

Tesis de Maestría

Influencia de la actividad de agua, la temperatura y la presencia de compuestos fenólicos sobre el crecimiento de *Aspergillus carbonarius* y la producción de ocratoxina A

Romero, Stella Maris

2008

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

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

This document is part of the Master's and Doctoral Theses Collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Romero, Stella Maris. (2008). Influencia de la actividad de agua, la temperatura y la presencia de compuestos fenólicos sobre el crecimiento de *Aspergillus carbonarius* y la producción de ocratoxina A. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n4458_Romero

Cita tipo Chicago:

Romero, Stella Maris. "Influencia de la actividad de agua, la temperatura y la presencia de compuestos fenólicos sobre el crecimiento de *Aspergillus carbonarius* y la producción de ocratoxina A". Tesis de Magister. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2008. http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n4458_Romero

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Orgánica

**Influencia de la actividad de agua, la temperatura y la presencia
de compuestos fenólicos sobre el crecimiento de *Aspergillus
carbonarius* y la producción de ocratoxina A.**

78841

Tesis presentada para optar al título de
Magíster en Bromatología y Tecnología de la Industrialización de Alimentos

Biól. Stella Maris Romero

Directora de Tesis: Dra. Graciela Vaamonde

Buenos Aires, 2008

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado gracias a la ayuda de numerosas personas, quienes de manera directa o indirecta, colaboraron en mi formación profesional. Mi mayor agradecimiento a todas ellas y mis disculpas a aquellas que inadvertidamente pude haber omitido.

A Román, sin el cual la realización de este trabajo no hubiera sido posible, por su ayuda diaria, su confianza incondicional y las permanentes palabras de aliento.

A toda mi familia por darme ánimo y por la paciencia inagotable.

A mi directora, la Dra. Graciela Vaamonde, por enseñarme a realizar un trabajo científico y por el apoyo y el estímulo recibidos a lo largo de la tesis.

A Virginia y a Andrea por sus valiosos consejos y por la ayuda recibida a mis pedidos de auxilio.

A Nilda por su valiosa e indispensable ayuda en la tarea diaria.

A mis compañeros de Maestría, pero especialmente a Laura, Alejandra, Alexis, Irene...

A Pamela ¡compañera de tantas materias! Por ayudarme a enfrentar el estudio de cada una de ellas con paciencia y voluntad.

Mi gratitud a mis compañeros del laboratorio por la tolerancia de tantos años.

A Ricardo, Gabriela, Corita, Pamela, Alicia, Roxana, Ursula, Paula, Eduardo, Leandro y Leonor, por escucharme siempre y brindarme palabras de aliento.

A la Dras. Cristina Manca de Nadra y Maria Rosa Alberto por la ayuda recibida durante una pasantía realizada en el CERELA.

A la Dra. Pilar Buera y a su grupo por la generosidad al permitirme utilizar equipamiento de su laboratorio.

A Lili por su excelente predisposición.

A Mari por su eficiente e imprescindible labor en los trámites administrativos.

A la Universidad de Buenos Aires por la Beca de Maestría, durante la cual se llevó a cabo parte de este trabajo.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN

I.1. Micotoxinas

I.2. Ocratoxina A

- I.2.1. Estructura
- I.2.2. Toxicología
- I.2.3. Incidencia en alimentos
- I.2.4. Legislación

I.3. Hongos productores de ocratoxina A

- I.3.1. Género *Penicillium*
- I.3.2. Género *Aspergillus*
 - I.3.2.1. *Aspergillus* Sección *Circumdati*
 - I.3.2.2. *Aspergillus* Sección *Nigri*

I.4. Parámetros que influyen sobre el crecimiento y la producción de ocratoxina A

- I.4.1. Actividad de agua
- I.4.2. Temperatura
- I.4.3. pH
- I.4.4. Composición del sustrato
- I.4.5. Agentes antimicrobianos
- I.4.6. Otros factores
 - I.4.6.1. Microorganismos
 - I.4.6.2. Insectos
 - I.4.6.3. Composición de la atmósfera
 - I.4.6.4. Tiempo de incubación
- I.4.7. Interacción de factores

I.5. Objetivos del presente trabajo

II. MATERIALES Y MÉTODOS

II.1. Selección y caracterización de las cepas de <i>A. carbonarius</i> productoras de OTA	24
II.1.1. Selección de las cepas	24
II.1.2. Caracterización de las cepas	24
II.1.2.1. Crecimiento	24
II.1.2.2. Producción de OTA	25
II.1.3. Diseño experimental y tratamiento estadístico de los datos	26
II.2. Influencia de la actividad de agua y la temperatura sobre el crecimiento y producción de OTA por <i>A. carbonarius</i>.	26
II.2.1. Crecimiento	26
II.2.2. Producción de OTA	27
II.2.3. Diseño experimental y tratamiento estadístico de los datos	27
II.3. Efecto de compuestos fenólicos sobre el crecimiento y producción de OTA por <i>A. carbonarius</i>	28
II.3.1. Crecimiento	28
II.3.2. Producción de OTA	29
II.3.3. Diseño experimental y tratamiento estadístico de los datos	29

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

III.1. Selección y caracterización de las cepas de <i>A. carbonarius</i> productoras de OTA	30
III.1.1. Crecimiento y fase lag	30
III.1.2. Producción de OTA	31
III.2. Influencia de la actividad de agua y la temperatura sobre el crecimiento de <i>A. carbonarius</i>	33
III.3. Influencia e interacciones de la actividad de agua, la temperatura y el tiempo de incubación sobre la producción de OTA	37

III.4. Efecto de compuestos fenólicos sobre el crecimiento y producción de OTA por <i>A. carbonarius</i>	43
III.4.1. Efecto de polifenoles totales de vino Merlot	43
III.4.2. Efecto de los compuestos fenólicos puros	44
III.4.2.1. Efecto de compuestos fenólicos no flavonoides: ácidos gálico y cafeico	45
III.4.2.2. Efecto de compuestos fenólicos flavonoides: catequina, quercetina y rutina.	50
IV. CONCLUSIONES	59
V. BIBLIOGRAFÍA	62
APÉNDICES	
1. Abreviaturas	i
2. Composición de los medios de cultivo empleados	ii
3. Tablas de datos	iii
4. Tablas de análisis de varianza	xiii



Introducción

I. INTRODUCCIÓN

I.1. Micotoxinas

Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos por hongos capaces de crecer en una gran variedad de sustratos bajo las más diversas condiciones ambientales. Dichos compuestos presentan distintas estructuras químicas y actividades biológicas, contaminando con frecuencia alimentos y provocando respuestas tóxicas en humanos y animales.

Las micotoxinas son consideradas metabolitos secundarios porque no son necesarias para el crecimiento fúngico. Al presente no está totalmente elucidada la función de las mismas y se cree que protegen a los hongos actuando como un mecanismo de defensa contra animales, plantas y otras especies fúngicas que compiten en el mismo medio ambiente (Smith y Moss, 1985).

Se pueden encontrar especies productoras de micotoxinas en los principales grupos taxonómicos de hongos, pero el género *Aspergillus* es indudablemente uno de los más importantes. Entre las micotoxinas producidas por *Aspergillus spp.*, ocratoxina A recibe gran atención en todo el mundo debido al riesgo que implica sobre la salud humana y animal (Abarca *et al.*, 2001).

I.2. Ocratoxina A

I.2.1. Estructura

Las ocratoxinas son una familia de toxinas descritas químicamente como ácidos orgánicos débiles formados por una dehidroisocumarina unida por el grupo 7-carboxilo a una molécula de L-β-fenilalanina mediante un enlace amida. La estructura química de la OTA ($C_{20}H_{18}ClNO_6$) es: (R)-N-[(5-cloro-3,4-dihidro-8-hidroxi-3-metil-1-oxo-1H-2-benzopirano-7-il) carbonil]-L-fenilalanina (Moss, 1996) y puede observarse en la Figura I.1.

Ocratoxina A (OTA) es la más tóxica de las ocratoxinas y su nombre deriva de *A. ochraceus* que fue el primer hongo a partir del cual fue aislada (Van der Merwe *et al.*,

1965). Aunque fueron aislados de cultivos de laboratorio un amplio rango de derivados de ocratoxina, usualmente sólo ocratoxina A y ocasionalmente ocratoxina B (que no posee el átomo de cloro en la molécula de isocumarina), se han encontrado como contaminantes naturales en productos vegetales (Moss, 1996).

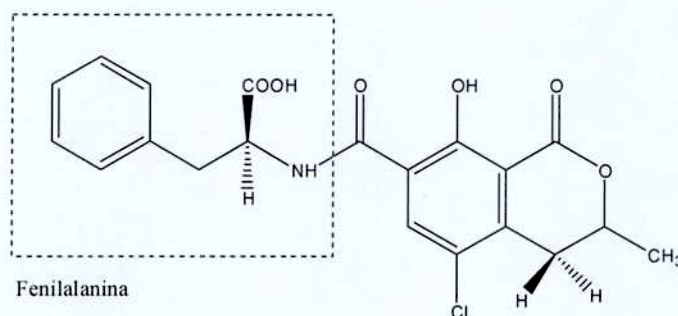


Figura I.1: Estructura de ocratoxina A.

I.2.2. Toxicología

OTA es principalmente nefrotóxica y sus efectos sobre el riñón han sido demostrados en todas las especies de mamíferos investigados. Esta toxina produce importantes pérdidas económicas en la industria porcina dado que los cerdos son muy sensibles a sus efectos tóxicos; en Dinamarca la nefropatía porcina ha sido bien documentada por muchos años (Smith y Moss, 1985). En los rumiantes la ocratoxicosis ha sido raramente informada, presumiblemente por la habilidad de los microorganismos del rumen para hidrolizar la OTA a la forma α no tóxica por pérdida de la molécula de fenilalanina. En humanos ha sido relacionada a la Nefropatía Endémica de los Balcanes (Castegnaro *et al.*, 1991; Puntarić *et al.*, 2001), una enfermedad renal fatal presente en áreas del sudeste de Europa, y al incremento drástico en el número de tumores del tracto urinario superior en estas mismas áreas (Castegnaro y McGregor, 1998) en las cuales se ha detectado una alta incidencia en la contaminación con OTA en los alimentos, principalmente cereales, consumidos por la población (Pittet, 1998).

Si bien la OTA es principalmente una nefrotoxina, también ha sido informada como cancerígena, teratogénica, inmunosupresora y potencialmente genotóxica (Smith y Moss, 1985; Krogh, 1987; Kuiper-Goodman, 1996).

La carcinogenicidad de la OTA en ratas y ratones ha sido bien establecida. La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) ha clasificado a la ocratoxina A como un posible carcinógeno humano (Grupo 2B) basado en la suficiente evidencia de carcinogenicidad en estudios experimentales con animales y la inadecuada evidencia en humanos (IARC, 1993).

Estudios que demuestran la presencia de la OTA en plasma humano en países como Dinamarca, Bulgaria, Japón (Akiyama *et al.*, 1998), Canadá (Scott *et al.*, 1998), Croacia (Peraica *et al.*, 1998), República Checa (Malir *et al.*, 1998), Italia (Pietri *et al.*, 2001; Brera *et al.*, 2002) y Suiza (Zimmerli y Dick, 1995 y 1996) indican su distribución cosmopolita. También ha sido detectada en otros fluidos corporales como leche materna en Australia (Apostolou *et al.*, 1998) e Italia (Micco *et al.*, 1996; Miraglia *et al.*, 1998).

En el hombre la OTA exhibe una toxicocinética inusual, ya que tiene una vida media en sangre de alrededor de 35 días después de una ingestión oral (Petzinger y Weidenbach, 2002). Debido a esto, su detección en suero puede ser usada como índice de exposición de la población a esta toxina (Codex Alimentarius Commission, 1998).

1.2.3. Incidencia en alimentos

Debido a la amplia distribución de los hongos que la producen, la OTA se encuentra presente en una gran variedad de sustratos. Los alimentos en los que más frecuentemente se ha encontrado OTA son los cereales como la cebada, trigo, centeno, avena (Pittet, 1998), arroz (Jorgenssen y Bilde, 1996) y carnes de cerdo, patos, pollos y derivados, debido al consumo de piensos contaminados (Jorgensen, 1998). Ha sido informada también su presencia en otros sustratos como leche de vaca (Skaug, 1999), café (Patel, 1997, Urbano *et al.*, 2001), cacao (Tafari *et al.*, 2004), vinos suizos, alemanes e italianos (Zimmerli y Dick, 1996; Otteneder y Majerus, 2000; Pietri *et al.*, 2001), cerveza (Jorgensen, 1998) y en pasas de uva (MacDonald *et al.*, 1999; Romero *et al.*, 2005). La Tabla I.1 resume los datos de incidencia en diversos alimentos.

Tabla I.1. Presencia de OTA en alimentos

Sustrato	Origen	Muestras positivas/total	Rango*	Referencia
Avena	Dinamarca	40/92	0,05-5,6	Jorgensen y Bilde, 1996
	Reino Unido	6/21	0,1-2,2	MAFF, 1999
Cacao	Italia	9/18	0,22-0,77	Tafari <i>et al.</i> , 2004
Café	Brasil	33/34	0,6-6,5	Leoni <i>et al.</i> , 2000
	Brasil	39/135	0,2-109	Taniwaki <i>et al.</i> , 2003
	Canadá	42/71	0,1-2,3	Lombaert <i>et al.</i> , 2001
	Dinamarca	11/11	0,001-3,2	Jorgensen, 1998
	España	20/40	0,056-0,316	Lopez de Cerain <i>et al.</i> , 2002
	Reino Unido	81/100	0,1-8,0	Patel <i>et al.</i> , 1997
Café verde	Italia	17/29	0,2-15	Micco <i>et al.</i> , 1989
	Japón	14/47	0,1-17,4	Pittet, 1998
Carne de cerdo	Dinamarca	64/76	0,001-1,3	Jorgensen, 1998
Cebada	Alemania	12/39	0,1-2,7	Pittet, 1998
	Reino Unido	18/98	0,3-117	MacDonald <i>et al.</i> , 2004
Centeno	Dinamarca	256/616	0,05-121	Jorgensen <i>et al.</i> , 1996
Cerveza	Dinamarca	21/21	0,001-0,160	Jorgensen, 1998
	Sudáfrica	10/29	3-2340	Odhav y Naicker, 2002
	Suiza	7/7	1-3,3	Zimmerli y Dick, 1995
Hierbas y especias	Reino Unido	25/29	1,2-50,4	Patel <i>et al.</i> , 1996
Jugo de uva	Brasil	14/48	0,021-0,100	Rosa <i>et al.</i> , 2004
	Europa	8/11	0,4-31,1	Zimmerli y Dick, 1996
Leche de vaca	Noruega	11/87	0,011-0,058	Skaug, 1999
Maíz	Eslovenia	17/51	0,02-40	Puntarić <i>et al.</i> , 2001
Mosto	Francia	8/11	0,01-0,461	Sage <i>et al.</i> , 2002
	Líbano	27/47	0,011-0,221	El Khoury <i>et al.</i> , 2006
Pasas de uva	Canadá	108/153	0,1-26,6	Lombaert <i>et al.</i> , 2004
	Reino Unido	286/301	0,1-40,8	MAFF, 1999
	Turquía	179/264	0,026-54	Meyvaci <i>et al.</i> , 2005
	Argentina	37/50	1,4-14	Magnoli <i>et al.</i> , 2004
	Argentina	8/11	0,11-0,39	Romero <i>et al.</i> , 2005
Porotos secos	Croacia	17/45	0,25-0,92	Domijan <i>et al.</i> , 2005
Trigo	Dinamarca	165/520	0,05-51	Jorgensen y Bilde, 1996
	Eslovenia	74/92	0,02-160	Puntarić <i>et al.</i> , 2001
	Reino Unido	22/148	0,1-9,2	MAFF, 1999
Uvas frescas	Portugal	3/4	9,5-115,6	Serra <i>et al.</i> , 2005
Uva (pulpa congelada)	Brasil	2/16	0,021-0,035	Rosa <i>et al.</i> , 2004
Vino	Argentina	2/12	0,028-0,042	Rosa <i>et al.</i> , 2004
	Brasil	6/25	0,028-0,042	Rosa <i>et al.</i> , 2004
	Chile	2/5	0,028-0,071	Rosa <i>et al.</i> , 2004
	España	20/40	0,056-0,316	Lopez de Cerain <i>et al.</i> , 2002
	Italia	82/96	0,001-3,177	Pietri <i>et al.</i> , 2001
	Líbano	42/70	0,012-0,126	El Khoury <i>et al.</i> , 2006

(*): $\mu\text{g.l}^{-1}$ o $\mu\text{g.Kg}^{-1}$.

