que Montani *et al.* (1988) informan 39100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , ambos luego de un período de incubación de 14 días.

Si tomamos los datos de Diener & Davis (1967) a  $a_w$  0,95 se ve que la producción de AFB<sub>1</sub> aumenta considerablemente. En el trabajo de Gqaleni *et al.* (1997), se obtienen valores más bajos a este nivel de  $a_w$ , pero las concentraciones reportadas por estos autores son mucho menores que el resto en todas las condiciones estudiadas, lo cual puede deberse a la utilización de un medio sintético agarizado en lugar de un sustrato natural.

**Tabla III.18. Datos de bibliografía respecto de la concentración de AFB<sub>1</sub> producida a diversas condiciones ambientales.**

Autor	Cepa	Sustrato	a <sub>w</sub>	Temp (°C)	Tiempo (días)	AFB <sub>1</sub> (µg/kg)
Diener & Davis, 1967	<i>A. flavus</i>	Granos de maní maduros (esterilizados por tratamiento térmico)	0,86	30	21	405
			0,88			1100
			0,90			11400
			0,95			9500
		Granos de maní inmaduros (esterilizados por tratamiento térmico)	0,86	30	21	3800
			0,88			1500
			0,90			3800
			0,95			15200
		Granos de maní con daño visible (esterilizados por tratamiento térmico)	0,86	30	21	3000
			0,88			317
			0,90			25600
			0,95			50000
Gqaleni <i>et al.</i> , 1996b	<i>A. flavus</i>	Granos de maíz autoclavado	0,90	20		411
			0,95	25	14	1606
			0,90	30		901
Gqaleni <i>et al.</i> , 1997	<i>A. flavus</i>	Agar extracto de levadura sacarosa	0,90	20	15	ND
			0,90	30	15	96
			0,95	30	15	226
Montani <i>et al.</i> , 1988	<i>A. parasiticus</i>	Granos de maíz sin tratamiento de desinfección	0,87	30	8	5830
					14	8740
					19	4950
					8	4120
					0,90	30
		19	62500			

En función de este análisis, se llega a la conclusión de que la principal diferencia en lo hallado en el presente trabajo respecto de trabajos anteriores, es la reducción en la formación de AFB<sub>1</sub> cuando la  $a_w$  supera un nivel de 0,88; la cual, en lugar de aumentar, comienza a decaer y se muestra casi completamente inhibida a una  $a_w$  de 0,94.

Para tratar de entender este comportamiento, se analizaron los factores que pueden estar contribuyendo a la distinta respuesta en la producción de esta micotoxina.

En primer lugar, un factor crucial en la variabilidad de la producción de aflatoxinas es el sustrato sobre el cual se estudia la producción. Varios autores (Northolt *et al.*, 1977; Gqaleni *et al.*, 1997) demostraron que la  $a_w$  óptima para la producción de aflatoxinas está determinada no sólo por la temperatura y la cepa fúngica, sino también por el sustrato, y según Northolt *et al.*, (1976) la composición del sustrato juega un rol tan importante como la  $a_w$  en la producción de aflatoxinas.

En cuanto al sustrato, otra diferencia fundamental entre los trabajos hallados en bibliografía y el presente trabajo es el tratamiento utilizado para eliminar la flora acompañante. En muchos casos en que se utilizan sustratos naturales, como granos de maní o de maíz, con el fin de eliminar la flora competitiva los granos se someten a tratamientos de esterilización por calor, que inactivan la semilla y alteran su composición química y las barreras físicas naturales. Sheretz *et al.* (1976) y Shotwell *et al.* (1978) indicaban que al no autoclavar los porotos de soja la producción de aflatoxinas es considerablemente menor, lo cual podría deberse a la presencia de enzimas propias de los porotos, que intervendrían en la formación de toxina o en su degradación. También se ha hecho referencia en trabajos anteriores (Diener & Davis, 1977; Vaamonde, 1978) a que la resistencia a la producción de aflatoxinas en semillas viables (no tratadas por calor) podría estar asociada a la actividad fisiológica de las mismas que previene la invasión de hongos. Por ello, en lugar de esterilizar los granos

por un tratamiento térmico, en este trabajo se sometió el material a una irradiación gamma. Lacey & Magan (1991) sostienen que la irradiación gamma permite la esterilización del grano sin destruir su habilidad de germinar y con un mínimo cambio en sus propiedades químicas.

Por otro lado, la cepa empleada en la investigación juega un rol esencial. Los datos sobre la producción de aflatoxinas por *A. flavus* en distintos sustratos y a diferentes condiciones ambientales son marcadamente fragmentarios. La mayoría de los estudios de la producción de aflatoxinas se refieren a *A. parasiticus* (ICMSF, 1996). Además, en muchos trabajos se estudió la producción de aflatoxinas por cepas de *A. flavus* productoras de aflatoxinas solamente, o, en otros casos, se desconoce si la cepa empleada es productora de CPA simultáneamente con las aflatoxinas, como ocurre en el trabajo de Diener & Davis (1967). Northolt *et al.*, (1977) demostraron que las cepas de *A. flavus* pueden diferir en su temperatura y  $a_w$  óptima para la producción de aflatoxinas.

Por último, una diferencia clave entre este trabajo y los trabajos hallados en bibliografía, es que todos los estudios realizados por otros autores evalúan el efecto de factores ambientales en la producción de aflatoxinas por una única cepa. Si bien se han hecho comparaciones entre distintas cepas de *A. flavus*, nunca se ha utilizado un inóculo cóctel para estudiar el efecto de la presencia simultánea de varios microorganismos compitiendo por el sustrato. El inóculo cóctel es una modalidad de trabajo que se ha vuelto más común en los últimos años y que pretende emular más efectivamente el riesgo de contaminación de un sustrato con un microorganismo, al considerar la variación potencial entre cepas de la misma especie.

La implementación de este tipo de inóculo para estudiar los efectos de factores ambientales en la producción de una o varias micotoxinas simultáneamente es

novedosa. No se han encontrado hasta el momento en la bibliografía trabajos que lo hayan aplicado. En la presente investigación se decidió incluir este factor para evitar los efectos diferenciales entre cepas de *A. flavus*, ya que al utilizar una única cepa para estudiar la producción de micotoxinas, la respuesta se ve modificada por las características particulares del microorganismo en cuestión, lo que dificulta la posibilidad de generalizar los resultados obtenidos. Los datos obtenidos en este tipo de trabajos suelen ser útiles para diseñar modelos predictivos, que permitan, conociendo las condiciones ambientales a las que se encuentra sometido el alimento, establecer el posible riesgo de contaminación. Para ello, es necesario estandarizar las condiciones de trabajo y eliminar cualquier posible variación debida a variables no contempladas en el modelo. La utilización de una única cepa fúngica para predecir la producción de micotoxinas es criticable por las razones anteriormente mencionadas.

Un fenómeno más ampliamente estudiado es el efecto de otros géneros o especies fúngicas contaminantes en la producción de micotoxinas. Lee & Magan (2000) demostraron que las interacciones entre *A. ochraceus* y otras especies competitivas resultaron en una reducción significativa en la producción de ocratoxina en maíz, y que dichas interacciones varían con la actividad acuosa y la temperatura. Marin *et al.* (1998) demostraron que, en presencia de ciertas especies, tales como *A. niger*, las especies *F. moniliforme* y *F. proliferatum* eran estimuladas para incrementar significativamente la producción de fumonisinas en maíz irradiado. Ramakrishana *et al.* (1996a, b) hallaron que, en cebada, la competencia por *A. flavus*, *P. verrucosum*, o *Hyphopichia burtonii* inhibió la producción de toxina T-2 por *F. sporotrichoides*.