Si bien los cereales son la primera fuente de OTA en la dieta europea, recientemente ha adquirido gran importancia su detección en productos derivados de uvas, encontrándose que el vino es la segunda fuente de OTA para la población europea (Codex Alimentarius Commission, 1998).

Desde la primera descripción de la presencia de OTA en vino y zumo de uva (Zimmerli y Dick, 1996) se han llevado a cabo numerosos estudios en diferentes países, principalmente en Europa, para examinar la presencia de esta toxina en vino y otros subproductos de la uva.

Con respecto al vino se encontró que el porcentaje de muestras positivas, así como la cantidad detectada de OTA, siguen un gradiente decreciente del vino tinto al rosado y al blanco (Zimmerli y Dick, 1996; Otteneder y Majerus, 2000; Lo Curto *et al.*, 2004; Belli *et al.*, 2004c). Esta diferencia se atribuye al proceso de elaboración del vino tinto, diferente al del vino blanco. En la elaboración del vino tinto se dejan en contacto durante unos días la piel y el jugo de la uva para extraer los pigmentos naturales. En este período se cree que se produce la contaminación por la toxina presente en la parte externa de la uva, donde se han desarrollado los hongos (Bau, 2005). Por otra parte según Otteneder y Majerus (2000) las elevadas temperaturas y las condiciones aerobias presentes dentro de los tanques, antes de proceso de fermentación, favorecen la formación de OTA. Además, los vinos blancos sufren un proceso de clarificación con arcillas, como bentonita o zeolita, que podrían actuar como absorbentes de OTA (Bau, 2005). Los vinos dulces presentan concentraciones de OTA mayores incluso que los tintos (Zimmerli y Dick, 1996; Pietri *et al.*, 2001), al realizarse una vendimia más tardía para obtener una uva más dulce. La cantidad de OTA fue dependiente también de la latitud de la región productora, a menor latitud es más frecuente la presencia de la toxina y mayor la concentración (Zimmerli y Dick, 1996; Otteneder y Majerus, 2000; Pietri *et al.*, 2001; Stefanaki *et al.*, 2003).

OTA puede contaminar otros subproductos de la uva además del vino, ha sido hallada en jugo de uva (Zimmerli y Dick, 1996), vinagre (Markaki *et al.*, 2001; Battilani *et al.*, 2006) y en pasas de uva (Mac Donald *et al.*, 1999; Stefanaki *et al.*, 2003; Magnoli *et al.*, 2004; Romero *et al.*, 2005). Las pasas de uva podrían ser una fuente importante de OTA en la dieta de personas con altos niveles de consumo, especialmente los niños, ya que son comúnmente usadas en los cereales de desayuno (Battilani *et al.*, 2004).

Desde la primera detección de OTA en muestras comerciales de café tostado (Tsubouchi *et al.*, 1988), se llevaron a cabo numerosos estudios en diferentes países (Tabla I.1). Los cafés solubles presentan mayor cantidad de OTA (Patel *et al.*, 1997), aunque al ser un producto más concentrado, la cantidad de toxina ingerida en una taza de café preparada a partir de café normal y de café soluble es similar (Slayne, 2000).

La presencia de esta toxina ampliamente distribuida en los alimentos, aun a bajos niveles, constituye un riesgo importante a tener en cuenta debido a la contribución conjunta de los mismos en la ingesta diaria.

I.2.4. Legislación

El JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives), propuso una ingesta provisional semanal tolerable (PTWI) para OTA de $0,1 \mu\text{g.kg}^{-1}$ masa corporal (equivalente a 14 ng.kg^{-1} masa corporal por día) (Codex Alimentarius Commission, 2001).

En la Tabla I.2 pueden observarse los límites fijados en la Comunidad Europea para alimentos destinados a consumo humano. Los valores para cereales destinados al consumo animal varían entre 100 a $250 \mu\text{g.Kg}^{-1}$ (Anónimo, 2006).

Tabla I.2. Niveles máximos de ocratoxina A permitidos en la Comunidad Europea (Anónimo, 2005).

Productos	Ocratoxina A: contenido máximo ($\mu\text{g.Kg}^{-1}$)
Cereales	5
Productos derivados de los cereales	3
Pasas de uva	10
Café	5
Café soluble	10
Vinos y derivados	2
Alimentos a base de cereales para lactantes y niños de corta edad	0,5
Alimentos dietéticos destinado a usos médicos especiales y lactantes	0,5

Hasta el momento no existen regulaciones para esta toxina en nuestro país.

I.3. Hongos productores de ocratoxina A

La ocratoxina A es producida por diversas especies de *Aspergillus* y *Penicillium*, que junto con *Fusarium*, son los tres géneros más importantes productores de micotoxinas.

I.3.1. Género *Penicillium*

Si bien se atribuyó la producción de OTA a varias especies de *Penicillium*, debido a la complejidad taxonómica que presenta el género dichas especies no siempre fueron correctamente identificadas. Tras las revisiones de Ciegler *et al.* (1973) y Pitt (1987) se asumió que la producción de OTA por *Penicillium spp.* se restringía a *Penicillium verrucosum*. Actualmente se considera la división de *P. verrucosum* en 2 especies ocratoxicogénicas: *P. verrucosum* y *P. nordicum* (Larsen *et al.*, 2001). *Penicillium verrucosum* es el mayor productor de OTA en cereales almacenados en climas fríos y *P. nordicum* es el principal productor de OTA encontrado en productos cárneos manufacturados tales como salames y jamón (Frisvad *et al.*, 2006).

Generalmente se considera que *P. verrucosum* es el responsable de la producción de OTA en zonas frías, mientras que la contaminación por OTA en zonas más cálidas se atribuye a especies de *Aspergillus* (Pitt y Hocking, 1997).

I.3.2. Género *Aspergillus*

Las especies ocratoxicogénicas dentro de este género están incluidas principalmente en las secciones *Circumdati* y *Nigri*, ambas pertenecientes al subgénero *Circumdati* (Gams *et al.*, 1985).

I.3.2.1. *Aspergillus* Sección *Circumdati*

Ocratoxina A fue aislada por primera vez en Sudáfrica en 1965 como un metabolito de una cepa de *A. ochraceus* (van der Merwe *et al.*, 1965). Durante los años siguientes

otras especies de *Aspergillus* de la sección *Circumdati* (grupo del *A. ochraceus*) fueron identificadas como productoras de OTA. *A. alliaceus*, también ocratoxicogénica, ha sido recientemente removida de la sección *Circumdati* y ubicada en la sección *Flavi* (Bayman *et al.*, 2002).

Desde la primera descripción de la producción de OTA por *A. ochraceus* otras especies de la sección han sido encontradas como productoras de esta toxina: *A. cretensis*, *A. flocculosus*, *A. pseudoelegans*, *A. roseoglobulosus*, *A. sclerotiorum*, *A. steynii*, *A. sulphureus*, *A. westerdijkiae* y *Neopetromyces muricatus* (Frisvad *et al.*, 2004).

Recientemente ha sido demostrado que *A. ochraceus* consiste de dos especies, la segunda y nueva especie produce grandes cantidades de OTA y ha sido descrita como *A. westerdijkiae*. Muchos aislamientos previamente identificados como *A. ochraceus*, incluyendo el aislamiento productor de OTA original (NRRL 3174), ahora han sido identificados como *A. westerdijkiae* (Frisvad *et al.*, 2004). Esta nueva especie es mayor productora de toxina que *A. ochraceus* y es el principal responsable de la presencia de OTA en granos de café en Brasil (Morello *et al.* 2007).

I.3.2.2. *Aspergillus* Sección *Nigri*

Dentro del género *Aspergillus* la sección *Nigri* es una de las más importantes. Sus especies se caracterizan por presentar colonias de coloración oscura, frecuentemente de color negro, y conidióforos uniseriados o biseriados. Su distribución es mundial, siendo especialmente abundantes en suelos de zonas tropicales y subtropicales (Bau, 2005).

La taxonomía de esta sección es una de las más complejas dentro del género *Aspergillus*, y ha dado lugar a diferentes propuestas taxonómicas (Raper y Fennell, 1965; Gams *et al.*, 1985; Al-Musallam, 1980; Abarca *et al.*, 2004; Samson *et al.*, 2004). Los errores en la clasificación de las especies de este género se deben, básicamente, a que muchas veces las diferencias descritas entre los distintos taxones son muy sutiles. Además es común identificar todas las colonias de *Aspergillus* de coloración negruzca como *A. niger*.

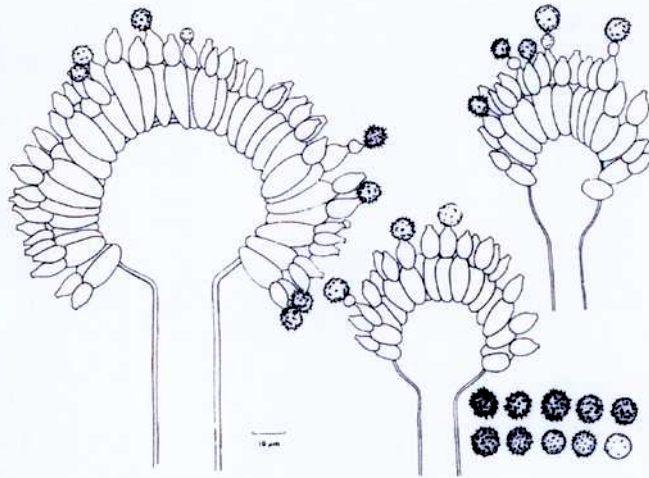
Al-Musallam (1980) en su revisión de este grupo, los dividió en cinco especies fácilmente distinguibles entre sí (*A. carbonarius*, *A. ellipticus*, *A. heteromorphus*, *A. helicotrix* y *A. japonicus*) y el agregado *A. niger* formado por dos especies: *A. foetidus* y *A.*

niger, esta última dividida a su vez en seis variedades y dos formas. Dentro del llamado agregado *A. niger* es extremadamente difícil distinguir morfológicamente una especie de otra y por datos moleculares éste puede ser dividido en dos, tres o incluso cuatro taxones de acuerdo a los diferentes autores (Kusters-Van Someren *et al.*, 1991; Varga *et al.*, 2000a; Parenikova *et al.*, 2000). Por lo cual, Abarca *et al.* (2004) en su revisión de la taxonomía de esta sección, incluyen una clave sencilla en la que sólo consideran a las dos especies uniseriadas (*A. aculeatus* y *A. japonicus*), a *A. carbonarius* y al agregado *A. niger*. Samson *et al.*, (2004) describieron cuatro especies nuevas en la sección, aceptando en total quince taxones. Sin embargo solamente las cuatro especies mencionadas por Abarca *et al.* (2004) son relativamente comunes. El resto de las especies descritas son raramente observadas o solamente existe un único aislamiento.

Dentro de la sección *Nigri*, *A. carbonarius* se puede diferenciar fácilmente por sus conidios de gran tamaño, generalmente con diámetros de 7-9 μm , y ornamentación equinulada (Figura I.2). Las técnicas de RFLP del ADNr y ADNmt, y RAPD, permiten diferenciar claramente *A. carbonarius* del resto de las especies del agregado *A. niger* (Parenikova *et al.*, 2000, Varga *et al.*, 2000a, Bau, 2005). En el año 2006, Serra *et al.*, describieron una nueva especie de la sección *Nigri* aislada de uvas, como *A. ibericus*. Esta especie es similar a *A. carbonarius* pero posee conidios de menor tamaño.

En 1994 Abarca *et al.* describieron por primera vez la producción de OTA por *A. niger*. Esta especie ha sido muy utilizada en la industria de alimentos como productor de ácido cítrico y además es fuente de enzimas extracelulares. A pesar de haber sido encontrada como productora de esta toxina mantiene la categoría GRAS (generally recognized as safe) de la Food and Drug Administration (FDA) (Schuster *et al.*, 2002). Posteriormente otros autores observaron la producción de la toxina en el agregado *A. niger* (Téren *et al.*, 1996) y en *A. carbonarius* (Horie, 1995; Téren *et al.*, 1996). Si bien *A. niger* está más ampliamente diseminado que *A. carbonarius*, un gran porcentaje de las cepas no son ocratoxicogénicas. En el agregado *A. niger* el porcentaje de cepas productoras varía según lo encontrado por diferentes autores de 0 al 21 % (Accensi *et al.*, 2001; Abarca *et al.*, 1994, Téren *et al.*, 1996; Heenan *et al.*, 1998; Sage *et al.*, 2002; Taniwaki *et al.*, 2003; Battilani *et al.*, 2003; Serra *et al.*, 2003; Romero *et al.*, 2005; Bau *et al.*, 2005b; Guzev *et*

a)



b)

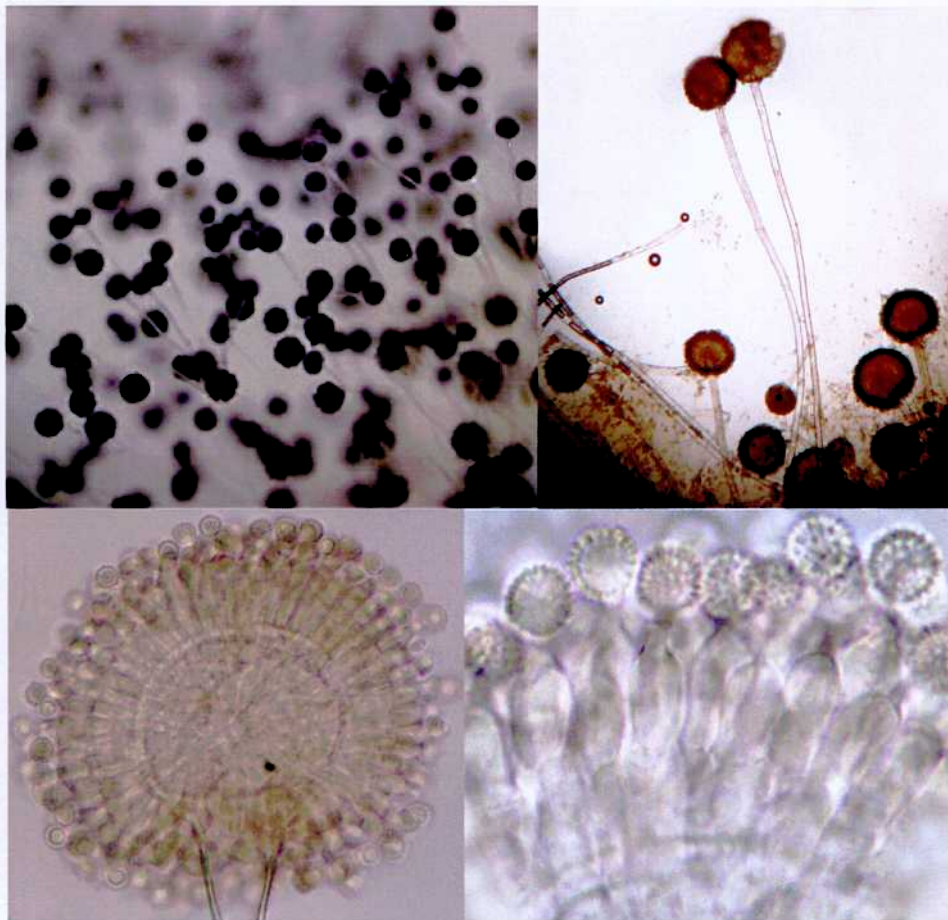


Figura I.2: *Aspergillus carbonarius*. a) dibujo de conidióforo y conidios (tomado de Al-Musallam, 1980); b) conidióforos, cabezuela y detalle de cabezuela y conidios.

al., 2006; Gómez *et al.*, 2006), sin embargo Da Rocha Rosa *et al.* (2002) observaron que el 30% de las cepas de *A. niger* provenientes de uvas cultivadas en Brasil fueron ocratoxicogénicas y Magnoli *et al.* (2003) que un 43,1 % de *A. niger* var. *niger* aislados de uvas argentinas producían la toxina. Por otro lado, en *A. carbonarius* este porcentaje es muy superior y puede llegar al 100 % (Sage *et al.*, 2002; Taniwaki *et al.*, 2003; Battilani *et al.*, 2003; Serra *et al.*, 2003; Romero *et al.*, 2005; Bau *et al.*, 2005b; Gómez *et al.*, 2006). Las cepas pertenecientes a la especie *A. ibericus* no producen OTA (Serra *et al.*, 2006). La Tabla I.3 muestra la distribución de cepas ocratoxicogénicas de *Aspergillus* de la sección *Nigri* aisladas de alimentos en diferentes regiones geográficas.