Así como se han demostrado las interacciones entre diferentes especies, es probable que este fenómeno se manifieste también entre organismos de la misma especie, productores de las mismas micotoxinas. Los resultados obtenidos con respecto

a la producción de AFB<sub>1</sub> en el presente trabajo podrían también deberse a la competencia y las interacciones de las cepas empleadas, por la colonización del sustrato y por la producción de metabolitos secundarios tóxicos.

#### III.4.4.4. Efectos e interacciones de la actividad acuosa, la temperatura y el tiempo de incubación sobre la co-producción de CPA y AFB<sub>1</sub> en maní por *A. flavus*

Es evidente que la acumulación de dos o más toxinas producidas simultáneamente por un hongo es afectada por numerosos factores, así como por sus interacciones, como el resultado de una compleja relación entre el microorganismo, el sustrato, y el ambiente. La influencia de estos factores en la producción de cada toxina puede ser diferente, y se ha observado una variación de las cantidades relativas de las toxinas producidas por otras especies fúngicas co-productoras de varias toxinas cuando se modifican la  $a_w$  y la temperatura (Magan *et al.*, 1984; Wagener *et al.*, 1980). Se ha observado que la biosíntesis de distintas micotoxinas producidas por *Alternaria* spp. se ve favorecida por diferentes temperaturas. Magan *et al.* (1984) hallaron que las condiciones óptimas de producción de tres toxinas de *Alternaria alternata*, altenueno (AE), alternariol (AOH) y alternariol monometil éter (AME), en maíz autoclavado, eran 0,98  $a_w$  y 25°C. Sin embargo en condiciones distintas de las óptimas, las cantidades relativas de las toxinas se modificaban. A 25°C y una  $a_w$  entre 0,98 y 0,95, se producía más AME que las otras dos toxinas, pero a 15°C se encontraba menos AME que AE o AOH.

En el caso particular de las aflatoxinas y el CPA producidos por *A. flavus*, las condiciones para la máxima producción de cada micotoxina son diferentes, de acuerdo a los resultados del presente trabajo, y a los obtenidos por Gqaleni *et al.* (1996a y 1996b).

En la tabla III.19 se muestran las concentraciones relativas de ambas micotoxinas en algunas de las combinaciones de  $a_w$ , temperatura y tiempo estudiadas en el presente trabajo. La tendencia observada es que en las condiciones donde una de las toxinas alcanza la mayor concentración, la otra se acumula en cantidades mínimas. Mientras que las concentraciones de ambas toxinas en las condiciones extremas del

rango estudiado son bastante diferentes, en los puntos intermedios las cantidades relativas son más similares, como se observa a  $a_w$  0,88, 25°C y 28 días. Este conjunto de condiciones es particularmente peligroso porque se acumulan cantidades considerables de ambas toxinas.

**Tabla III.19. Niveles medios de CPA y AFB<sub>1</sub> producidos por *A. flavus* en maní bajo condiciones controladas de  $a_w$ , temperatura y tiempo de incubación.**

$a_w$	Temperatura (°C)	Tiempo de incubación (días)	CPA (µg/kg)	AFB <sub>1</sub> (µg/kg)
0.94	25	28	4469.2	118.7
0.94	25	14	109.8	14.8
0.92	25	21	550.2	1972.8
0.88	25	28	2205.7	3411.7
0.86	30	28	134.5	4450.0
0.86	20	28	ND	0.4

#### III.4.4.5. Superficies de respuesta para la producción de AFB<sub>1</sub> y CPA por *A. flavus* en maní

Con el objeto de visualizar claramente una tendencia en la producción de ambas toxinas, se graficaron superficies de respuesta para la acumulación de CPA (Figura III.6) y de AFB<sub>1</sub> (Figura III.7) al final del período estudiado (28 días) para todas las condiciones. Este tipo de gráficos permite interpretar el comportamiento de acumulación de las toxinas en función de la actividad acuosa y la temperatura, y predecir la tendencia de dicha producción dentro del rango de estudio. De las figuras III.6 y III.7 se desprende claramente que la producción de ambas toxinas tiene una diferente respuesta a las condiciones estudiadas, como se mencionó previamente. También resulta evidente que las condiciones de máxima acumulación de ambas micotoxinas es opuesta, es decir, en las condiciones óptimas para la producción de CPA, la acumulación de AFB<sub>1</sub> es poco significativa y viceversa. Esto podría estar relacionado con la capacidad del hongo para incrementar la producción de una u otra toxina como respuesta a la modificación de las condiciones ambientales o a los mecanismos de defensa del sustrato, constituido por granos viables. Como el CPA es un derivado del triptofano (Holzapfel, 1971), el camino biosintético para esta micotoxina es diferente del de las aflatoxinas, policétidos derivados de las furanocumarinas (Smith & Moss, 1985). La capacidad de responder de manera diferente a factores ambientales en relación a la biosíntesis de metabolitos secundarios tóxicos puede ayudar a la supervivencia del hongo en un nicho ecológico particular, permitiéndole colonizar el sustrato más eficientemente que otros competidores.

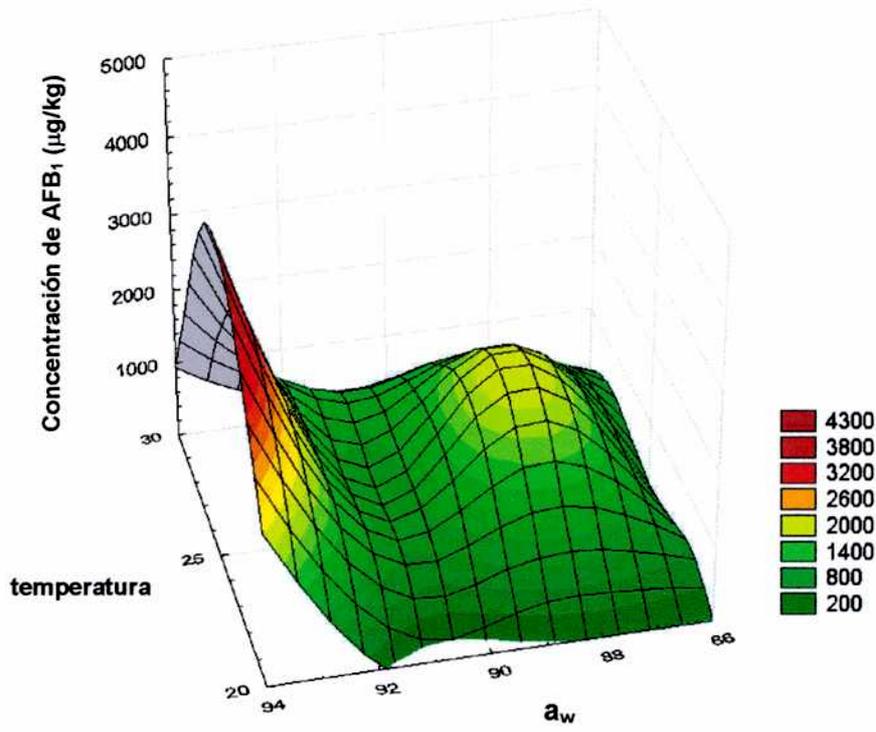


Figura III.6. Superficie de respuesta para el efecto de la  $a_w$  y la temperatura sobre la producción de CPA por *A. flavus* en maní.

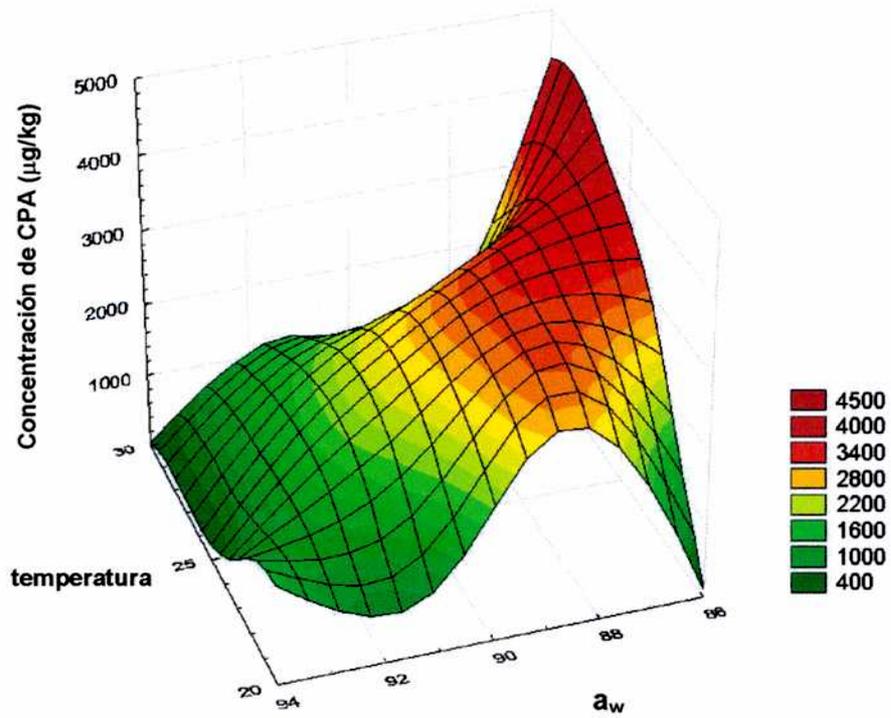


Figura III.7. Superficie de respuesta para el efecto de la  $a_w$  y la temperatura sobre la producción de AFB<sub>1</sub> por *A. flavus* en maní.

# **IV** **CONCLUSIONES**

---

CAPITULO

#### IV.I. ESTUDIO DE LA DISTRIBUCION DE *ASPERGILLUS* SECCION *FLAVI*

- Las cepas de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* se encuentran ampliamente distribuidas en maní cultivado en la zona manisera de la provincia de Córdoba y presentan gran diversidad en relación a su perfil de producción de metabolitos secundarios tóxicos.
- La proporción de cepas toxicogénicas aisladas de muestras de maní de la provincia de Córdoba fue muy elevada. El mayor porcentaje de cepas de *A. flavus* aisladas correspondió al quimiotipo I, es decir las co-productoras de aflatoxinas y CPA. Esto indica el riesgo potencial de contaminación con ambas micotoxinas del maní cosechado en la zona núcleo manisera argentina.
- Se demostró por primera vez la presencia en Argentina de cepas de *A. flavus* con un patrón atípico de producción de micotoxinas (AFB+, AFG+, CPA+). Este hallazgo tiene interés taxonómico, dado que estas cepas, que actualmente están siendo estudiadas a nivel molecular, podrían constituir una nueva especie toxicogénica de *Aspergillus*.

#### IV.2. DESARROLLO DE UN METODO ANALITICO PARA LA DETERMINACION DE ACIDO CICLOPIAZONICO EN MANI

- El método desarrollado para el análisis de CPA en maní mostró buen desempeño analítico, tanto en lo que respecta a recuperación, límite de detección y precisión, como a sus características prácticas, por ser de fácil ejecución y requerir equipamiento simple y poco tiempo de análisis. Si bien no resultó tan satisfactorio para el análisis de aflatoxinas, se concluyó que podría ser empleado como método de “screening” si se tuviera que evaluar la co-ocurrencia de aflatoxinas y CPA en un alto número de muestras.

#### IV.3. ESTUDIO DE LA CO-OCURRENCIA NATURAL DE AFLATOXINAS Y ACIDO CICLOPIAZONICO EN MANI

- Se detectó por primera vez en nuestro país la co-ocurrencia natural de aflatoxinas y CPA en maní.
- La frecuencia de contaminación en muestras de maní recolectadas de la zona manisera de la provincia de Córdoba, es relativamente baja, sin embargo la presencia de ambas micotoxinas en algunas muestras sugieren la necesidad de un estudio más amplio de la ocurrencia natural de estos metabolitos en el maní que se cultiva en nuestro país.
- Dado que la harina de maní se utiliza para la elaboración de alimentos balanceados para aves, los resultados del presente trabajo indicarían la

relevancia de la investigación de CPA en dicho alimento. Asimismo, dado que ha sido demostrada su acumulación en músculo de pollos, debería investigarse su presencia en alimentos de origen animal destinados a consumo humano, en orden de evaluar el riesgo de exposición a esta toxina.

#### IV.4. ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LA ACTIVIDAD ACUOSA, LA TEMPERATURA Y EL TIEMPO DE INCUBACION SOBRE LA CO-PRODUCCION DE AFLATOXINA B<sub>1</sub> Y ACIDO CICLOPIAZONICO EN MANI

- El empleo de un diseño factorial completo balanceado permitió demostrar que los tres factores estudiados ( $a_w$ , temperatura y tiempo) tienen una gran influencia sobre la producción de AFB<sub>1</sub> y CPA por *A. flavus* en maní, y que las interacciones entre ellos son igualmente importantes para la formación de ambas micotoxinas.
- De acuerdo a los resultados obtenidos se puede considerar que la  $a_w$  0,86 es limitante para la producción de CPA en maní.
- La producción de CPA se incrementa con el aumento de la  $a_w$  y una temperatura de 25°C parece ser la óptima para su biosíntesis por *A. flavus* en maní, aunque también se acumulan cantidades apreciables a 20°C y alta  $a_w$ .
- Los parámetros ambientales estudiados influyen de diferente manera sobre la acumulación de AFB<sub>1</sub> y CPA. Esta respuesta sugiere una adaptación del microorganismo, capaz de elaborar uno u otro metabolito secundario, por caminos biosintéticos diferentes, según cuáles sean las condiciones ambientales.

## APENDICE

### Medios de cultivo, colorantes y reactivos

#### Agar Diclorán Glicerol 18% (según Pitt, J.I. & Hocking, A.D., 1997)

Glucosa	10 g
Peptona	5 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,0 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,5 g
Glicerol	220 g
Agar-agar	15 g
Dichloran	2,0 mg
Cloramfenicol	0,1 g
Agua destilada	1 litro

Se agregan los ingredientes minoritarios y el agar hasta 800ml *ca* de agua destilada. Se calienta en baño de agua a ebullición hasta disolver el agar y se lleva a 1 litro con agua destilada. Se agregan 220 g de glicerol (grado analítico) y se esteriliza en autoclave. pH final 5,5-5,8;  $a_w$  0,955.