Tabla I.3. Distribución de cepas ocratoxicogénicas de la sección *Nigri* aisladas de diferentes alimentos.

País	Sustrato	<i>A. niger</i>		<i>A. carbonarius</i>		Referencia
		Cepas aisladas	Porcentaje cepas OTA +	Cepas aisladas	Porcentaje cepas OTA +	
España	Alimentos balanceados	19	10,5			Abarca <i>et al.</i> , 1994
Australia	Pasas de uva	115	1,7	33	91	Heenan <i>et al.</i> , 1998
España	Uvas			18	100	Cabañes <i>et al.</i> , 2002
Francia	Uvas	73	0	15	93	Sage <i>et al.</i> , 2002
Argentina	Uvas	48	17			Da Rocha Rosa <i>et al.</i> , 2002
Brasil	Uvas	53	30	32	25	Da Rocha Rosa <i>et al.</i> , 2002
Italia	Uvas	270	5	86	60	Battilani <i>et al.</i> , 2003
Portugal	Uvas	294	4	39	97	Serra <i>et al.</i> , 2003
España	Pasas de uva	168	0,6	91	96,7	Abarca <i>et al.</i> , 2003
Argentina	Uvas	44	43			Magnoli <i>et al.</i> , 2003
Argentina	Pasas de uva	293	1	48	96	Romero <i>et al.</i> , 2005

Algunos estudios señalan la producción de OTA por parte de las especies uniseriadas de la sección (Battilani *et al.*, 2003; Dalcero *et al.*, 2002; Magnoli *et al.*, 2004), aunque este hecho requiere confirmación, ya que no son especies consideradas productoras (Téren *et al.*, 1996; Parenicova *et al.*, 2001; Samson *et al.*, 2004; Bau *et al.*, 2005a; Romero *et al.*, 2005; Guzev *et al.*, 2006).

En los últimos años numerosos trabajos han informado que las especies de la Sección *Nigri* constituyen la micota predominante de uvas (Cabañes *et al.*, 2002; Da Rocha Rosa *et al.*, 2002; Battilani *et al.*, 2003; Serra *et al.*, 2003; Bau *et al.*, 2005b). La mayoría de los aislamientos corresponden al agregado *A. niger* que, tal como fuera informado anteriormente, presenta una baja proporción de cepas productoras de OTA. Los aislamientos de otras especies ocratoxicogénicas han sido escasos en este sustrato (Serra *et al.*, 2003; Battilani *et al.*, 2003; Bau *et al.*, 2005b). Por lo tanto, la mayoría de los autores coinciden en que *A. carbonarius* sería el principal responsable de la contaminación con OTA en uvas (Sage *et al.*, 2002; Battilani *et al.*, 2003; Bau *et al.*, 2005b) y en consecuencia en el vino (Cabañes *et al.*, 2002) y otros productos derivados (Varga y Kozakiewicz, 2006).

En estudios de micota de pasas de uvas, los “aspergilos negros” fueron los más frecuentemente aislados (Abarca *et al.*, 2003; Magnoli *et al.*, 2004; Romero *et al.*, 2005). Estos hongos pueden crecer en las primeras etapas del secado ya que son muy resistentes a las condiciones del mismo y además el color negro de los conidios los protegería de la luz del sol y la irradiación ultravioleta, proveyéndoles de una ventaja competitiva en aquellos productos secados al sol (Pitt y Hocking, 1997). *A. carbonarius* ha sido indicado como el principal responsable de la contaminación con OTA en pasas de uva (Abarca *et al.*, 2003; Magnoli *et al.*, 2004; Romero *et al.*, 2005; Varga y Kozakiewicz, 2006).

I.4. Parámetros que influyen sobre el crecimiento y la producción de OTA

Una vez que la OTA se ha formado en un alimento es muy difícil removerla con las múltiples formas de procesado, y a su vez no se han obtenido resultados concluyentes con los distintos métodos de detoxificación estudiados (Moss, 1996; Scott, 1996). Por lo tanto la mejor manera de evitar el riesgo de contaminación con la toxina consiste en prevenir el crecimiento fúngico, para lo cual el conocimiento de las condiciones óptimas y limitantes para el crecimiento y producción de OTA es indispensable.

Tanto el crecimiento como la producción de micotoxinas son influenciados por el genotipo del hongo y por el medio ambiente en el cual se desarrolla. Entre los principales

factores ambientales que condicionan el crecimiento fúngico y la consiguiente producción de toxina se pueden mencionar la actividad de agua, la temperatura y el sustrato.

La influencia de estos factores sobre el crecimiento y la fisiología de la producción de OTA ha sido principalmente estudiada en *A. ochraceus*, aunque también hay datos sobre *P. verrucosum*. Recientemente se ha comenzado a estudiar el efecto de diferentes parámetros en cepas de *Aspergillus* de la sección *Nigri*.

I.4.1. Actividad de agua

El concepto físico-químico de actividad de agua (a_w) fue presentado a los microbiólogos por Scott en 1957 (Pitt y Hocking, 1997) y constituye una buena medida de la disponibilidad de agua en el sustrato para los organismos que lo colonizan y pueden crecer en él. Por lo tanto, la a_w tiene una gran importancia tanto para el crecimiento de los hongos como para la producción de toxina.

La actividad acuosa se define como la relación entre las presiones parciales del vapor de agua de la muestra (p) y la del agua pura (p_0) a la misma temperatura:

$$a_w = \frac{p}{p_0}$$

En muchas situaciones prácticas este factor determina la estabilidad de los alimentos o la contaminación. De esta manera, el conocimiento de su influencia sobre las especies fúngicas hace posible la predicción tanto de la vida media de los alimentos como del tipo de micota contaminante.

Los hongos capaces de crecer a a_w por debajo de 0,85 son denominados xerofílicos (Pitt y Hocking, 1997). En el caso de *A. ochraceus* se ha observado crecimiento a a_w tan bajas como 0,77-0,80 (Pitt y Hocking, 1997; Ramos *et al.*, 1998; Suárez-Quiróz *et al.*, 2004). En *P. verrucosum* se ha descrito un mínimo de a_w de 0,80 para el crecimiento (Cairns-Fuller *et al.*, 2005).

Dentro de las especies de la sección *Nigri*, se detectó germinación de algunas cepas de *A. niger* a valores de actividad de agua de 0,77-0,80 (Pitt y Hocking, 1997; Marín *et al.*, 1998). Vujanovic *et al.* (2001) detectaron crecimiento lento a 0,76, sin embargo otros autores determinaron que el mínimo valor para el crecimiento era 0,82 (Parra y Magan,

2004). En relación a *A. carbonarius* el valor mínimo de a_w descrito para el crecimiento es de 0,88-0,90 (Joosten *et al.*, 2001; Mitchell *et al.*, 2004).

El límite de a_w para la producción de toxina siempre está por encima del valor que limita el crecimiento. *A. ochraceus* produce OTA a partir de 0,83 a 0,90 de a_w dependiendo de la cepa, con un óptimo de 0,95 a 0,99 a_w (Northolt *et al.*, 1979; Suárez-Quiróz *et al.*, 2004). *P. verrucosum* la produce a partir de 0,83 a 0,86 a_w (Northolt *et al.*, 1979; Cairns-Fuller *et al.*, 2005) con una producción máxima de 0,90-0,99 de acuerdo al sustrato (Northolt *et al.*, 1979; Arroyo *et al.*, 2005; Cairns-Fuller *et al.*, 2005). *A. niger* produce la toxina por encima de 0,90-0,95 dependiendo de la cepa, con una óptima producción a actividad de agua mayor a 0,98 (Bellí *et al.*, 2004b). *A. carbonarius* produce OTA con una a_w superior a 0,93 (Bellí *et al.*, 2004b). La producción máxima de la toxina se observó en el rango de a_w de 0,95-0,99 cuando las cepas fueron incubadas en medio sintético similar a uvas (Bellí *et al.*, 2004b; Mitchell *et al.*, 2004) y a 0,99 en granos de café (Joosten *et al.*, 2001).

El tipo de soluto utilizado para disminuir la actividad de agua del medio de cultivo puede influir en el crecimiento. Vaamonde y Fernández Pinto (1993) observaron este fenómeno cuando utilizaron glicerol y sacarosa como solutos para estudiar la influencia de la actividad acuosa en el crecimiento de *Eurotium herbariorum*. Sin embargo para *A. carbonarius*, Mitchell *et al.* (2004) no observaron diferencias significativas en las velocidades de crecimiento al utilizar medios con glucosa o glicerol en la mayoría de las condiciones ensayadas. Bellí *et al.* (2004a) no encontraron diferencias significativas entre ambos solutos aunque el crecimiento fue ligeramente mayor y la fase lag más corta con glucosa. De todas maneras, estos últimos autores utilizaron glicerol para los siguientes ensayos dado que la disolución de gran cantidad de glucosa produce ciertas dificultades experimentales.

Con sacarosa el valor mas bajo de a_w que puede lograrse en medios agarizados es 0,90; cuando se agregan concentraciones del carbohidrato superiores a 55 % P/P resultan medios muy viscosos que no gelifican bien y cristalizan. Por otro lado, el glicerol permite ajustar la a_w a los medios agarizados hasta 0,65 (Vaamonde y Fernández Pinto, 1993).

I.4.2. Temperatura

La temperatura de incubación utilizada en los ensayos *in vitro* o la temperatura de almacenamiento de los alimentos también determina la micota presente y la posible formación de toxinas. Como *P. verrucosum* es capaz de crecer a partir de los 0 °C y producir toxina a partir de los 4 °C (Pitt y Hocking, 1997), la presencia de OTA en climas fríos es asociada a esta especie. En cambio, en climas templados la producción de la toxina se ve relacionada a especies de género *Aspergillus*. *A. ochraceus* puede crecer entre los 8 y los 37 °C con el óptimo entre los 24-31 °C. *A. niger* puede crecer a partir de los 6-8 °C con una temperatura óptima de crecimiento de 35-37 °C (Pitt y Hocking, 1997). *A. carbonarius* crece en un rango de 15-40 °C (Mitchell *et al.*, 2004).

De la misma manera que ocurre con otros metabolitos secundarios, la temperatura óptima para el crecimiento fúngico difiere de la temperatura óptima para producción de las toxinas, además de ser más restringido el rango. Para *P. verrucosum* la temperatura óptima para la producción de OTA va desde los 20 a los 25 °C (Häggbloom *et al.*, 1985; Esteban, 2005), en cambio *A. ochraceus* produce la toxina a partir de los 12 °C (Norholt *et al.*, 1979; Pitt y Hocking, 1997) con un óptimo observado a 31 °C (Norholt *et al.*, 1979). Esteban *et al.* (2004) observaron que el rango de producción de OTA por cepas del agregado *A. niger* fue muy amplio, de 10 a 45 °C, de acuerdo a la cepa. La temperatura óptima estuvo entre los 20-25 °C. Por otro lado la temperatura óptima de producción de la toxina por *A. carbonarius* fue menor, entre los 15 y los 20 °C, pudiendo producirla entre los 15-40 °C (Esteban *et al.*, 2004; Mitchell *et al.*, 2004).

I.4.3. pH

Este factor también puede influir en el crecimiento y la producción de micotoxinas. Sin embargo, su efecto no parece ser tan limitante como el de los otros factores ambientales, por lo que se lo ha estudiado en modelos multifactoriales (Esteban, 2005).

El rango de pH descrito para el crecimiento de *P. verrucosum* es 2,1-10, pero el hongo produce OTA por encima de 3,5, con una producción óptima a pH cercano a 6 (Pitt y Hocking, 1997). Lai *et al.* (1970) observaron máxima biosíntesis de la toxina por *A.*

sulphureus a un pH de 6-6,3 en un rango estudiado de 3-7,8. En el caso de *A. ochraceus* el crecimiento fue observado entre 2,2 y 10 (Pitt y Hocking, 1997; Mühlencoert *et al.*, 2004), la producción de OTA entre 5,5 y 8,5, obteniéndose un máximo a pH 6,5 (Mühlencoert *et al.*, 2004). Esteban (2005) observó que tanto *A. niger* como *A. carbonarius* pueden crecer en un rango de pH de 2-10 y que la producción máxima de OTA fue de 5-10 y de 2-7 respectivamente, dependiendo de la temperatura y de la cepa estudiada.

I.4.4. Composición del sustrato

El sustrato es un factor determinante en el crecimiento y en la posible formación de micotoxinas, tanto en productos naturales como en medios sintéticos. Madhyastha *et al.* (1990) demostraron que *P. verrucosum* produjo mayor biomasa fúngica en trigo que en canola, maní, soja y maíz. En cuanto a la síntesis de OTA, observaron que fue superior en cereales que en leguminosas, y a su vez fue mayor en trigo que en maíz. Sin embargo para *A. ochraceus* la producción de la toxina se vio favorecida en maní y soja.

El tipo de componentes nutricionales de un sustrato ejerce un claro efecto sobre la producción de OTA. Así, un alto nivel de proteína, en especial de los aminoácidos prolina y ácido glutámico, aumentan la producción de OTA por *A. ochraceus* y *P. verrucosum* tanto en cebada como en medio sintético (Häggblom y Ghosh, 1985).

Las fuentes de carbono también influyen en la producción de OTA. Se observó mayor producción al utilizar glucosa o sacarosa que otros azúcares como la maltosa, manosa, galactosa, xilosa o arabinosa (Lai *et al.*, 1970). La concentración del azúcar utilizado también influye en la cantidad de toxina producida (Davis *et al.*, 1969; Mühlencoert *et al.*, 2004).

La concentración de sales minerales en el medio también influye en la producción de OTA ya que algunas especies fúngicas resultan particularmente sensibles a la disponibilidad de ciertos elementos traza que intervienen en reacciones metabólicas muy específicas (Esteban, 2005). Elementos traza como Fe, Zn, Cu, B y Mo no fueron necesarios para el buen crecimiento y producción de OTA por *A. sulphureus*, pero sí para *A. ochraceus*. La composición del medio afectó más a la síntesis de la toxina que al

crecimiento del micelio (Lai *et al.*, 1970). Mühlencoert *et al.* (2004) observaron que la adición de Zn al sustrato potenció la producción de OTA y también el crecimiento fúngico.

Kokonen *et al.* (2005) observaron que se producían distintas cantidades de OTA por *P. verrucosum* y *P. nordicum* según si era utilizado el medio Sacarosa Extracto de Levadura (YES), medio análogo de pan o de queso, y que en algunas combinaciones del sustrato con distintas cepas de la misma especie no había biosíntesis de la toxina. La concentración de la toxina producida por el agregado *A. niger* en medio YES fue mayor que en el Czapek Extracto de Levadura (CYA), por el contrario, cepas de *A. carbonarius* producen significativamente mayores cantidades de OTA en medio CYA que en YES (Bragulat *et al.*, 2001; Esteban *et al.*, 2004).