#### Agar Extracto de Malta (MEA) (según Pitt, J.I. & Hocking, A.D., 1985a)

Extracto de malta en polvo	20 g
Peptona	1,0 g
Glucosa	20 g
Agar-agar	20 g
Agua destilada	1 litro
pH final	5,6

**Agar Malta Sal (MSA) (según King *et al.*, 1986)**

Extracto de malta	30 g
NaCl	75 g
Agar-agar	15 g
Agua destilada	1 litro
pH final	7

**Reactivo de Erlich (según Pitt, J.I. & Hocking, A.D., 1997)**

4-dimetilaminobenzaldehído	2 g
Etanol 96%	85 ml
HCl 10 N	15 ml

## BIBLIOGRAFIA

Abarca, M.L., Accensi, F., Bragulat, M., & Cabañes, F. (2001). Current importance of ochratoxin A-producing *Aspergillus* spp. *J. Food Protection*. 64: 903-906.

Abarca, M.L. (2000). Taxonomía e identificación de especies implicadas en la aspergilosis nosocomial. *Rev. Iberoam. Micol.* 17: S79-S84.

Adams, M.R. & Moss, M.O. (1995). *Food Microbiology*. The Royal Society of Chemistry. Thomas Graham House, The Science Park, Cambridge, UK. 398 pp.

Alexopoulos, C.J., Mims, C.W. & Blackwell, M. (1996). *Introductory Mycology*. 4th Ed. John Wiley & Sons, Inc. New York. USA. 868 pp.

AOAC (Association of Official Analytical Chemists). *AOAC Peer-verified methods program. Manual on policies and procedures*. (1995). AOAC International, Maryland, USA. 36 pp.

AOAC (Association of Official Analytical Chemists). *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. (1995). 16th Ed., Arlington, USA. 970.45.

Ayerst, G. (1969). The effects of moisture and temperature on growth and spore germination in some fungi. *J. Stored Prod. Res.* 5: 127-141.

Bacon, C.W., Sweeney, J.G., Robbins, J.D., & Burdick, D. (1973). Production of penicillic acid and ochratoxin A on poultry feed by *Aspergillus ochraceus*. *Appl. Microbiol.* 26: 155-160.

Bayman, P. & Cotty, P.J. (1993). Genetic diversity in *Aspergillus flavus*: association with aflatoxin production and morphology. *Can. J. Bot.* 71: 23-31.

Beuchat, L.R. (1983). Influence of water activity on growth, metabolic activities, and survival of yeasts and molds. *J. Food Protection.* 46: 135-141.

Blaney, B.J., Kelly, M.A., Tyler, A.L. & Connole, M.D. (1989). Aflatoxin and cyclopiazonic acid production by Queensland isolates of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Aust. J. Agric. Res.* 40: 395-400.

Blount, W.P. (1960). A new turkey disease problem in England characterised by heavy mortality. British Oil & Cake Mills, Ltd. Quarterly Poultry Bulletin. 27: 1-3.

Blount, W.P. (1961). Turkey "X" disease. *Turkeys.* 9:52.

Bradburn, N., Coker, R.D., & Blunden, G. (1994). The aetiology of turkey "X" disease. *Phytochemistry.* 35: 817.

Bresler, G., Brizzio, S.B., & Vaamonde, G. (1995). Mycotoxin-producing potential of fungi isolated from amaranth seeds in Argentina. *Int. J. Food Microbiol.* 25: 101-108.

Bryden, W.L. (1982). Aflatoxins and animal production: an Australian perspective. *Food Technol. Aust.* 34: 216-223.

Bryden, W.L. (1991). Occurrence and biological effects of cyclopiazonic acid. En *Emerging problem resulting from microbial contamination*. Mixe, K. & Richard, J.L. (eds.). National Institute of Hygienic Science. Tokio, Japon. pp: 127-147.

Büchi, G. & Rae, I.D. (1969). The structure and chemistry of aflatoxins. En *Aflatoxins*. Goldblatt, L.A. (ed) Academic Press, New York, USA. pp. 55-75.

Bunting, A.H., Gibbons, R.W., & Wynne, J.C. (1985) Groundnut (*Arachis Hypogaea* L.). En *Grain Legume Crops*. Summerfield, R.J., & Roberts, E.H. (eds.) Collins. London, England. pp. 747-800.

Campbell, T.C. (1983). Mycotoxins. En *Environmental aspects of cancer: the role of macro and micro components of foods*. Wynder, E.E. (ed). Food and Nutrition Press, Westport, Connecticut, USA. pp: 187-198.

CAST (Council for Agricultural Science and Technology) (2003). Mycotoxins: risk in plant, animal, and human systems. *Task Force Report N° 139*. Library of Congress Cataloging-in-Publication Data. Ames, Iowa, USA. 199 pp.

Christensen, C.M. (1991). Fungi and seed quality. En *Handbook of applied mycology, Vol. 3: Foods and Feeds*. Arora, D.K., Mukerji, K.G. & Marth, E.H. (eds.). Marcel Dekker, Inc, New York, USA. pp: 99-121.

Christensen, C.M. & Kauffman, H.H. (1969). *Grain storage: The role of fungi in quality loss*. University of Minnesota Press, Minneapolis, USA. 153 pp.

Chourasia, H.K. & Sinha, R.K. (1994). Potential of the biological control of aflatoxin contamination in developing peanut (*Arachis hypogaea* L.) by atoxigenic strains of *Aspergillus flavus*. *J. Food Sci. Technol.* 31: 362-366.

CIARA (2004). Cámara de la Industria Aceitera de la República Argentina.  
[www.ciara.com.ar](http://www.ciara.com.ar)

Coffelt, T.A. (1989) Peanut. En *Oil Crops of the World: Their Breeding and Utilization*. Robbelen, G., Downey, R.K., & Ashri, A. (eds.) McGraw-Hill Publishing Company. New York, USA. pp. 319-338.

Cole, R.J. (1986). Etiology of Turkey "X" Disease in retrospect: A case for the involvement of cyclopiazonic acid. *Mycotoxin Research*. 2: 3-7.

Cole, R.J. & Cox, R.H. (1981). *Handbook of toxic fungal metabolites*. Academic Press, New York, USA.

Cotty, P.J. (1994). Influence of field application of an atoxigenic strain of *Aspergillus flavus* on the populations of *A. flavus* infecting cotton bolls and on aflatoxin content of cottonseed. *Phytopathology*. 84: 1270-1277.

Cotty, P.J., Bayman, P., Engel, D.S., & Elias, K.S. (1994). Agriculture aflatoxins and *Aspergillus*. En *The Genus Aspergillus from taxonomy and genetics to industrial application*. Powell, K.A., Renwick, A., & Pederby, J.F. (eds.). Plenum Press, New York, USA. pp: 1-27.

Cotty, P.J. & Cardwell, K.F. (1999). Divergence of West African and North American communities of *Aspergillus* section *Flavi*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 2264-2266.

Cuero, R.G., Smith, J.E. & Lacey, J. (1986). The influence of gamma irradiation and sodium hypochloride sterilization on maize seed microflora and germination. *Food Microbiology*. 3: 107-113.

Cuero, R.G., Smith, J.E. & Lacey, J. (1987). Interaction of water activity, temperature and substrate on mycotoxin production by *Aspergillus flavus*, *Penicillium viridicatum* and *Fusarium graminearum* in irradiated grains. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 89: 221-226.

Cullen, J.M., Wilson, M.E., Hagler, W.M., Ort, J.F., & Cole, R.J. (1988). Histologic lesions in broiler chicks given cyclopiazonic acid orally. *Am. J. Vet. Res.* 49: 728-731.

Detroy, R.W., Lillehoj, E.B. & Ciegler, A. (1971). Aflatoxin and related compounds. En *Microbial toxins*. Vol 6. Ciegler, A., Kadis, S. & Ajl, S.J. (eds.) Academic Press, New York, USA. pp: 4-178.