I.4.5. Agentes antimicrobianos

Los fungicidas convencionales son frecuentemente considerados un riesgo para la salud humana y el medioambiente (Cuppen *et al.*, 2000; Van den Brink *et al.*, 2000).

Carbendazim es un fungicida sistémico comúnmente usado en cultivos de tabaco, frutas y cereales. Este fungicida es usado para controlar las infecciones fúngicas en viñedos. Sin embargo, Tjamos *et al.* (2004) demostraron que la aplicación de carbendazim no fue efectiva para controlar la contaminación fúngica en los viñedos de Grecia. En un trabajo muy reciente, observaron que este fungicida no tiene efecto sobre el crecimiento de *A. carbonarius* pero incrementa la producción de OTA en el medio de cultivo ensayado (Medina *et al.*, 2007). Por lo tanto podría aumentar la producción de la toxina por *A. carbonarius* en el campo, con el consiguiente aumento de OTA en uvas y vinos.

Algunos compuestos naturales y sus derivados podrían ser utilizados como una alternativa a los agentes antifúngicos. Entre los bioinsecticidas, el *Bacillus thuringiensis* (denominado comúnmente *Bt*) ha sido usado en agricultura por mas de 50 años. *Bt* es usado para controlar a diversos insectos durante el cultivo de uvas para vinificación. Bae *et al.* (2004) observaron que *B. thuringiensis* inhibía el crecimiento in vitro de hongos filamentosos comunes en uvas, entre ellos *A. carbonarius* y la producción de OTA por este hongo. El empleo del *Bt* en vitivinicultura para controlar insectos en los viñedos podría constituir un control adicional en relación a los hongos toxicogénicos, si bien quedan

muchos aspectos que deberían ser estudiados para asegurar que su presencia no tenga un impacto negativo en relación a la calidad e inocuidad del vino (Bae *et al.*, 2004).

Numerosos estudios han demostrado las propiedades antimicrobianas de los aceites esenciales y otros extractos de plantas (Nychas, 1995; Cowan, 1999; Hammer *et al.*, 1999; Soliman y Badeaa, 2002; Nguefack *et al.*, 2004; Rassoli *et al.*, 2006). Varios estudios han mostrado un efecto inhibitorio de los metabolitos secundarios de plantas sobre la producción de micotoxinas. En el caso de la producción de aflatoxina por *A. flavus*, Huang *et al.* (1997) encontraron que extractos acuosos de semillas de maíz fueron capaces de inhibir la producción de toxina aunque tuvieron poco efecto sobre el crecimiento fúngico.

En los últimos años ha sido estudiada la capacidad antifúngica de compuestos fenólicos y derivados (Weidenbörner *et al.*, 1990; Norton *et al.*, 1999; Bakan *et al.*, 2003; Beekrum *et al.*, 2003; Mahoney y Molyneux, 2004; Martini *et al.*, 2004; López-Malo *et al.*, 2005). El término “fenólico” se refiere a cualquier compuesto con una estructura básica tipo fenol (hidroxibenceno). Los compuestos fenólicos se pueden dividir en tres grupos de acuerdo a su estructura química: no flavonoides o ácidos fenólicos, flavonoides y taninos.

Actualmente existe gran interés por los polifenoles que forman parte de la dieta debido a sus beneficiosas propiedades biológicas. Son potentes antioxidantes, capaces de capturar radicales libres y quelar metales. Inhiben la peroxidación de lípidos y son antiinflamatorios, anticancerígenos, antihipertensivos y antimicrobianos (Kanner *et al.*, 1994). Se ha comprobado que afectan el crecimiento y metabolismo de bacterias y pueden ser activadores o inhibidores del crecimiento microbiano de acuerdo a su estructura y concentración (Alberto *et al.*, 2001; Reguant *et al.*, 2000; Rodríguez Vaquero *et al.*, 2007).

Algunos estudios han indicado un efecto inhibitorio de los compuestos fenólicos sobre la producción de micotoxinas. Bakan *et al.* (2003) observaron que compuestos fenólicos presentes en el germen de maíz inhibían de la biosíntesis de tricotecenos por *F. graminearum*. Mallozzi *et al.*, (1996) encontraron que, de cuatro flavonoides estudiados, naringinina tiene el mayor efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *A. flavus*, y que la producción de aflatoxina B₁ es inhibida por canferitrina, mientras que la quercetina fue el compuesto que demostró poseer menor actividad inhibitoria.

En ciertos productos agrícolas de gran importancia para la dieta humana (cereales, nueces) se ha observado una correlación entre la resistencia de algunos cultivares a la

contaminación con micotoxinas y el contenido de compuestos fenólicos de los mismos (McKeehen *et al.*, 1999; El Modafar *et al.*, 2000; Siranidou *et al.*, 2002).

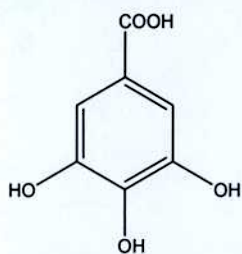
Las uvas y los vinos tienen una gran variedad de compuestos fenólicos (Vinson *et al.*, 2001). Dentro de los no flavonoides están los derivados del ácido cinámico, como el ácido cafeico, y los derivados del ácido benzoico, como por ejemplo el ácido gálico. Dentro de los flavonoides se encuentran los compuestos quercetina, rutina (quercetina-3-O-rutinósido) y catequina (Figura I.3). Las cantidades y tipos de compuestos fenólicos presentes en uvas y vinos dependen de la variedad de uva, el almacenamiento y el proceso de vinificación. Para los vinos tintos la concentración de compuestos fenólicos totales varía de 1800 a 4059 expresados como miligramos por litro de equivalentes de ácido gálico (GAE), promediando 2567 mg/l (Frankel *et al.*, 1995). En las uvas la mayoría de los compuestos fenólicos son flavonoides (80 %), siendo las catequinas los más significativos. El mayor ácido fenólico en uvas es el ácido gálico, en vinos tintos se encuentra en alrededor de 95 mg/l (Frankel *et al.*, 1995).

Baydar *et al.*, 2004 describieron que extractos de semillas de uva inhibieron el crecimiento de 15 bacterias y lo atribuyeron a su composición fenólica. Entre los flavonoides, la quercetina (forma aglicona) es más efectiva que la rutina (forma glicosídica). Ambas son inhibidoras del crecimiento de diversas bacterias. El efecto antimicrobiano de estos compuestos podría ser explicado por adsorción a las membranas celulares, interacción con enzimas y capacidad secuestrante de iones metálicos esenciales para el crecimiento microbiano (Scalbert, 1991).

Mahoney y Molyneux (2004) estudiaron el potencial de taninos hidrolizables presentes en diversos cultivares de nuez para conferir resistencia a la colonización y crecimiento por *Aspergillus* o evitar la síntesis de aflatoxina. Estos taninos pueden ser hidrolizados por enzimas fúngicas, liberando principalmente ácido gálico, que demostró ser un potente inhibidor de la síntesis de aflatoxina. La regulación de los niveles de ácido gálico en los taninos hidrolizables, ya sea por métodos convencionales de crecimiento o por programas de mejoramiento genético, podrían permitir la obtención de cultivares con alta resistencia a la aflatoxicogénesis.

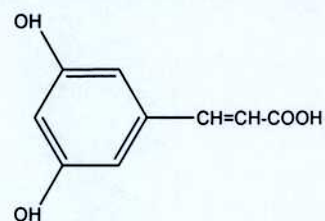
No flavonoides

Derivado del ácido hidroxibenzoico



Ácido gálico

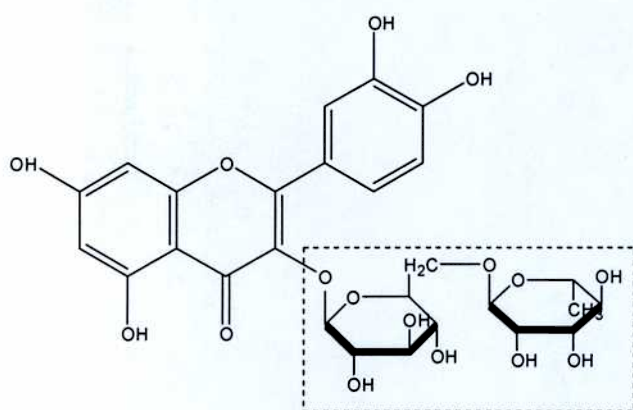
Derivado del ácido hidroxicinámico



Ácido cafeico

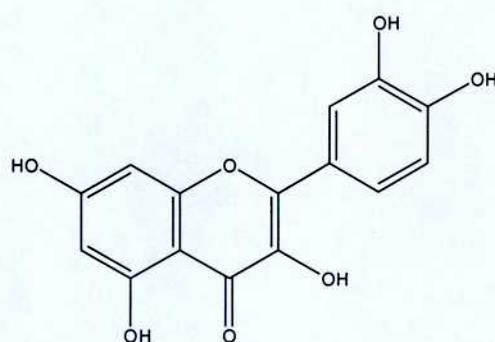
Flavonoides

Flavonoles



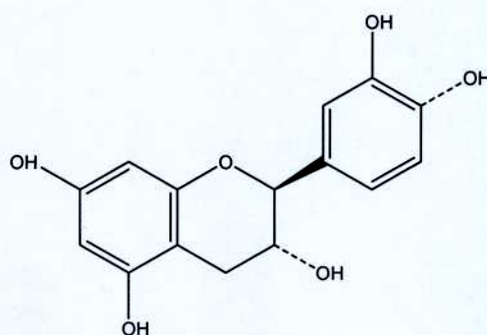
Rutinósido

Rutina



Quercetina

Flavanol



Catequina

Figura I.3: Estructura química de compuestos fenólicos.

I.4.6. Otros factores

I.4.6.1. Microorganismos

El crecimiento conjunto de determinadas especies fúngicas en un sustrato, puede influir de forma significativa en el crecimiento y en la producción de OTA. Lee y Magan (2000) estudiaron en granos de maíz las interacciones interespecíficas entre *A. ochraceus* y otros hongos contaminantes comunes de este sustrato. Estos autores observaron que algunas cepas inhibieron significativamente el crecimiento de *A. ochraceus* a altas y óptimas condiciones de temperatura y actividad de agua. Esas interacciones resultan en una significativa reducción del contenido de ocratoxina. Valero *et al.* (2006) estudiaron el efecto de las interacciones fúngicas, bajo diferentes condiciones ambientales, sobre la producción de OTA por *A. carbonarius*. En este trabajo fue observado que a 30°C la micota competitiva actúa como un factor de control adicional contra la acumulación de la toxina, pero a 20°C, cuando la producción de OTA es óptima, esto no ocurre y se puede observar inhibición o estimulación de la biosíntesis de OTA de acuerdo la especie fúngica con la cual interactúa *A. carbonarius*.

I.4.6.2. Insectos

La presencia de insectos en sustratos naturales puede facilitar la colonización fúngica y la consiguiente producción de toxina. Además del daño físico que producen, pueden diseminar conidios de especies fúngicas. Vega y Mercadier (1998) encontraron que entre el 5 y 17 % de *Hypothenemus hampei*, un insecto plaga de los granos de café, estaban infectados con *A. ochraceus* y que éstos actuaban como vectores de dicha especie fúngica.

I.4.6.3. Composición de la atmósfera

El crecimiento fúngico de *A. ochraceus* y *Penicillium verrucosum* es menos afectada por la composición de la atmósfera que la producción de ocratoxina A (Paster *et al.*, 1983; Cairns-Fuller *et al.*, 2005). Paster *et al.* (1983) observaron que porcentajes de CO₂ mayores

al 30 % inhiben la producción de OTA por *A. ochraceus*, independientemente del nivel de O₂ presente. La producción de OTA sobre granos de trigo por *P. verrucosum* fue inhibida más del 75 % con una concentración de 50 % de CO₂ (Cairns-Fuller *et al.*, 2005).

I.4.6.4. Tiempo de incubación

La cantidad de toxina que puede encontrarse en el sustrato está condicionada por el tiempo de incubación. Aunque su efecto varía de acuerdo a la cepa, se detectaron niveles altos después de 7 días de incubación por *A. melleus* y *A. albertensis* y a los 10 días por el agregado *A. niger*, *A. carbonarius* y *Penicillium verrucosum* (Esteban, 2005). Bellí *et al.* (2004b) encontraron máxima producción a los 5 días para *A. carbonarius* y de 7 a 13 días para *A. niger*. A 15 °C el máximo nivel de OTA producida por *A. carbonarius* fue observado a los 30 días de incubación. A otras temperaturas la mayor concentración de OTA fue observado a diferentes tiempos de incubación dependiendo de la cepa (Esteban *et al.*, 2004).

I.4.7. Interacción de factores

Si bien se fueron considerando los factores por separado es importante mencionar que puede existir interacción entre los mismos. Por ejemplo los requerimientos de agua de los hongos dependen de otras variables como la temperatura y el sustrato (Esteban, 2005). La *a_w* óptima para la producción de OTA dependió del sustrato, en cepas de *A. carbonarius* incubadas en medio sintético similar a uvas se observó en el rango 0,95-0,99 (Bellí *et al.*, 2004b; Mitchell *et al.*, 2004), sin embargo en granos de café el máximo de producción se observó a 0,99 (Joosten *et al.*, 2001). También se ha descrito una interacción significativa entre la temperatura de incubación y el pH del sustrato donde se desarrolla el hongo (Esteban, 2005).

I.5. Objetivos del presente trabajo

Desde que fue descubierta la capacidad de *Aspergillus* de la sección *Nigri* para producir ocratoxina A en diversos productos, este importante grupo de hongos cobró una nueva dimensión como contaminantes de alimentos.

Estudios previos demostraron que *A. carbonarius* es un componente habitual de la micota de pasas de uvas. Teniendo en cuenta el carácter xerófilo de otros miembros de la sección *Nigri* y la posibilidad de su prevalencia en alimentos de baja actividad acuosa, se consideró de interés estudiar la influencia de la actividad de agua y la temperatura sobre el crecimiento y la biosíntesis de OTA por *A. carbonarius*.

Las uvas y los vinos contienen una gran cantidad de compuestos fenólicos que, según algunas investigaciones recientes, parecen tener influencia sobre la producción de diversas micotoxinas, por lo cual también se incluyó en este trabajo el estudio del efecto de estos compuestos naturales en relación a la producción de OTA por *A. carbonarius*.

En consecuencia los objetivos del presente trabajo fueron:

- Estudiar el efecto combinado de la actividad acuosa y la temperatura sobre el crecimiento de *Aspergillus carbonarius* y la producción de ocratoxina A.
- Determinar el efecto de compuestos fenólicos presentes en las uvas sobre el crecimiento de *Aspergillus carbonarius* y la producción de ocratoxina A.



Materiales y métodos

II. MATERIALES Y MÉTODOS

II.1. Selección y caracterización de las cepas de *A. carbonarius* productoras de OTA

II.1.1. Selección de las cepas

Se utilizaron 4 cepas de *A. carbonarius* ocratoxicogénicas aisladas a partir de pasas de uva en un trabajo previo (Romero *et al.*, 2005). Las cepas denominadas A, B y C fueron aisladas de muestras de Catamarca y la D de una muestra proveniente de San Juan. La selección se realizó de modo de tener cepas de distinto origen geográfico y con variada producción de OTA.

II.1.2. Caracterización de las cepas

II.1.2.1. Crecimiento

Medio de cultivo: El crecimiento fue determinado en placas de Petri de 9 mm de diámetro con Agar Czapek Extracto de Levadura (CYA) (Apéndice 2).

Preparación del inóculo: las cepas se sembraron en tubos inclinados de Agar Extracto de Malta (MEA) (Apéndice 2) y se incubaron 7 días a 25 °C para obtener cultivos bien esporulados. Se recolectaron con un ansa en ángulo recto las esporas de cada cepa y se colocaron en 10 ml de una solución acuosa al 0,05 % de Tween 80 estéril. Luego de homogenizar las suspensiones 30 segundos en vórtex se realizaron los recuentos de esporas mediante una cámara de Neubauer. Bajo estas condiciones las concentraciones de los inóculos variaron entre 1 y $3 \cdot 10^6$ esporas.ml⁻¹. Se preparó también un inóculo mixto con las cuatro cepas según la técnica de Hocking y Miscamble (1995) con algunas modificaciones. Se tomó 1 ml de las suspensiones de esporas de cada cepa y se las mezcló en un único tubo de ensayo, homogenizando en vórtex como fue anteriormente descrito.

Inoculación e incubación: Las placas de CYA se inocularon centralmente con la suspensión de esporas, con un ansa calibrada de 1 µl y se incubaron en oscuridad a 30 °C. Las placas se colocaron dentro de bolsas de polietileno para mantener un nivel de humedad relativa constante.

Medición del crecimiento: se midieron periódicamente dos diámetros perpendiculares de las colonias (8 placas para cada cepa) hasta que las mismas alcanzaron el borde de la placa. La velocidad de crecimiento (mm.día^{-1}) para cada placa fue calculada a partir de la curva de regresión lineal del diámetro de la colonia en función del tiempo, con el programa Microsoft® Excel 2002. La fase lag fue determinada como la ordenada a la abcisa de las rectas de velocidad de crecimiento.

Estas mediciones se realizaron para cada cepa por separado, así como para el inóculo mixto.

II.1.2.2. Producción de OTA

Muestras: la producción de ocratoxina A fue analizada por triplicado a los 7, 14, 21 y 28 días de incubación a 30 °C a partir de placas de CYA sembradas como fue descrito en II.1.2.1.

Extracción de OTA: se realizó siguiendo el método de Bragulat *et al.* (2001). Se tomaron con sacabocado tres trozos de agar de 5 mm de diámetro (“plugs”) del centro de la colonia y se pesaron en un tubo eppendorf. La toxina se extrajo con 0,5 ml de metanol durante 1 hora a 250 r.p.m. en agitador mecánico. La limpieza de los extractos se realizó por filtración a través de filtros de jeringa (CAMEO® 17N 0,22 μm) directamente a viales ámbar. Los viales fueron almacenados a 4 °C hasta el análisis.

Análisis de OTA: la detección y cuantificación fue realizada por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) con un cromatógrafo Shimadzu LC-CA (Shimadzu, Kyoto, Japón) equipado con un inyector automático (SIL-6B/9A) y un detector de fluorescencia Shimadzu RF-10Axl (excitación: 330 nm; emisión: 460 nm). Se utilizó una columna analítica C18 Júpiter de 4,6 x 250 mm y 5 μm de tamaño de partícula (Phenomenex, USA). La fase móvil utilizada fue acetonitrilo, agua y ácido acético (57:41:2) con una velocidad de flujo de 1 ml.min^{-1} . Se inyectaron 20 μl de cada extracto. Los extractos que presentaban un tiempo de retención idéntico al del estándar de OTA (alrededor de 5,8 minutos) se consideraron positivos. La confirmación de los extractos, en caso de duda, se realizó por co-inyección con el estándar.

La OTA fue cuantificada a través de una curva de calibración construida por comparación de la respuesta fluorométrica (área del pico) producida por cinco soluciones preparadas a partir del estándar. Para la preparación del estándar se disolvió ocratoxina A (Sigma-Aldrich) en metanol y se confirmó la concentración por un espectrofotómetro UV (AOAC, 2000).

El límite de detección fue de 0,02 ng y el de cuantificación mediante la técnica de extracción utilizada fue de 0,05 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de medio de cultivo.

Todos los solventes utilizados fueron de grado HPLC.

II.1.3. Diseño experimental y tratamiento estadístico de los datos

Las velocidades de crecimiento, fase lag y las concentraciones de OTA detectadas a cada condición fueron evaluadas por análisis de varianza usando el paquete de software estadístico Statistix versión 8.1. Las comparaciones entre las medias de los distintos tratamientos se efectuaron mediante un test de Tukey a un nivel de significación del 5 %.

II.2. Influencia de la actividad de agua y la temperatura sobre el crecimiento y producción de OTA por *A. carbonarius*.

II.2.1. Crecimiento

Medio de cultivo: El medio base utilizado fue CYA con el agregado de distintas proporciones de glicerol 87% (Merck) para obtener actividades de agua de 0,80; 0,825; 0,85; 0,87; 0,89; 0,90; 0,925 y 0,95. Las cantidades de glicerol agregadas fueron determinadas previamente a través de una curva experimental obtenida a partir de la a_w medida de diferentes concentraciones de glicerol en el rango de estudio. Antes de la siembra del inóculo se determinó la actividad de agua del medio de cultivo con un higrómetro Aqualab (Decagon Devices CX3 02734) con una precisión de $\pm 0,002$.

Preparación del inóculo: el inóculo mixto se realizó como fue descrito en II.1.2.1. con una solución estéril de Tween 80 ajustada con glicerol al nivel de a_w a ensayar.

Inoculación e incubación: las placas se inocularon como se describió en II.1.2.1 y se incubaron a cinco temperaturas diferentes (15, 20, 25, 30 y 35 °C) en bandejas dentro de bolsas de polietileno. En cada caso se incluyeron en las mismas bandejas recipientes conteniendo una solución de a_w ajustada con glicerol de idéntico nivel que el medio inoculado (Patriarca, 2004). Estas soluciones fueron renovadas diariamente.

Medición del crecimiento: se midieron periódicamente dos diámetros perpendiculares de las colonias (5 placas para cada condición) hasta un máximo de 100 días. La velocidad de crecimiento (mm.día^{-1}) y la fase lag fueron obtenidas como en II.1.2.1.

II.2.2. Producción de OTA

Muestras: la producción de ocratoxina A fue analizada por triplicado a los 7, 14, 21 y 28 días de incubación, en todas las combinaciones de a_w y temperatura, a partir de las placas de CYA sembradas como fue descrito en II.2.1.

Extracción y análisis de OTA: se realizó como fue descrito en II.1.2.2.

II.2.3. Diseño experimental y tratamiento estadístico de los datos

Crecimiento: para las velocidades de crecimiento y fase lag a las diferentes temperaturas y niveles de a_w se utilizó un diseño factorial totalmente aleatorizado por quintuplicado. El efecto de la a_w , temperatura y su interacción fue evaluado mediante un análisis de varianza usando el paquete de software estadístico Statistix versión 8.1. Las comparaciones entre las medias de los distintos tratamientos se efectuaron mediante un test de Tukey a un nivel de significación del 5 %.

Producción de OTA: las concentraciones de OTA detectadas en cada condición fueron sometidas a un análisis de varianza de tres factores, con un diseño factorial balanceado, empleando el paquete de software estadístico Statistix versión 8.1. Las comparaciones entre las medias de los distintos tratamientos se efectuaron mediante un test de Tukey a un nivel de significación del 5 %.

II.3. Efecto de compuestos fenólicos sobre el crecimiento y producción de OTA por *A. carbonarius*

II.3.1. Crecimiento

Medio de cultivo:

a) Polifenoles totales de vino Merlot

El crecimiento fue determinado en placas de Petri de 9 mm de diámetro con CYA al cual se le incorporó un concentrado de vino Merlot. El concentrado fue obtenido a partir del vino en un evaporador rotatorio. La mitad del concentrado fue clarificado con 12,7 g de carbón activado cada 100 ml, mediante este procedimiento se eliminan los compuestos fenólicos del vino. Todos los extractos fueron esterilizados por filtración con filtros de membrana de 0,22 μm .

Al concentrado sin clarificar se le realizó la determinación colorimétrica de los compuestos fenólicos totales por el método de Folin-Ciocalteu (Singleton y Rossi, 1965) con algunas modificaciones. A 0,5 ml de la muestra se añadió 2,5 ml del reactivo de Folin-Ciocalteu (mezcla de los ácidos fosfotúngstico y fosfomolibdico, Sigma) y luego 2 ml de una solución saturada de carbonato de sodio. Se incubó 2 h a 24 °C y la absorbancia fue leída a 725 nm. En paralelo se realizó el mismo procedimiento utilizando agua destilada como blanco. Las determinaciones fueron realizadas por duplicado y cuantificadas a través de una curva de calibración con ácido gálico. Como dicho compuesto es el estándar utilizado para el análisis de fenólicos totales, los valores obtenidos se expresan en equivalentes de ácido gálico (GAE). El ácido gálico muestra una respuesta lineal en el rango de 0,5 a 50 mg.l^{-1} con un coeficiente de correlación de 0,999.

Se observó el crecimiento de *A. carbonarius* en tres tratamientos: uno con el extracto de vino agregado al medio CYA fundido, de forma tal de obtener una concentración de 4000 mg.l^{-1} de GAE en la placa, otro con igual volumen del extracto clarificado y un tercero con el mismo volumen de agua para ser utilizado como control.

b) Compuestos fenólicos puros

El crecimiento fue determinado en placas de Petri de 9 mm de diámetro con CYA al cual se le incorporaron los compuestos fenólicos en solución etanólica. Dichos compuestos se agregaron estérilmente a 200 ml del medio de cultivo fundido, disueltos en

2 ml de etanol absoluto para análisis (Merck) con excepción del ácido gálico, que fue agregado disuelto en 10 ml. Se ensayaron ácido gálico en concentraciones de 100, 200, 300 y 500 mg.l⁻¹ y ácido cafeico a 50, 250 y 500 mg.l⁻¹. Los flavonoides quercetina y rutina se estudiaron a 50, 100, 250 y 500 mg.l⁻¹ y catequina a 50, 1000 y 2000 mg.l⁻¹. Ácido gálico fue obtenido de Merck, catequina de Sigma y ácido cafeico, quercetina y rutina de ICN. Como control se utilizó el medio de cultivo con la misma cantidad de etanol absoluto sin los compuestos fenólicos.

Preparación del inóculo, inoculación e incubación: de la misma manera que en la sección II.1.2.1 para un inóculo mixto.

Medición del crecimiento: se midieron periódicamente dos diámetros perpendiculares de las colonias (8 placas por tratamiento) hasta que las mismas alcanzaron el borde de la placa o hasta 30 días. La velocidad de crecimiento y el lag fueron obtenidas como en II.1.2.1.

II.3.2. Producción de OTA

Muestras: la producción de ocratoxina A fue analizada por duplicado a los 7, 14, 21 y 28 días de incubación a partir de las placas sembradas como fue descrito en II.3.1.

Extracción y análisis de OTA: se realizó como fue descrito en II.1.2.2.

II.3.3. Diseño experimental y tratamiento estadístico de los datos

Crecimiento y producción de OTA: los datos fueron analizados por medio de un análisis de varianza empleando el paquete de software estadístico Statistix versión 8.1. Las comparaciones entre las medias de los distintos tratamientos se efectuaron mediante un test de Tukey a un nivel de significación del 5 %.



Resultados y Discusión

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

III.1. Selección y caracterización de las cepas de *A. carbonarius* productoras de OTA

Entre los numerosos factores que influyen sobre la producción de micotoxinas se debe tener en cuenta la cepa fúngica dado que la velocidad de crecimiento y la capacidad toxicogénica de los diferentes aislamientos es variable (Norholt, 1979; Bellí *et al.*, 2005; Leong *et al.*, 2006). Para minimizar el efecto de la cepa estudiada, no sólo en relación a la producción de micotoxinas sino también a otros aspectos de la fisiología de los hongos, algunos autores han propuesto el empleo de inóculos mixtos integrados por suspensiones de esporas de diferentes aislamientos de la misma especie (Gibson *et al.*, 1994; Hocking y Miscamble, 1995).

A fin de evaluar esta metodología, la primera etapa del presente trabajo consistió en comparar la velocidad de crecimiento y la producción de ocratoxina A por 4 cepas de *A. carbonarius* y un inóculo mixto formado por las mismas cepas. Se usó el medio de cultivo CYA en el cual se observa un buen crecimiento del hongo y también una óptima producción de toxina en comparación con otros medios (Bragulat *et al.*, 2001; Esteban *et al.*, 2004).

III.1.1. Crecimiento y fase lag

La mayor velocidad de crecimiento observada fue de 15,79 mm.día⁻¹ para la cepa C y la menor 14,70 mm.día⁻¹ para la cepa A. El análisis de varianza muestra que la cepa utilizada influye significativamente sobre la velocidad de crecimiento de *A. carbonarius* observada (Tabla 16, Apéndice 4). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre el inóculo mixto y las cepas por separado (Tabla III.1). Los resultados calculados para cada placa se encuentran en el Apéndice 3, Tabla 1.

La cepa C si bien presenta la mayor velocidad de crecimiento es la que tiene la mayor fase lag de las 4 cepas ensayadas, mientras que en el caso de la cepa A pudo observarse lo contrario. La fase lag del inóculo mixto coincide con el mayor valor observado, que es de

0,45 días para la cepa C. Las cepas A y D resultaron ser las de menor fase lag y los valores difieren significativamente del obtenido cuando fueron sembradas todas las cepas simultáneamente. Estos resultados podrían evidenciar la ocurrencia de interacciones miceliarias entre las cepas. La interacción no está restringida solamente a la confrontación entre individuos de distintas especies sino que también ocurre entre aquellos de una misma especie (Cooke y Whipps, 1993).

Tabla III.1. Velocidad de crecimiento y fase lag de cuatro cepas de *A. carbonarius* (A, B, C y D) e inóculo mixto (A+B+C+D). Valores con distintas letras son significativamente diferentes ($p = 0,05$).

	velocidad (mm.día ⁻¹)	lag (días)
A	14,70 ^b	0,26 ^b
B	15,23 ^{ab}	0,33 ^{ab}
C	15,79 ^a	0,45 ^a
D	14,96 ^b	0,28 ^b
A+B+C+D	15,42 ^{ab}	0,45 ^a

III.1.2. Producción de OTA

La producción de OTA a 7, 14, 21 y 28 días se observa en la Figura III.1. Los datos de cada uno de los triplicados se encuentran detallados en la Tabla 3 del Apéndice 3. La cepa C resultó ser la mayor productora de OTA en todos los tiempos de incubación analizados. Las cepas B y D tienen una producción de OTA máxima a los 21 días pero no se encontró tiempo máximo de producción de toxina para las cepas A y C en el rango de tiempo del ensayo. La menor cantidad de toxina (0,68 µg/g) fue producida por la cepa D a los 7 días, mientras que C produjo 7,25 µg/g a los 28 días de incubación.

Los valores hallados de producción de OTA del inóculo mixto en cada tiempo son intermedios a los de cada cepa por separado. El uso de una suspensión de esporas de distintas cepas para disminuir la variación que podría esperarse entre diferentes

aislamientos para el crecimiento (Gibson *et al.*, 1994; Hocking y Miscamble, 1995) resultó ser adecuado también para la producción de OTA por los *A. carbonarius* estudiados.

Los resultados de estos ensayos preeliminares justifican el empleo de esta metodología para estudiar el efecto de parámetros ambientales sobre el crecimiento y producción de OTA por cepas autóctonas de *A. carbonarius*.