Diener, U.L. & Davis, N.D. (1967). Limiting temperature and relative humidity for growth and production of aflatoxin and free fatty acids by *Aspergillus flavus* in sterile peanuts. *Journal of the American Oil Chemists' Society.* 44: 259-263.

Diener, U.L. & Davis, N.D. (1970). Limiting temperature and relative humidity for aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in stored peanuts. *Journal of the American Oil Chemists' Society.* 47: 347-351.

Diener, U.L. & Davis, N.D. (1977). Aflatoxins formation in peanuts by *Aspergillus flavus*. *Bulletin 493*, Agricultural Experiment Station, Auburn University, Auburn, Alabama, USA.

Dorner, J.W., Cole, R.J., Lomax, L.G., Gosser, H.S. & Diener, U.L. (1983). Cyclopiazonic acid production by *Aspergillus flavus* and its effects on broiler chickens. *Appl. and Environ. Microbiol.* 46: 698-703.

Dyer, S.K. & McCammon, S. (1994). Detection of toxigenic isolates of *Aspergillus flavus* and related species on coconut cream agar. *J. Appl. Bacteriol.* 76: 75-78.

Egel, D.S., Cotty, P.J., & Elias, K.S. (1994). Relationships among isolates of *Aspergillus* sect. *Flavi* that vary in aflatoxin production. *Phytopathology.* 84: 906-912.

Ellis, W.O., Smith, J.P., Simpson, B.K., & Oldham, J.H. (1991). Aflatoxins in food: occurrence, biosynthesis, effects on organisms, detection, and methods of control. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 30: 403-439.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). (1991). *Alimentación y Nutrición 14/10. Capacitación en el análisis de micotoxinas.* Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma, Italia. pp. 59-62.

Fernández Pinto, V. (1986). Estudio de factores que condicionan la producción de aflatoxinas en soja: influencia de la variedad, actividad acuosa, temperatura y tiempo de incubación. *Tesis Doctor en Ciencias Químicas.* Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

Fernández Pinto, V., Patriarca, A., Locani, O. & Vaamonde, G. (2001). Natural co-occurrence of aflatoxin and cyclopiazonic acid grown in Argentina. *Food Add. Contam.* 18: 1017-1020.

Filtenborg, O., Frisvad, J.C. & Svendsen, J.A. (1983). Simple screening method for molds producing intracellular mycotoxins in pure cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 45: 581-585.

Fischer, A. (1954). *Laboratorio*. El Ateneo. 6ª edición. Buenos Aires, Argentina. pp. 210-215.

Gallagher, R.T., Richard, J.L., Stahr, H.M. & Cole, R.J. (1978). Cyclopiazonic acid production by aflatoxigenic and non-aflatoxigenic strains of *Aspergillus flavus*. *Mycopathologia*. 66: 31-36.

Gams, W., Christensen, M., Onions, A.H.S., Pitt, J.I. & Samson, R.A. (1985). Intrageneric taxa of *Aspergillus*. En *Advances in Penicillium and Aspergillus systematics*. Samson, R.A. & Pitt, J.I. (eds.). Plenum Press, New York, USA. pp: 55-64.

Geiser, D.M., Pitt, J.I. & Taylor, J.W. (1998). Cryptic speciation and recombination in the aflatoxin producing fungus *Aspergillus flavus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 95: 388-393.

Geiser, D.M., Dorner, J.W., Horn, B.W. & Taylor, J.W. (2000). The phylogenetics of mycotoxin and sclerotium production in *Aspergillus flavus* and *Aspergillus oryzae*. *Fungal Genet. Biol.* 31: 1-11.

Gilbert, J. (1991). Regulatory aspects of mycotoxins in the European Community and USA. En *Fungi and mycotoxins in stored products: proceedings of an international conference, Bangkok, Thailand 23-26 April, 1991*. Champ, B.R., Highley, E. Hocking, A.D., & Pitt, J.I. (eds.). ACIAR Proceedings N° 36. Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra, Australia. pp: 194-197.

Gonzalez, H.H.L. (1984). Estudio de la influencia de la temperatura y la actividad de agua en el crecimiento de hongos aislados de variedades nacionales de maíz. *Tesis Magister Scientiae en Ciencia y Tecnología de los Alimentos*. Universidad Nacional de Mar del Plata.

Gorst-Allman, C.P. & Steyn, P.S. (1979). Screening methods for the detection of thirteen common mycotoxins. *J. of Chromatography*. 175: 325-331.

Gqaleni, N., Smith, J.E. & Lacey, J. (1996a). Co-production of aflatoxins and cyclopiazonic acid in isolates of *Aspergillus flavus*. *Food Add. Contam.*13: 677-685.

Gqaleni, N., Smith, J.E., Lacey, J. & Gettinby, G. (1996b). The production of cyclopiazonic acid by *Penicillium commune* and cyclopiazonic acid and aflatoxins by *Aspergillus flavus* as affected by water activity and temperature on maize grains. *Mycopathologia*. 136: 103-108.

Gqaleni, N., Smith, J.E., Lacey, J. & Gettinby, G. (1997). Effects of temperature, water activity and incubation time on production of aflatoxins and cyclopiazonic acid by an

isolate of *Aspergillus flavus* in surface agar culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 1048-1053.

Groopman, J.D., Cain, L.G. & Kensler, T.W. (1988). Aflatoxin exposure in human populations: measurements and relation to cancer. *Crit. Rev. Toxicol.* 19: 113-145.

Hatch, MC., Chen, C.-J., Levin, B., Ji, B.-T., Yang, G.-Y., Hsu, S.-W., Wang, L.-W., Hsieh, L.-L., & Santella, R.M. (1993) Urinary aflatoxin levels, hepatitis B virus infection and hepatocellular carcinoma in Taiwan. *Int. J. Cancer.* 54: 931-934.

Hendrickse, R.G., Coulter, J.B.S., Lamplugh, S.M., Macfarlane, S.B.J., Williams, T.E., Omer, M.I.A. & Suliman, G.I. (1982). Aflatoxins and kwashiorkor: a study in Sudanese children. *British Medical Journal.* 285: 843-846.

Hesseltine, C.W., Shotwell, O.L., Smith, M., Ellis, J.J., Vandegraft, E. & Shannon, G. (1970). Production of various aflatoxins by strains of the *Aspergillus flavus* series. En *Proceedings of the first U.S.-Japan Conference on toxic micro-organisms; mycotoxins and botulism, Honolulu, Hawaii, October 7-8, 1968.* M. Herzberg (ed). pp. 201-211. U.S. Department of the Interior, Washington, D.C. USA.

Hill, R.A., Wilson, D.M., McMillian, W.W., Widstrom, N.W., Cole, R.J., Sanders, T.H. Blankenship, P.D. (1985). En *Trichothecenes and other Mycotoxins.* Lacey, J. (ed.). John Wiley & Sons, Chichester, UK. pp: 79-95.

Hocking, A.D. (1997). Toxigenic *Aspergillus* species. En *Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers*. Doyle, M.P., Beuchat, L.R. & Montville, T.J. (eds.) ASM Press, Washington D.C., USA. pp: 393-405.

Holzapel, C.W. (1968). The isolation and structure of cyclopiazonic acid, a toxic metabolite of *Penicillium cyclopium* Westing. *Tetrahedron*. 24: 2101-2119.