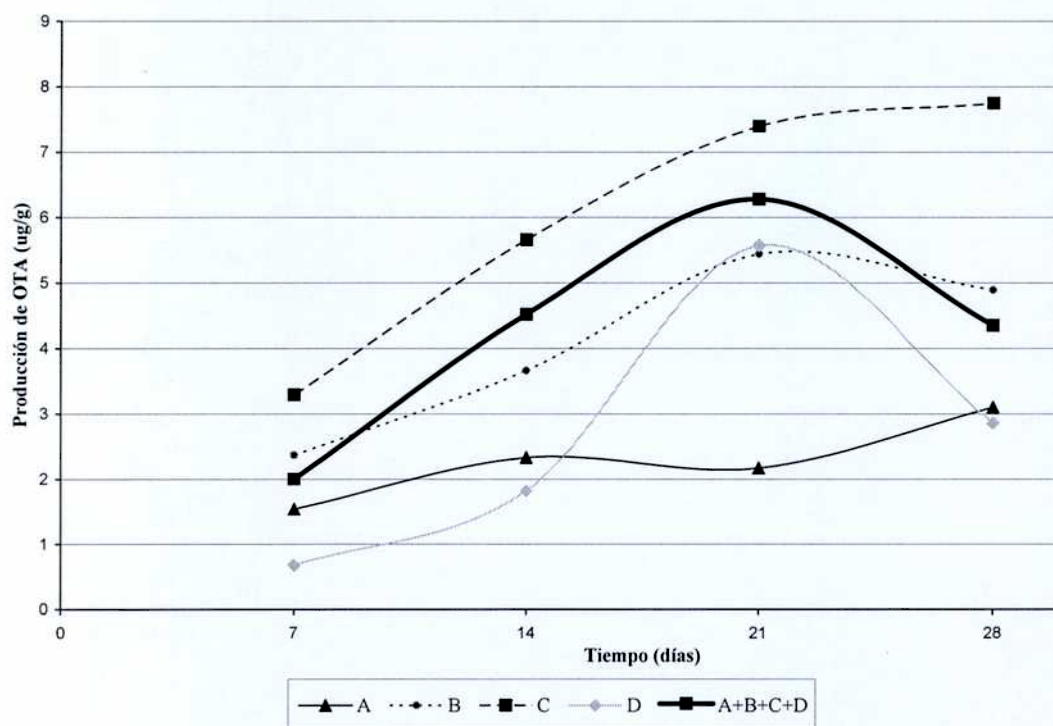


Figura III.1: Producción de OTA de las cepas A, B, C y D, y del inóculo mixto (A+B+C+D) a los 7, 14, 21 y 28 días de incubación.

III.2. Influencia de la actividad de agua y la temperatura sobre el crecimiento de *A. carbonarius*

La ecofisiología de *A. carbonarius* ha sido motivo de estudio en los últimos años, desde que se demostró que este hongo es el principal responsable de la contaminación con ocratoxina A en uvas y derivados (Cabañes *et al.*, 2002). Los factores ambientales más importantes que condicionan el crecimiento fúngico son la actividad de agua y la temperatura. En el presente trabajo se utilizó un experimento de diseño factorial para estudiar el efecto de estos factores y su interacción sobre el crecimiento de un inóculo mixto de cepas autóctonas de *A. carbonarius* productoras de OTA. La influencia de la actividad acuosa sobre el crecimiento se estudió en sistema modelo a los niveles de 0,80; 0,825; 0,85; 0,89; 0,90; 0,925; 0,90 y a 0,95. Los niveles de temperatura fueron 15, 20, 25, 30 y 35 °C.

El análisis de varianza muestra que la a_w , temperatura y su interacción tienen una influencia significativa sobre la velocidad de crecimiento de *A. carbonarius* (Tabla 19, Apéndice 4).

Los efectos combinados de a_w y temperatura sobre el crecimiento pueden observarse en la Figura III.2. La máxima velocidad de crecimiento en las condiciones estudiadas (17,46 mm.día⁻¹) fue observada a a_w de 0,95 y 30 °C. Este valor es mayor que otros encontrados en la literatura; Bellí *et al.* (2005) observaron una velocidad máxima de 10,1 mm.día⁻¹ para un aislamiento de España a 30 °C y a a_w de 0,99; Bellí *et al.* (2004b) encontraron que la máxima velocidad de crecimiento era de 9,11 mm.día⁻¹ a 30 °C y a a_w de 0,98 para un aislamiento de uvas europeas para vinificación. Leong *et al.* (2006) informaron que el crecimiento más rápido de una cepa australiana de *A. carbonarius* fue a 30 °C y a_w 0,965 pero la máxima velocidad de crecimiento registrada fue de 7 mm.día⁻¹. Estas diferencias pueden ser atribuidas a la variedad intraespecífica y regional entre aislamientos.

No se observó crecimiento a a_w por debajo de 0,85, lo cual sugiere que la a_w limitante para el crecimiento de *A. carbonarius* es muy cercana a ese valor. A a_w 0,85 el hongo solamente creció a 30 y 25 °C, siendo esta última condición el valor más bajo de velocidad de crecimiento registrado (0,47 mm.día⁻¹). Mitchell *et al.* (2004) encontraron que el

crecimiento de *A. carbonarius* fue considerablemente inhibido a una a_w de 0,88 a_w para la mayoría de las cepas estudiadas.

En el rango de a_w analizado la velocidad de crecimiento aumenta con el incremento de la a_w y la tolerancia a bajas actividades acuosas fue encontrada a temperaturas cercanas a la óptima. Si bien no se encontró un nivel de actividad de agua óptimo para el crecimiento en todas las condiciones estudiadas, a 30 °C se dispone del resultado obtenido en la sección III.1.1 con el medio de cultivo CYA que tiene un valor de a_w de 0,99 (dato obtenido experimentalmente). La velocidad de crecimiento observada para el inóculo mixto fue de 15,42 mm.día⁻¹, menor que el obtenido a 0,95 (17,46 mm.día⁻¹). Estos datos concuerdan con los de otros autores que encontraron crecimiento óptimo en el rango de a_w de 0,95–0,99 (Bellí *et al.* 2004a y 2005). Sin embargo Mitchell *et al.* (2004) encontraron que la a_w óptima variaba 0,93-0,987 dependiendo de la cepa.

La mayor velocidad de crecimiento fue observada a 30 °C en todos los niveles de a_w ensayados, aunque 25 °C también resultó ser una temperatura muy favorable. Resultados similares fueron encontrados en un medio sintético que simula la composición de uvas por Bellí *et al.* (2004a y 2005) y Leong *et al.* (2006), aunque Bellí *et al.* (2005) también observaron que unos pocos aislamientos crecieron más rápido a 35 o 25 °C a algunos valores de a_w .

A 15 °C sólo hubo crecimiento a los mayores niveles de a_w ensayados (0,925 y 0,95) con una velocidad de crecimiento de 3,82 y 5,57 mm.día⁻¹ respectivamente. Estos resultados concuerdan con aquellos informados por Bellí *et al.* (2004a y 2005) y Mitchell *et al.* (2004).

En relación a la fase lag de *A. carbonarius* el análisis estadístico de varianza muestra que todos los efectos (a_w , temperatura y su interacción) fueron significativos (Tabla 20, Apéndice 4).

La influencia de la a_w y la temperatura sobre la fase lag se observa en la Figura III.3. En el Apéndice 4 (Tabla 5) se presentan los datos calculados para cada placa en las diferentes condiciones estudiadas. La fase lag más corta, 0,26 días (cerca de 6 h), fue encontrada a a_w de 0,925 y 35 °C. Fueron observadas fases lag de menos de un día también a a_w 0,95 y 35 °C (0,6 días) y a 0,925 y 30 °C (0,8 días).

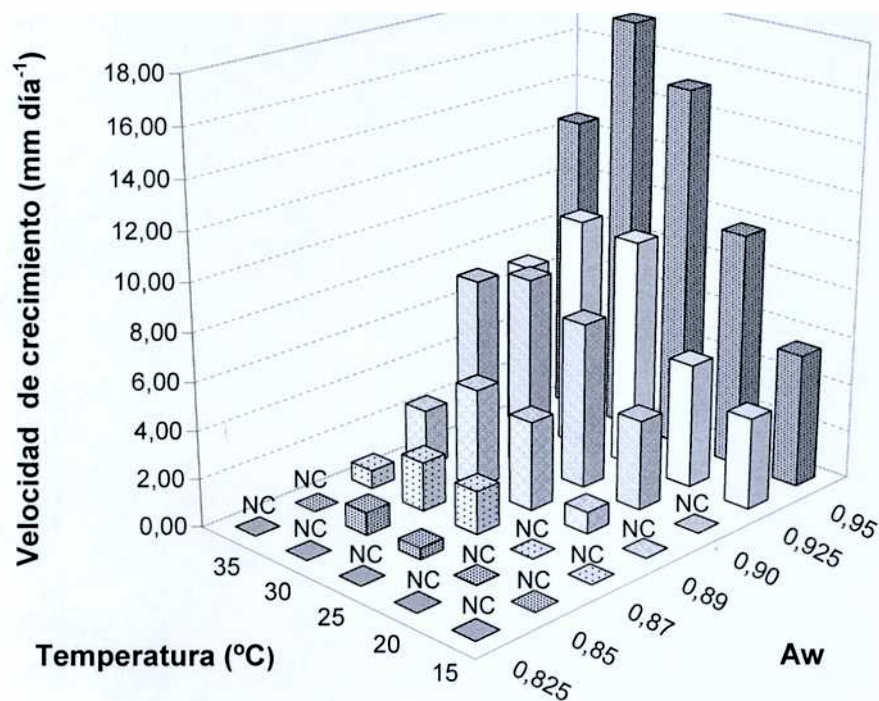


Figura III.2. Efecto de la a_w y la temperatura sobre el crecimiento de *A. carbonarius*. (NC: no creció).

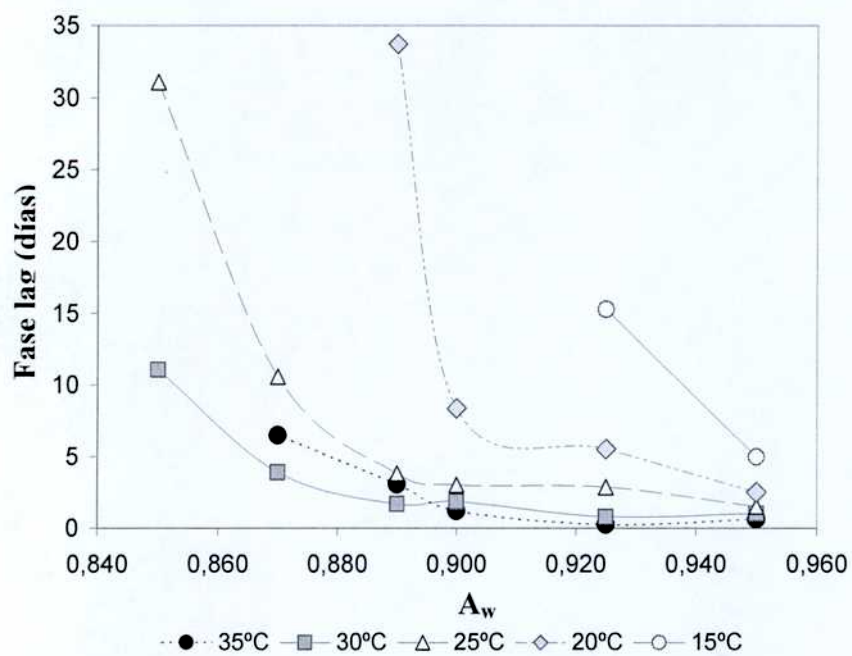


Figura III.3. Efecto de la a_w y la temperatura sobre la fase lag de *A. carbonarius*.

Aunque 30 °C fue la temperatura a la cual se observó mayor velocidad de crecimiento, se observaron fases lag mas cortas a 35 °C que a 30 °C para $a_w \geq 0,90$. En condiciones marginales de a_w y temperatura la fase lag se incrementó, siendo la mayor registrada a 20 °C y a_w de 0,89 (33,7 días).

El efecto de la a_w sobre la fase lag fue mayor a temperaturas menores. Una disminución en la temperatura de 30 °C a 25 °C, a a_w de 0,90, produjo un incremento de la fase lag en 1,2 días, mientras que a a_w de 0,85 el mismo cambio de temperatura llevó a un aumento de la fase lag en alrededor de 20 días. Este comportamiento también fue observado por Pardo *et al.* (2004 y 2005) para *A. ochraceus*.

El efecto de los factores ambientales sobre el crecimiento de cepas argentinas de *A. carbonarius* fue similar a lo observado en cepas de Europa, Israel (Bellí *et al.*, 2005; Mitchell *et al.*, 2004) y Australia (Leong *et al.*, 2006), aunque en el presente trabajo se encontraron mayores velocidades de crecimiento posiblemente debido a la variabilidad entre las cepas fúngicas o al medio de cultivo utilizado. Las cepas aisladas de pasas de uva usadas en el presente trabajo mostraron una relativa tolerancia a bajas a_w , siendo capaces de crecer hasta a_w 0,85. Las velocidades de crecimiento a a_w 0,87 y 0,89 fueron considerables cuando la temperatura estuvo entre 25 y 30 °C.

Condiciones ambientales durante la poscosecha y los pasos de secado de uvas para la obtención de pasas podrían producir un relativamente rápido crecimiento de *A. carbonarius* ya que la temperatura en el campo puede ser cercana a los 30 °C y en tal condición el hongo es capaz de crecer a a_w tan baja como 0,85.

III.3. Influencia e interacciones de la actividad de agua, la temperatura y el tiempo de incubación sobre la producción de OTA por *A. carbonarius*.

Se observó que la a_w , la temperatura, el tiempo de incubación y sus interacciones dobles y triples tienen una influencia significativa ($p < 0,0001$) sobre la producción de OTA por *A. carbonarius* (Tabla 21, Apéndice 4).

En la Tabla III.2 se detallan los valores obtenidos de la cuantificación (expresada en μg de OTA. g^{-1} de medio de cultivo) mediante HPLC de la OTA producida por el inóculo mixto a diferentes temperaturas y a_w a los 7, 14, 21, y 28 días de incubación. El valor presentado corresponde a la media de 6 valores (2 cuantificaciones realizadas a cada una de las réplicas).

La mayor cantidad de OTA (21,04 $\mu\text{g/g}$) fue producida a a_w 0,95 y 15 °C a los 28 días de incubación. Este resultado concuerda con Esteban *et al.* (2004 y 2006a) quienes utilizando como sustrato el mismo medio de cultivo (CYA) encontraron que la temperatura óptima para la producción de la toxina por cepas *A. carbonarius* se encontraba entre los 15 y los 20 °C; y con Leong *et al.* (2006) que observaron máxima producción de OTA a 15 °C a $a_w = 0,965$ en un medio sintético de jugo de uva (SGM).

Para cada nivel de a_w analizado se observó mayor concentración de OTA a 15 °C en todos los tiempos de incubación en comparación con otras temperaturas, excepto a a_w 0,95 a los 7 días de incubación y a a_w 0,925 a los 7 y 14 días donde no hubo crecimiento (Tabla III.2).

La Figura III.4 muestra la influencia de la temperatura y el tiempo de incubación sobre la producción de OTA a los tres niveles de a_w en los cuales se observó producción de la toxina. A las mayores a_w estudiadas (0,95 y 0,925) se observó producción de ocratoxina A a todas las temperaturas analizadas. A a_w 0,90 se encontró que hubo producción sólo a 25 y 20 °C pero no en todos los tiempos de incubación.

A a_w 0,89 se observó producción de la toxina en una condición, 21 días de incubación a 25°C, en una de las réplicas (0,05 $\mu\text{g/g}$). No se detectó producción de OTA mediante esta técnica a $a_w < 0,87$, y a esta actividad de agua la toxina fue encontrada a los 28 días en sólo uno de los triplicados a nivel de trazas. Otros autores encontraron que la menor a_w a la cual se producía OTA era 0,86 a 30 °C por una cepa aislada de café; el resto de las cepas

Tabla III.2. Concentración media de OTA de tres réplicas y el desvío estándar, producida por *A. carbonarius* a diferentes a_w , temperaturas y tiempos de incubación en el medio de cultivo CYA.

a_w	Tiempo	Temperatura (°C)				
		35	30	25	20	15
0,95	7	+	n.d.	$0,12 \pm 0,10^e$	$0,37 \pm 0,19^{de}$	n.d.
	14	$0,51 \pm 0,24^{de}$	$0,10 \pm 0,05^e$	$0,24 \pm 0,07^e$	$1,58 \pm 1,13^{de}$	$4,69 \pm 1,91^{cd}$
	21	$0,69 \pm 0,19^{de}$	$0,08 \pm 0,07^e$	$1,14 \pm 0,93^{de}$	$2,07 \pm 1,66^{de}$	$15,08 \pm 1,27^b$
	28	$0,85 \pm 0,43^{de}$	$0,13 \pm 0,07^e$	$0,23 \pm 0,05^e$	$0,86 \pm 0,10^{de}$	$21,04 \pm 10,48^a$
0,925	7	n.d.	n.d.	$0,05 \pm 0,03^e$	+	NC
	14	$0,05^{de}$	n.d.	$0,05 \pm 0,01^e$	$1,11 \pm 0,42^{de}$	NC
	21	$0,56 \pm 0,44^{de}$	+	$0,05 \pm 0,03^e$	$1,96 \pm 0,27^{de}$	$8,56 \pm 3,24^c$
	28	$0,05 \pm 0,00^e$	$0,06 \pm 0,01^e$	+	$1,62 \pm 1,25^{de}$	$4,63 \pm 5,88^{cde}$
0,90	7	n.d.	n.d.	n.d.	NC	NC
	14	n.d.	n.d.	n.d.	+	NC
	21	n.d.	n.d.	+	$2,26 \pm 0,71^{de}$	NC
	28	n.d.	n.d.	n.d.	$16,80 \pm 3,30^{ab}$	NC
0,89	7	n.d.	n.d.	n.d.	NC	NC
	14	n.d.	n.d.	n.d.	NC	NC
	21	n.d.	n.d.	$0,05^e$	NC	NC
	28	n.d.	n.d.	n.d.	NC	NC
0,87	7	NC	NC	NC	NC	NC
	14	n.d.	n.d.	n.d.	NC	NC
	21	n.d.	n.d.	n.d.	NC	NC
	28	n.d.	n.d.	+	NC	NC
0,85	7	NC	NC	NC	NC	NC
	14	NC	NC	NC	NC	NC
	21	NC	n.d.	NC	NC	NC
	28	NC	n.d.	NC	NC	NC

+: trazas (<límite de cuantificación) en al menos una réplica, NC: no creció, n.d.: no detectado. Límite de detección $0,02 \mu\text{g/g}$, límite de cuantificación $0,05 \mu\text{g/g}$. Los datos sin desvío estándar corresponden a la producción de uno de los triplicados. Valores con distintas letras son significativamente diferentes ($p = 0,05$).

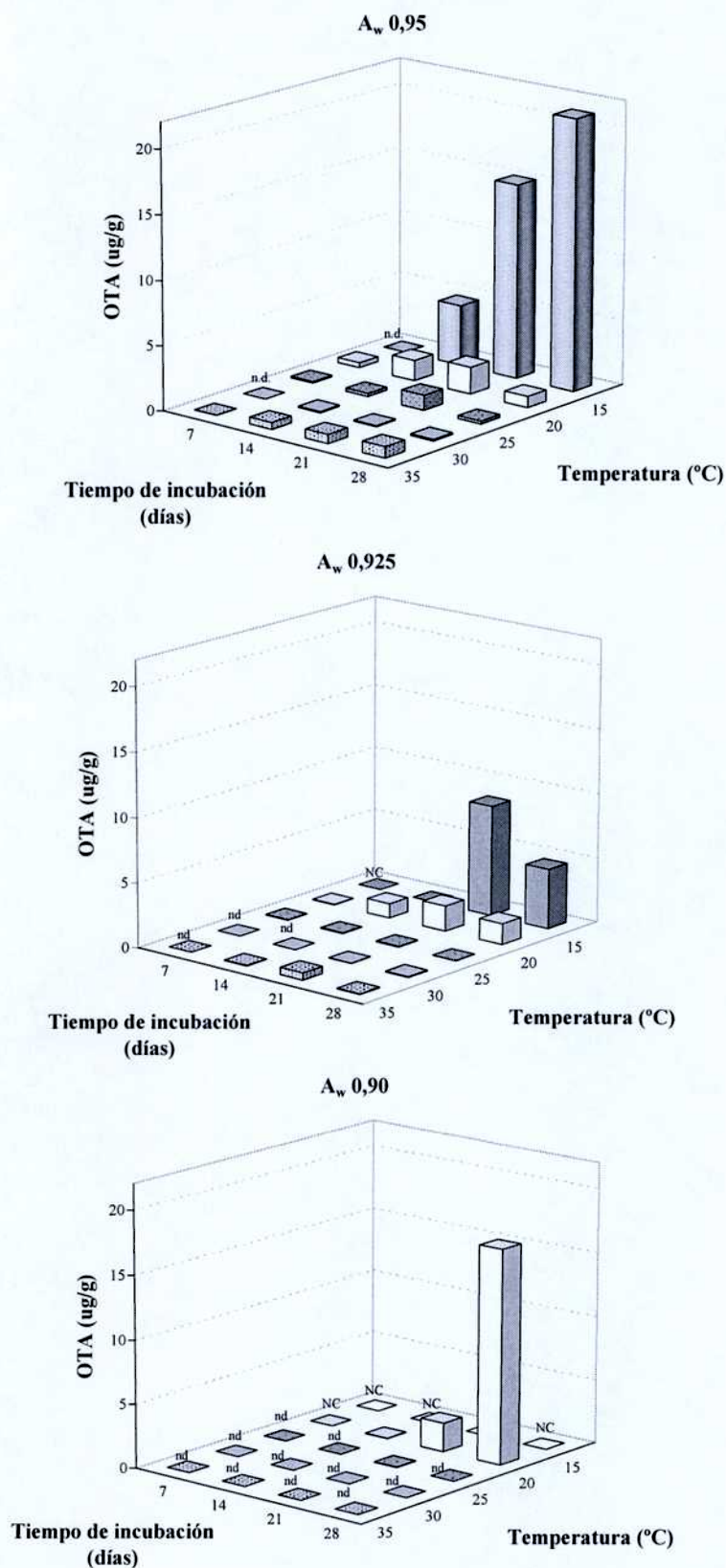


Figura III.4. Efecto de la temperatura y el tiempo de incubación sobre la producción de OTA por *A. carbonarius* a tres niveles de a_w (0,95, 0,925 y 0,90).

produjo la toxina a partir de a_w 0,90 y 0,94. A 15 °C produjeron todas en un rango de 0,94-0,99 (Esteban *et al.*, 2006).

En general la producción de OTA disminuye con la disminución de la a_w . Al comparar las medias (Test de Tukey) de los distintos niveles de a_w estudiados no se observaron diferencias significativas entre 0,90 y 0,925, pero sí entre éstas dos y 0,95. No hubo diferencias significativas entre 0,87 y 0,89, pero sí entre estas y todas las demás.

En el presente trabajo no se observó una tendencia definida que indique mayor producción de OTA a un tiempo específico de inoculación. Leong *et al.* (2006) explican este fenómeno, también observado tanto para cepas de *A. carbonarius* como para *A. niger*, como el resultado del fuerte efecto de la temperatura sobre la germinación y la velocidad de crecimiento. Sin embargo en otros trabajos encontraron que la concentración de la toxina disminuye a mayor tiempo de incubación o hacia el final del período de tiempo estudiado, a pesar de que la OTA es un metabolito estable. Algunos autores sugieren que puede ser debido a que las cepas remueven y asimilan la molécula de fenilalanina de la molécula de OTA como fuente de nitrógeno a medida que el medio de cultivo se va agotando (Téren *et al.*, 1996; Esteban *et al.*, 2004). Abrunhosa *et al.* (2002) encontraron que *A. carbonarius* puede degradar OTA a otros compuestos, uno de los cuales es ocratoxina α , una molécula de menor toxicidad que la ocratoxina A. La degradación de OTA también fue observada para otras especies toxicogénicas y no toxicogénicas de *Aspergillus* y otros hongos aislados de uvas (Abrunhosa *et al.*, 2002; Varga *et al.*, 2000).

En la mayoría de los resultados obtenidos se pueden observar grandes desviaciones estándar en la concentración de OTA (Tabla III.2). Importantes valores en el desvío estándar en la producción de OTA por *A. carbonarius* también fueron obtenidos por Bellí *et al.* (2004b) y Esteban *et al.* (2004 y 2006a), sin embargo los autores no mencionan este hecho. Otros estudios serían necesarios para minimizar esta variación e investigar las posibles causas de este fenómeno.

En las condiciones del presente estudio una combinación de a_w alta y temperatura baja favorece la formación de mayores cantidades de OTA, mientras que una a_w baja en conjunción con una temperatura elevada resultan en una menor producción de esta toxina.

Los rangos de temperatura para la producción de OTA son más restringidos que aquellos observados para crecimiento. A una a_w constante temperaturas menores de 20 °C parecen favorecer la producción de toxina en comparación con 30 °C, que es la temperatura

óptima de crecimiento. Relativamente poca toxina fue producida a temperaturas cercanas a la óptima. A estas temperaturas el crecimiento fúngico es muy rápido, consume importantes cantidades del sustrato en poco tiempo y probablemente algunos nutrientes que son necesarios para producir la toxina. Esta misma tendencia fue observada por Marín *et al.* (2006) en un medio sintético que simula la composición de las uvas.

La capacidad de las cepas de *A. carbonarius* de crecer a bajas a_w explica su presencia en alimentos deshidratados como las pasas de uvas. El color negro de los conidios de los *Aspergillus* de la sección *Nigri* les brindaría una protección contra la radiación ultravioleta (Pitt y Hocking, 1997), proporcionándole de esta manera una ventaja competitiva con respecto al resto de la micota aislada frecuentemente de uvas. *A. niger* ha sido descrito como más xerofílico que *A. carbonarius*. Esteban *et al.* (2006b) observaron crecimiento de *A. niger* a $a_w = 0,86$, otros autores encontraron que la a_w mínima era de 0,82 (Parra y Magan, 2004), 0,80 (Marín *et al.*, 1998) y 0,77 (Pitt y Hocking, 1997). Por su carácter xerofílico, por ser más tolerantes a altas temperaturas (Leong *et al.*, 2006) y por tener mayor velocidad de crecimiento (Bellí *et al.*, 2004a) *A. niger* es la especie predominantemente aislada de uvas (Battilani *et al.*, 2002; Serra *et al.*, 2003) y pasas de uvas (Romero *et al.*, 2005). Sin embargo *A. carbonarius* ha sido señalado como el principal responsable de la contaminación por OTA en uvas y derivados. Esto es debido a que los aislamientos de *A. carbonarius* son más productores que los de *A. niger* y que la mayoría de las cepas estudiadas son productoras de toxina, en cambio sólo entre el 1 al 20 % de las cepas de *A. niger* son ocratoxicogénicas.

La predicción del crecimiento de *A. carbonarius* podría ser importante para estimar el riesgo de colonización de uvas y derivados y de producción de la toxina. Como la biosíntesis de OTA ocurre en un rango más estrecho de a_w y temperatura que para el crecimiento, si el crecimiento es restringido la toxina no estará presente. Condiciones ambientales durante la postcosecha y los pasos de secado de las pasas de uva podrían favorecer el crecimiento rápido de *A. carbonarius*, teniendo en cuenta que en el campo temperaturas cercanas a 30 °C son habituales y que a esa temperatura el hongo puede crecer a a_w tan bajas como 0,85. Como la producción de toxina es favorecida a

temperaturas más bajas habría que tener en cuenta la influencia de las fluctuaciones de temperatura entre el día y la noche sobre la biosíntesis de OTA.

En la producción de pasas de uvas el secado rápido de frutos potencialmente contaminados por debajo de 0,87 eliminaría el riesgo de la producción de OTA, sin embargo el rehumedecimiento de los frutos bajo condiciones de almacenamiento inadecuadas podría producir el crecimiento fúngico con el consiguiente riesgo de producción de la micotoxina. El secado debería ser considerado un punto crítico en la producción de las pasas de uvas cuando éstas se obtienen por secado al sol.

III.3. Efecto de compuestos fenólicos sobre el crecimiento y producción de OTA por *A. carbonarius*

III.3.1. Efecto de polifenoles totales de vino Merlot

Las propiedades antimicrobianas de los polifenoles totales de diferentes vinos han sido estudiadas por algunos autores en distintas especies bacterianas (Alberto *et al.*, 2002 y Rodríguez Vaquero *et al.*, 2007).

Debido a que el vino de la variedad Merlot es el que posee una mayor cantidad de compuestos fenólicos (Rodríguez Vaquero *et al.*, 2007), como estudio preeliminar se probó el efecto de un concentrado de este vino sobre el crecimiento de *A. carbonarius* y la biosíntesis de OTA, utilizando CYA como medio control. También se probó el efecto del vino clarificado al cual se le extrajeron los polifenoles con carbón activado (sección II.3.1).

Se observó un efecto significativo de los tratamientos sobre la velocidad de crecimiento y sobre la fase lag de *A. carbonarius* (Tablas 22 y 23, Apéndice 4). Se registraron mayores velocidades de crecimiento en los medios con los concentrados de vino que en el control. En el medio con los polifenoles totales del vino se observó un crecimiento más rápido del hongo que en el medio con el concentrado clarificado (Tabla III.3). Por lo tanto la presencia de polifenoles totales de vino en una concentración de 4000 mg/l parecería estimular la velocidad de crecimiento de *A. carbonarius* en este medio.

Aunque las fases lag observadas en los tres tratamientos son muy cortas (menores a un día), las de los concentrados son significativamente mayores que las del control, no observándose diferencias significativas entre ellos (Tabla III.3).

Tabla III.3. Efecto de los concentrados de vino sobre la velocidad de crecimiento y fase lag de *A. carbonarius*.

	Control	M. clarificado	Merlot
velocidad (mm.día ⁻¹)	15,83 ± 1,07 ^a	28,23 ± 0,44 ^b	29,87 ± 0,68 ^c
lag (días)	0,44 ± 0,09 ^a	0,62 ± 0,02 ^b	0,68 ± 0,03 ^b

^{abc} letras distintas presentan diferencias significativas entre los valores medios de cada fila (p = 0,05).

Con respecto a la producción de OTA, se observó un efecto significativo de los tratamientos, en cambio el tiempo de incubación y la interacción entre éste y los tratamientos no tuvieron efecto en la biosíntesis de la toxina (Tabla 24, Apéndice 4).

La concentración de OTA producida en los distintos tratamientos se observa en la Tabla III.4. Una mayor cantidad de toxina fue producida en el medio con el concentrado clarificado que en los otros tratamientos. Las cantidades de OTA producidas en presencia del concentrado de vino fueron significativamente menores que las observadas en presencia del extracto clarificado, indicando un posible efecto de los polifenoles sobre la producción de la toxina. En base a estos resultados preliminares se ensayó el efecto de compuestos fenólicos puros.

Tabla III.4. Concentración media de OTA producida por *A. carbonarius* a diferentes tiempos de incubación en el medio de cultivo CYA (control), y en CYA adicionado con concentrados de vino.

Tiempo	Tratamiento		
	Control	M. clarificado	Merlot
7	3,17 ± 0,27*	5,35 ± 1,13	2,46 ± 0,64
14	3,56 ± 2,30	3,92 ± 0,17	2,27 ± 0,57
21	5,16 ± 1,97	5,60 ± 1,24	3,24 ± 0,28
28	3,63 ± 1,36	6,86 ± 0,98	3,14 ± 0,27

(*) µg OTA/g de medio de cultivo ± desvío estándar. Cada valor presentado corresponde a la media de cuatro valores (dos cuantificaciones realizadas a cada una de las réplicas).

III.3.2. Efecto de los compuestos fenólicos puros

El posible rol de los compuestos fenólicos como inhibidores del crecimiento fúngico y la producción de toxinas es de interés muy reciente. Esto está en parte relacionado a los hallazgos de que la resistencia a la infección fúngica de algunas variedades de cultivos está correlacionada con su contenido en compuestos fenólicos (McKeehen *et al.*, 1999; El Modafar *et al.*, 2000; Siranodou *et al.*, 2002). Además se encontró que algunos de estos

compuestos disminuyen la producción de micotoxinas tales como fumonisinas (Beekrum *et al.*, 2003), tricotecenos (Bakan *et al.*, 2003) y aflatoxinas (Mahoney y Molyneux, 2004).