Holzapel, C.W. (1971). On the biosynthesis of cyclopiazonic acid. *Phytochemistry*. 10: 351-358.

Horn, B.W., Greene, R.L., Sobolev, V.S., Dorner, J.W. & Powell, J.H. (1996). Association of morphology and mycotoxin production with vegetative compatibility groups in *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, and *A. tamarii*. *Mycologia*. 88: 574-587.

Horn, B.W. & Dorner, J.W. (1999). Regional differences in production of aflatoxin B<sub>1</sub> and cyclopiazonic acid by soil isolates of *Aspergillus flavus* along a transect within the United States. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 1444-1449.

Hunter, J.H. (1969), Diss. Purdue University, Dissertations Abstracts. International 31: 1447B-1448B.

ICMSF. (1996). *Microorganisms in Foods 5. Characteristics of Microbial Pathogens*. Blackie Academic & Professional, London, UK. pp. 347-381.

ICMSF. (2002). *Microorganisms in Foods 7. Microbiological Testing in Food Safety Management*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, USA. pp: 262-271.

Kaprovickas, A. (1969). The origin, variability, and spread of the groundnut (*Arachis hypogaea*). En *The domestication and exploitation of plants and animals*. Ucko, P.J., & Dimbleby, J.W. (eds.) Aldine. Chicago, USA. pp. 427-441.

Karon, M.L. & Hillery, B.E. (1949). Hygroscopic equilibrium of peanuts. *J.Am. Oil Chem. Soc.* 26: 16.[89].

King, A.D., Pitt, J.I., Beuchat, L.R. & Corry, J.E.L. (1986). *Methods for the mycological examination of food*. Plenum Press, New York, USA. pp. 40-45.

Klich, M.A. & Cleveland, T.E. (2000). *Aspergillus* systematics and the molecular genetics of mycotoxin biosynthesis. En *Integration of modern taxonomic methods for Penicillium and Aspergillus classification*. Samson, R.A. & Pitt, J.I. (eds.) Hardwood Academic Publishers, Australia. pp: 425-434.

Klich, M.A. & Pitt, J.I. (1988a). *A laboratory guide to common Aspergillus species and their teleomorphs*. CSIRO Division of Food Processing, North Ryde, New South Wales, Australia.

Klich, M.A. & Pitt, J.I. (1988b). Differentiation of *Aspergillus flavus* from *A. parasiticus* and other closely related species. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 91: 99-108.

Koehler, P.E., Beuchat, L.R., & Chinnan, M.S. (1985). Influence of temperature and water activity on aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds and meal. *J. Food Prot.* 48: 1040-1043.

Kozakiewicz, Z. (1989). *Aspergillus* species on stored products. *Mycological Papers.* 161:1-188.

Krishnamachari, K.A., Bhat, R.V., Nagarajan, V. & Tilak, T.B. (1975). Investigations into an outbreak of hepatitis in parts of Western India. *Indian Journal of Medical Research.* 63: 1036-1048.

Lacey, J. & Magan, N. (1991) Fungi in cereal grains: their occurrence and water and temperature relationships. En *Cereal grain. Mycotoxins, fungi and quality in drying and storage.* Chelkowski, J. (ed). Elsevier, Amsterdam, The Netherlands. pp. 77-118.

Lansden, J.A. (1986). Determination of cyclopiazonic acid in peanuts and corn by thin layer chromatography. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 69: 964-966.

Lansden, J. A. & Davidson, J. I. (1983). Occurrence of cyclopiazonic acid in peanuts. *Applied and Environmental Microbiology.* 45: 766-769.

Le Bars, J. (1979). Cyclopiazonic acid production by *Penicillium camembertii* Thom and natural occurrence of this mycotoxin in cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* 38: 1051-1055.

Lee, H.B. & Magan, N. (2000). Impact of environment and interspecific interactions between spoilage fungi and *Aspergillus ochraceus* on growth and ochratoxin production in maize grain. *Int. J. Food Microbiol.* 61: 11-16.

Lisker, N., Michaeli, R. & Frank, Z.R. (1993). Mycotoxigenic potential of *Aspergillus flavus* strains isolated from groundnuts growing in Israel. *Mycopathologia.* 122: 177-183.

Lomax, L.G., Cole, R.J., & Dorner, J.W. (1984) The toxicity of cyclopiazonic acid in weaned pigs. *Vet Pathol.* 21: 418-424.

Lubulwa, A.S.G. & Davis, J.S. (1994). Estimating the social costs of the impacts of fungi and aflatoxins. En *Stored Product Protection. Proceedings of the 6th International Working Conference on Stored-Product Protection.* Highley, E., Wright, E.J., Banks, H.J., & Champ, B.R. (eds.). CAB International, Wallingford, Oxford, England. pp: 1017-1042.

Luk, K.C., Kobbe, B. & Townsend, J.M. (1977). Production of cyclopiazonic acid by *Aspergillus flavus* Link. *Appl. Environ. Microbiol.* 33: 211-212.

Lye, M.S., Ghazali, A.A., Mohan, J., Alwin, N. & Nair, R.C. (1995). An outbreak of acute hepatic encephalopathy due to severe aflatoxicosis in Malasya. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 53: 68-72.

Magan, N., Cayley, G.R. & Lacey, J. (1984). Effect of water activity and temperature on mycotoxin production by *Alternaria alternata* in culture and on wheat grain. *Appl. Environ. Microbiol.* 47: 1113-1117.

Magan, N. & Lacey, J. (1989) Water and the ecology of grain fungi. En *Frontiers in applied microbiology, Vol. III.* Mukerji, K.G., Singh, V.P. & Garg, K.L. (eds.). South Asia Books, Rastogi & Company, Meerut, India. pp: 231-261.

Marin, S., Sanchis, V., Rull, F., Ramos, A.J., & Magan, N. (1998) Colonisation of maize grain by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* in the presence of competing fungi and their impact on fumonisin production. *Food Add. Contam.* 16: 555-563

Martins, M.L. & Martins, H.M. (1999). Natural and In vitro coproduction of cyclopiazonic acid and aflatoxins. *J. Food Protect.* 62: 292-294.

Masri, M.S. (1984). Defenses against aflatoxin carcinogenesis in humans. *Advances in Experimental Medical Biology.* 177: 115-146.

Matsudo, T. & Sasaki, M. (1995). Simple determination of cyclopiazonic acid. *Biosci. Biotech. Biochem.* 59: 355-357.

Mehan, V.K., McDonald, D., Haravu, L.J. & Jayanthi, S. (1991). *The groundnut aflatoxin problem: review and literature database*. ICRISAT, Patancheru, Andhra Pradesh, India. pp 3-39, 57-63, 279-285.

Melouk, H.A. & Shokes F.M. (1995). *Peanut Health Management*. American Phytopathological Society Press, St. Paul, Minnesota, USA. 137 pp.

Montani, M.L., Vaamonde, G., Resnik, S.L. & Buera, P. (1988). Water activity influence on aflatoxin accumulation in corn. *Int. J. Food Microbiol.* 6: 349-353.

Mphande, F.A., Siame, B.A., & Taylor, J.E. (2004). Fungi, aflatoxins, and cyclopiazonic acid associated with peanut retailing in Botswana. *Journal of Food Protection.* 67: 96-102.

Newell, J. (1983). Treatment for starvation may kill. *New Scientist.* 99: 471.

Norred, W.P., Porter, J.K., Dorner, J.W., & Cole, R.J. (1988). Occurrence of the mycotoxin, cyclopiazonic acid, in meat after oral administration to chickens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 36: 113-116.

Northolt, M.D., Verhulsdonk, C.A., Soentoro, P.S., & Paulsch, W.E. (1976) Effect of water activity and temperature on aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *J. Milk Food Technol.* 39: 170-174.

Northolt, M.D., van Egmond, H.P., & Paulsch, W.E. (1977) Differences between *Aspergillus flavus* strains in growth and aflatoxin B<sub>1</sub> production in relation to water activity and temperature. *J. Food Prot.* 40: 778-781.

Novas, M.V. & Cabral, D. (2002). Association of mycotoxin and sclerotia production with compatibility groups in *Aspergillus flavus* from peanut in Argentina. *Plant. Dis.* 86: 215-219.

Nuehring, L.P., Rowland, G.N., Harrison, L.R., Cole, R.J., & Corner, J.W. (1985). Cyclopiazonic acid mycotoxicosis in the dog. *Am. J. Vet. Res.* 46: 1670-1676.

Nwokolo, E. (1996) Peanut (*Arachis hypogaea* L.). En *Food and Fee from Legumes and Oilseeds*. Nwokolo, E. & Smartt, J. (eds.). Chapman and Hall. New York, USA. pp: 49-63.

Peers, F., Bosch, X., Kaldoc, J., Linsell, A., & Pluumen, M. (1987). Aflatoxin exposure, hepatitis B virus infection and liver cancer in Swaziland. *Int. J. Cancer.* 39: 545-553.

Pier, A.C. (1991). The influence of mycotoxins on the immune system. En *Mycotoxins and animal foods*. Smith, J.E. & Henderson, R.S. (eds.) CRC Press, Boca Raton, USA. pp: 489-497.

Pitt, J.I. (1975). Xerophilic fungi and the spoilage of foods of plant origin. En *Water relations of foods*. Duckworth, R.B. (ed). Academic Press. London, England. pp: 273-307.

Pitt, J.I. & Hocking, A.D. (1985). *Fungi and Food Spoilage*. Academic Press. Sydney, Australia.

Pitt, J.I. & Hocking, A.D. (1997). *Fungi and Food Spoilage*. Edn 2. Blackie Academic and Professional, London, UK. 510 pp.

Pitt, J.I. & Miscamble, B.F. (1995). Water relations of *Aspergillus flavus* and closely related species. *J. Food Prot.* 58: 86-90.

Porter, D.M., Smith, D.H. & Rodriguez-Kabana, R. (1997) *Compendium of Peanut Diseases* (The Disease compendium series of the American Phytopathological Society). Edn 2. Amer. Phytopathological Society Press, St. Paul, Minnesota, USA. 73 pp.

Purchase, I.F.H. (1971). The acute toxicity of the mycotoxin cyclopiazonic acid to rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 18: 114-123.

Prasongsidh, B.C., Kailasapathy, K., Skurray, G.R. & Bryden, W.L. (1998). Analysis of cyclopiazonic acid in milk by capillary electrophoresis. *Food Chemistry*. 61: 515-519.

Ramakrishana, N., Lacey, J., & Smith, J.E. (1996a) The effects of fungal competition on colonisation of barley grain by *Fusarium sporotrichioides* on T-2 toxin formation. *Food Add. Contam.* 13: 939-948.

Ramakrishana, N., Lacey, J., & Smith, J.E. (1996b) Colonisation of barley grains by *Penicillium verrucosum* and ochratoxin A formation in the presence of competing fungi. *J. Food Prot.* 59: 1311-1317.

Rao, B. L. & Husain, A. (1985). Presence of cyclopiazonic acid in kodo millet (*Paspalum scrobiculatum*) causing "kodoa poisoning" in men and its production by associated fungi. *Mycopathologia*. 89: 177-180.

Raper, K.B. & Fennell, D.I. (1965). *The genus Aspergillus*. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, USA. 686 pp.

Resnik, S. L., González, H. H. L., Pacin, A. M., Viora, M., Caballero, G. M., & Gros, E. G. (1996a). Cyclopiazonic acid and aflatoxins production by *Aspergillus flavus* isolated from Argentinian corn. *Mycotoxin Research*. 12: 61-66.

Resnik S. L., Neira, S., Pacin, A., Martínez, E., Apro, N., & Latreite, S. (1996b). A survey of the natural occurrence of aflatoxins and zearalenone in Argentine field maize: 1983-1994. *Food Additives and Contaminants*. 13: 115-120.

Ross, P.F., Rice, L.G., Casper, H.H., Crenshaw, J.D., & Richard, J.L. (1991). Novel occurrence of cyclopiazonic acid in sunflower seeds. *Vet. Human Toxicol.* 33: 284-285.

SAGPYA (2004). Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos. Ministerio de Economía y Producción (MECON). [www.sagpya.gov.ar](http://www.sagpya.gov.ar)

Saito, M., Tsuruta, O., Siriacha, P., Kawasugi, S., Manabe, M. & Buangsuwon, D. (1986). Distribution and aflatoxin production of the atypical strains of *Aspergillus flavus* isolated from soils in Thailand. *Proc. Jpn. Assoc. Mycotoxicol.* 24: 41-46.

Saito, M. & Tsuruta, O. (1993). A new variety of *Aspergillus flavus* from tropical soil in Thailand and its aflatoxin productivity. *Proc. Jpn. Assoc. Mycotoxicol.* 37: 31-36.

Samson, R.A. (1979). A compilation of the Aspergilli described since 1965. *Studies in Mycology*. CBS Publishers, Baarn, The Netherlands. 18: 1-38.

Samson, R.A. & Gams, W. (1985). Typification of the species of *Aspergillus* and associated teleomorphs. En *Advances in Penicillium and Aspergillus systematics*.

Samson, R.A. & Pitt, J.I. (eds.). Plenum Press, New York, USA. pp:31-54.

Samson, R.A., Hocking, A.D., Pitt, J.I. & King, A.D. (eds.) (1992). *Modern methods in food mycology*. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands. 388 pp.

Sauer, J.D. (1993). *Historical Geography of Crop Plants*. CRC Press. Boca Raton, FL, USA. 320 pp.

Schindler, A.F., Palmer, J.G., & Eissenberg, W.V. (1967). Aflatoxin production by *Aspergillus flavus* as related to various temperatures. *Appl. Microbiol.* 15: 1006-1009.

Schroeder, H.W. & Boller, R.A. (1973). Aflatoxin production of species and strains of the *Aspergillus flavus* group isolated from field crops. *Appl. Microbiol.* 25: 885-889.

Scott, P.M. (1992). Methods for the detection and determination of nitrogen-containing mycotoxins. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 28: 617-625.

Scott, W.J. (1957). Water relation of food spoilage microorganisms. *Adv. Food Res.* 7: 83-127.

Screenivasamurthy, V., Parpia, H.A.B., Srikanta, S., & Shankamurti, A. (1967). Detoxification of aflatoxin in peanut meal by hydrogen peroxide. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 50: 350-354.

Shank, R.C. (1978). Mycotoxicoses of man: dietary and epidemiological considerations. En *Mycotoxic fungi, mycotoxins, mycotoxicoses: an encyclopaedic handbook*. Wyllie, T.D. & Morehouse, L.G. (eds.). Marcel Dekker, New cork, USA. pp: 1-12.

Sheretz, P., Eadie, T., Young, J.W. & Llewellyn, G.C. (1976). Aflatoxin occurrence on raw and cooked York soybeans inoculated with three *Aspergillus* isolates. *J. Assoc. Off. Anal Chem.* 59: 662-665.

Shotwell, O.L., Hesseltine, C.W., Stubblefield, R.D. & Sorenson, W.G. (1966). Production of aflatoxin on rice. *Appl. Microbiol.* 14: 425-428.

Shotwell, O.L., Vandergraft, G.E. & Hesseltine, C.W. (1978). Aflatoxin formation on sixteen soybean varieties. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 61: 574-577.

Siller, W.G. & Ostler, D.C. (1961). The histopathology of an entero-hepatic syndrome of turkey poults. *Vet Rec.* 73: 134-138.

Smith, A.F. (2002). *Peanuts: The illustrious history of the goober pea*. University of Illinois Press. Chicago, USA. 272 pp.

Smith, J.E. & Moss, M.O. (1985). *Mycotoxins. Formation, Analysis and Significance*. John Wiley & Sons. Great Britain. 148 pp.

Sosa, M.J., Córdoba, J.J., Díaz, C., Rodríguez, M., Bermúdez, E., Asensio, M.A. & Núñez, F. (2002). Production of cyclopiazonic acid by *Penicillium commune* isolated from dry-cured ham on a meat extract-based substrate. *Journal of Food Protection*. 65: 988-992.

Stack, M.E. (1974). Collaborative study of AOAC methods I and III for the determination of aflatoxins in peanut butter. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 57: 871-874.

Stoloff, L. (1977). Aflatoxins: an overview. En *Mycotoxins in human and animal health*. Rodricks, J.V., Hesseltine, C.W. & Mehlman, M.A. (eds.). Pathotox Publishers. Park Forest South, Illinois, USA. pp: 7-28.

Stoloff, L. (1983). Aflatoxin as a cause of primary liver-cell cancer in the United States: a probability study. *Nutr. Cancer*. 5: 165-168.

Stoloff, L. & Friedman, L. (1976). Information bearing on the evaluation of the hazard to man from aflatoxin ingestion. *PAG Bull.* 6: 21-32.

Tran-Dinh, N., Pitt, J.I. & Carter, D.A. (1999). Molecular genotype analysis of natural toxigenic and nontoxigenic isolates of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. *Mycol. Res.* 103: 1485-1490.

Troller, J.A. & Scott, V.N. (1992). Measurement of water activity and acidity. pp. 135-147. En *Compendium of Methods for the Microbial Examination of Foods*. Third

Edition. Vanderzant, C. & Splittstoesser, D.F. (eds.) American Public Health Association.

Trucksess, M. W., Mislivec, P.B., Young, K., Bruce, V.R. & Page, S.W. (1987). Cyclopiazonic acid production by cultures of *Aspergillus* and *Penicillium* species isolated from dried beans, corn meal, macaroni, and pecans. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 70: 123-126.

Tuomi, T., Reijula, K., Johnsson, T., Hemminki, K., Hintikka, E., Lindroos, O., Kalso, S., Koukila-Kähkölä, P., Mussalo-Rauhamaa, H. & Haahtela, T. (2000) Mycotoxins in crude building materials from water-damaged buildings. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 1899-1904.

Urano, T., Trucksess, M.W., Beaver, R.W., Wilson, D.M., Dorner, J.W., & Dowell, F.E. (1992). Co-occurrence of cyclopiazonic acid and aflatoxins in corn and peanuts. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 75: 838-841.

U.S. Food and Drug Administration (FDA) (1996). Compliance Policy Guides, Sections 527.400, 555.400, and 683.100

Vaamonde, G. (1978). Estudio del comportamiento de diferentes variedades de maní en relación a la producción de aflatoxinas por *Aspergillus parasiticus*. Tesis Doctor en Ciencias Químicas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

Vaamonde, G., Degrossi, C., Comerio, R. & Fernández Pinto, V. (1995) *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus* en maní cultivado en la provincia de Córdoba (Argentina): características diferenciales y capacidad aflatoxicogénica. *Bol. Soc. Argent. Bot.* 30: 191-198.

Vaamonde, G., Degrossi, M. C., Fernández Pinto, V., & Comerio, R. (1996). Simultaneous production of aflatoxins and cyclopiazonic acid by strains of *Aspergillus* section *Flavi*. IX International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins, Rome, Italy, 27-31 May 1996, edited by M. Miraglia, C. Brera, R. Onori, pg. 281.

Vaamonde, G., Patriarca, A., Fernández Pinto, V., Comerio, R. & Degrossi, C. (2003). Variability of aflatoxin and cyclopiazonic acid production by *Aspergillus* section *Flavi* from different substrates in Argentina. *Int. J. Food Microbiol.* 88: 79-84.

Van Egmond, H.P. (1989). Current situation on regulations for mycotoxins. Overview of tolerances and status of standard methods of sampling and analysis. *Food Add. Contam.* 6: 139-188.

Van Egmond, H.P. (1991). Regulatory aspects of mycotoxin in Asia and Africa. En *Fungi and mycotoxins in stored products: proceedings of an international conference, Bangkok, Thailand 23-26 April, 1991*. Champ, B.R., Highley, E. Hocking, A.D., & Pitt, J.I. (eds.). ACIAR Proceedings N° 36. Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra, Australia. pp: 198-204.

Van Egmond, H.P. (1999). Worldwide regulations for mycotoxins. En *Conference on mycotoxins Third Joint FAO/WHO/UNEP International. Tunis, Tunisia, 3-6 March 1999*.

van Rensburg, S.J. (1977). Role of epidemiology in the elucidation of mycotoxin health risks. En *Mycotoxins in human and animal health*. Rodricks, J.V., Hesseltine, C.W. & Mehlman, M.A. (eds.) Pathatox Publishers, Park Forest South, Illinois, USA. pp: 699-711.

Varsavsky, E., Vaamonde, G., & Resnik, S. (1985). Micotoxinas - Panorama actual en la República Argentina. Ed: Secretaría de Ciencia y Técnica (SECYT), Buenos Aires, Argentina.

Wagener, R.E., Davies, N.D. & Diener, U.L. (1980). Penitrem A and roquefortine production by *Penicillium commune*. *Appl. Environ. Microbiol.* 39: 882-887.

Weiss, E.A. (2000). *Oilseed Crops*. Edn 2. Blackwell Science. London, England. 364 pp.

Weng, C.Y., Martinez, A.J., & Park, D.L. (1994). Efficacy and permanency of ammonia treatment in reducing aflatoxin levels in corn. *Food Add. Contam.* 11: 649-658.

Wilson, D. M., Tabor, W. H. & Trucksess, M. W. (1976). Screening method for the detection of aflatoxin, ochratoxin, zearalenone, penicillic acid and citrinin. *Journal of the AOAC*. 59: 125-127.

Wilson, M.E., Hagler, W.M., Cullen, J.M., Ort, J.F., & Cole, R.J. (1989) Acute toxicity of cyclopiazonic acid in selected avian species. En *Biodeterioration Research* 2. Llewellyn, G.C. & O'Rear, C.E. (eds.). Plenum Press, New York, USA. pp: 371-381.

[www.camaradelmani.com.ar](http://www.camaradelmani.com.ar)

[www.todoagro.com](http://www.todoagro.com)

Yu, J. Bhatnagar, D., & Ehrlich, C. (2002). Aflatoxin biosynthesis. *Rev. Iberoam. Micol.* 19:191-200.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Wilson' with a stylized flourish underneath.A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Llewellyn' with a large circular flourish at the end.