Para estudiar el efecto individual de los compuestos fenólicos sobre el crecimiento de *A. carbonarius* y la biosíntesis de OTA se ensayaron algunos de los que se encuentran naturalmente presentes en uvas y derivados. Se determinó la velocidad de crecimiento, fase lag y producción de la toxina en medios con el agregado de los compuestos puros en solución etanólica a diferentes concentraciones (sección II.3.1b).

III.3.2.1. Efecto de compuestos fenólicos no flavonoides: ácidos gálico y cafeico

Se estudió el efecto del ácido gálico a 100, 200, 300 y 500 mg/l de medio de cultivo sobre el crecimiento y la producción de OTA por *A. carbonarius*. Se observó un efecto significativo de los tratamientos ($p < 0.0001$) sobre la velocidad de crecimiento y sobre la fase lag (Tabla 25 y 26, Apéndice 4). A mayor concentración del compuesto, se observó menor velocidad de crecimiento y alargamiento de las fases lag (15 días a 300 mg/l), resultando 500 mg/l totalmente inhibitoria (Figura III.5a y b).

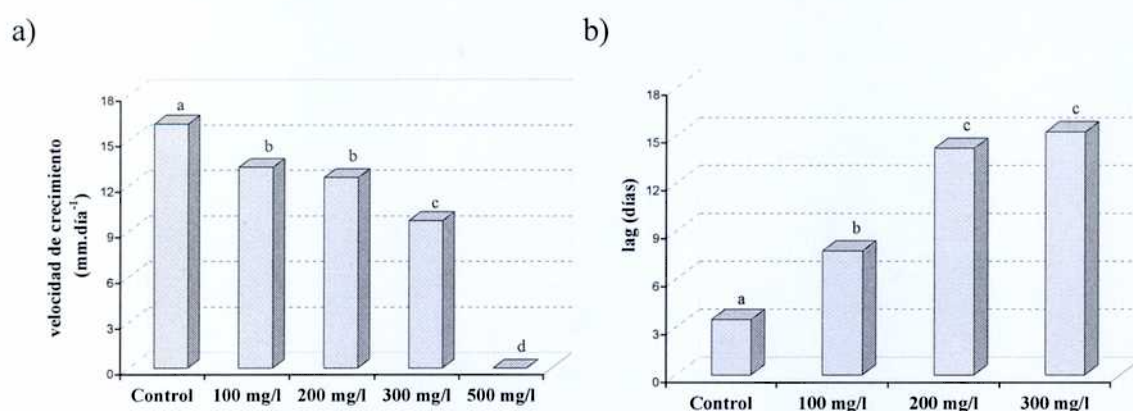


Figura III.5. Efecto de distintas concentraciones de ácido gálico sobre el crecimiento y fase lag de *A. carbonarius*. a) crecimiento (mm.día⁻¹), b) fase lag (días). Distintas letras en las columnas indican que los valores son significativamente diferentes ($p = 0,05$).

El análisis de varianza demostró que el efecto de las distintas concentraciones de ácido gálico sobre la producción de OTA fue significativo ($p < 0.0001$), en cambio no lo fueron el tiempo de incubación y la interacción entre estos dos factores (Tabla 27, Apéndice 4). En la Figura III.7a se puede observar que la presencia del ácido gálico a la menor concentración ensayada, 100 mg/l, ya tiene un efecto significativo sobre la producción de OTA. A concentraciones mayores, al extenderse la fase lag se observa producción de OTA a tiempos de incubación mas prolongados.

El efecto de este compuesto sobre el crecimiento de otros hongos toxicogénicos y sobre la producción de otras micotoxinas ha sido estudiado por otros autores. Mahoney y Molyneux (2004) encontraron que una concentración de 2000 mg/l de ácido gálico no tiene efecto sobre el crecimiento radial de *A. flavus*, sin embargo la producción de aflatoxina redujo a un 4 % con respecto al control. Estos autores sugieren que este compuesto podría afectar genes que controlan los pasos de la biosíntesis de aflatoxinas, o actuar como quelante de zinc y otros iones esenciales para el crecimiento fúngico. La concentración de metales traza, como el Zn y el Fe, tienen una fuerte influencia sobre la producción de OTA por *A. ochraceus* y ha sido también descrita para otras especies de *Aspergillus* (Muhlencoert *et al.*, 2004). Por lo que la disminución de la producción de esta toxina, incluso a concentraciones de ácido gálico que afectan poco al crecimiento de *A. carbonarius*, podría deberse al efecto quelante sobre los metales traza del medio de cultivo.

Palumbo *et al.* (2007) estudiaron el efecto de varios compuestos fenólicos sobre el crecimiento y producción de OTA por diversas especies de *Aspergillus*. En relación al ácido gálico, trabajando con una concentración de 10 mM (aproximadamente 1700 mg/l), observaron una significativa reducción del crecimiento y la producción de toxina con respecto al control en *A. alliaceus*, *A. lanosus*, *A. melleus*, *A. sulphureus* y *A. sclerotiorum*. En relación a *A. carbonarius* aparentemente este compuesto no influye sobre el crecimiento y muestra una tendencia a inhibir la producción de OTA si bien los resultados no fueron estadísticamente significativos. Los autores señalan una alta variabilidad en el comportamiento de este hongo en respuesta a los tratamientos con los antioxidantes, probablemente debido a que en el medio de cultivo AMM (*Aspergillus* Minimal Medium) la cepa utilizada produjo niveles muy bajos de OTA en relación a las cepas de las otras

especies estudiadas. Siendo éste el único trabajo encontrado sobre el efecto específico de este compuesto, cabe señalar que los resultados no son muy concluyentes aunque la tendencia es similar a la observada en el presente estudio con menores concentraciones del compuesto.

El ácido cafeico fue estudiado en las concentraciones 50, 250, y 500 mg/l de medio de cultivo, observándose un efecto significativo de los tratamientos ($p < 0,0001$) sobre la velocidad de crecimiento y sobre la fase lag (Tablas 28 y 29, Apéndice 4). La velocidad de crecimiento se ve ligeramente estimulada a 50 mg/l con respecto al control, es inhibida más de un 10 % a 250 mg/l y no se observó crecimiento a 500 mg/l (Figura III.6a). La fase lag aumenta a mayor concentración del compuesto (Figura III.6b). Se encontraron diferencias significativas para todas las medias, tanto para los valores de velocidad de crecimiento como para los de fase lag.

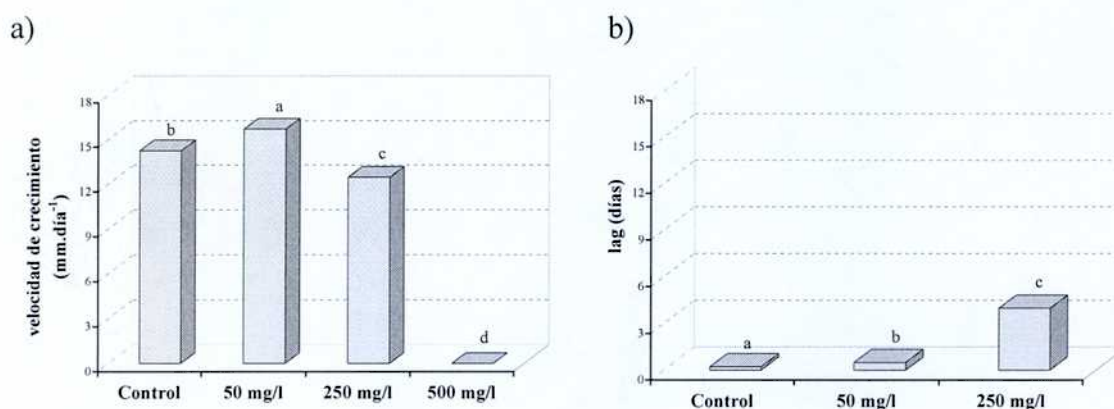
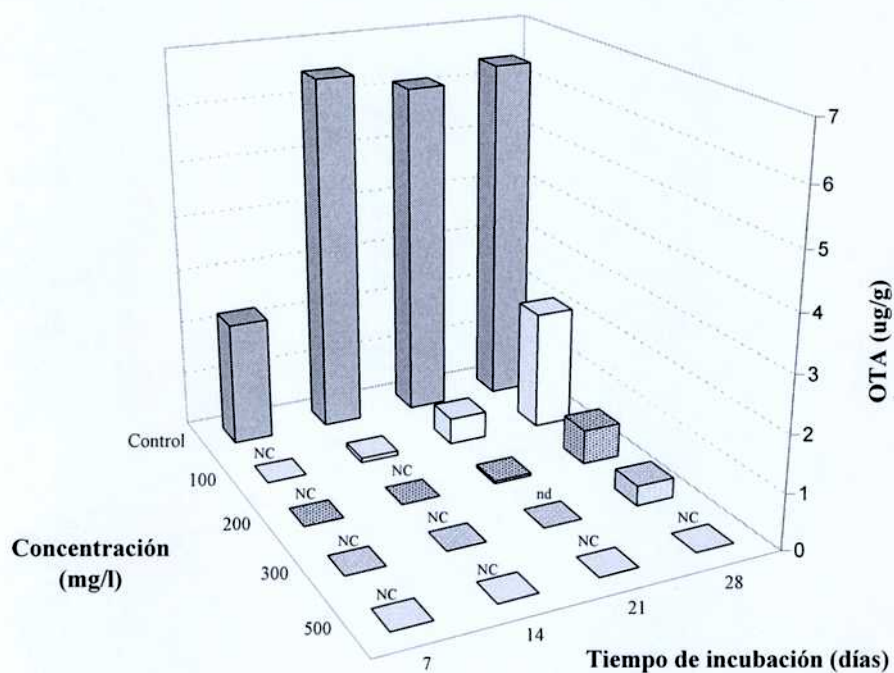


Figura III.6. Efecto de distintas concentraciones de ácido cafeico sobre el crecimiento y fase lag de *A. carbonarius*. a) crecimiento (mm.día⁻¹), b) fase lag (días). Distintas letras en las columnas indican que los valores son significativamente diferentes ($p = 0,05$).

El análisis de varianza demostró que el efecto de las distintas concentraciones de ácido cafeico y el tiempo de incubación sobre la producción de OTA resultó significativo ($p < 0,01$), en cambio no lo fue la interacción entre estos dos factores (Tabla 30, Apéndice 4). En la Figura III.7b se observa que a 250 mg/l es significativamente menor la producción de toxina en todos los tiempos de incubación con respecto al control y a 50 mg/l.

a)



b)

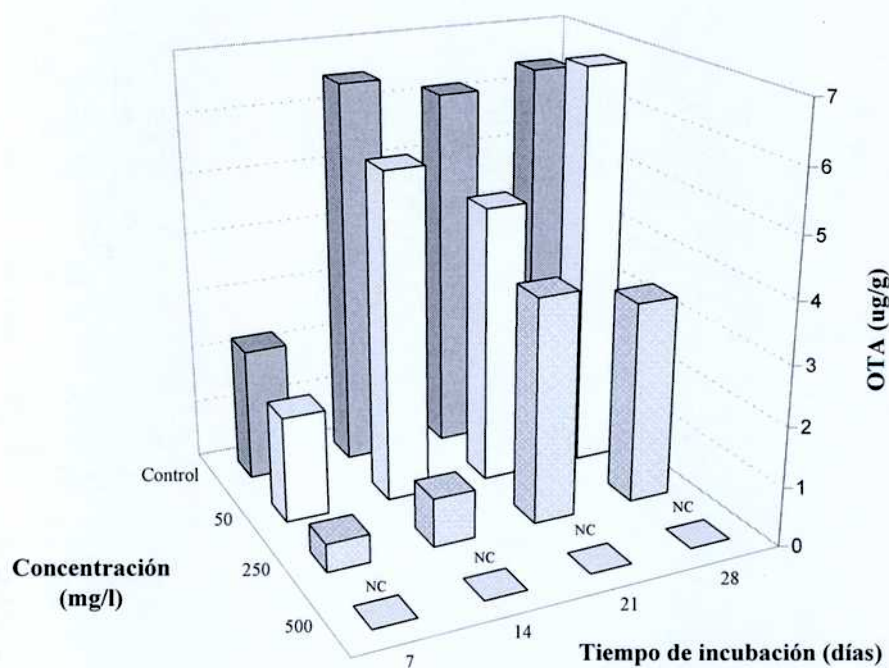


Figura III.7. Efecto de distintas concentraciones de compuestos fenólicos no flavonoides sobre la producción de OTA (µg/g) por *A. carbonarius*. a) ácido gálico, b) ácido cafeico. (NC: no creció, nd: no detectada).

Bisogno *et al.* (2007) informaron que la MIC para *A. niger*, integrante de la Sección *Nigri* al igual que *A. carbonarius*, es mayor a 250 mg/l. Beekrum *et al.* (2003) encontraron que el ácido cafeico, al igual que otros compuestos fenólicos, resultó efectivo como inhibidor del crecimiento de *Fusarium verticillioides* (MIC = 50 mg/l). La producción de fumonisina B₁ se redujo en un 90 % en presencia de dosis tan bajas del compuesto como 1 mg/l. Bakan *et al.* (2003) observaron una menor producción de tricotecenos por *Fusarium graminearum* en el germen de maíz en comparación con otras fracciones del grano y lo atribuyen a la mayor concentración de compuestos fenólicos entre los cuales el ácido cafeico es un componente mayoritario. Este efecto inhibitorio de la producción de la toxina no fue acompañado por una reducción significativa del crecimiento fúngico. Samapundo *et al.* (2007) estudiaron el efecto del ácido vainílico y el ácido cafeico en un rango de concentraciones de 0 a 2500 g/Kg de maíz a distintos niveles de actividad de agua (0,88-0,97) sobre el crecimiento y la producción de fumonisinas por *F. verticillioides* y *F. proliferatum*, y de aflatoxinas por *A. flavus* y *A. parasiticus*. Los aislamientos de *Fusarium* fueron generalmente más susceptibles en términos de crecimiento y producción de toxina que las cepas de *Aspergillus*. El ácido cafeico inhibió completamente el crecimiento de *F. proliferatum* a concentraciones ≥ 2000 mg/Kg en combinación de un valor de a_w de 0,921, pero no afectó el crecimiento micelial de las especies de *Aspergillus* dentro del rango estudiado de concentraciones y actividades acuosas. La producción de fumonisina B₁ fue significativamente reducida a los 20 días de incubación con una concentración de 1000 mg /Kg (97 y 75 % para *F. verticillioides* y *F. proliferatum* respectivamente). En cuanto a la producción de aflatoxina B₁ también se observó un efecto inhibitorio del ácido cafeico el cual se tradujo en una inhibición de al menos 74 % de las cantidades producidas en el control para ambas especies toxicogénicas de *Aspergillus* a todas las condiciones evaluadas. Según Palumbo *et al.* (2007) el ácido cafeico tiene un efecto similar al del ácido gálico frente a las especies productoras de OTA anteriormente mencionadas, incluyendo *A. carbonarius*.

III.3.2.2. Efecto de compuestos fenólicos flavonoides: quercetina, rutina y catequina

Los compuestos quercetina y rutina fueron estudiados a: 50, 100, 250 y 500 mg/l. Se observó un efecto significativo de los tratamientos ($p < 0,0001$) sobre la velocidad de crecimiento y sobre la fase lag para ambos compuestos, pero no resultó significativo el tipo de compuesto utilizado para la velocidad de crecimiento (Tablas 31 y 32, Apéndice 4). Para ambos compuestos no hay diferencias significativas en las velocidades de crecimiento ni en la fase lag a 50 y 100 mg/l con respecto al control, sí a 250 y 500 mg/l. A esta última concentración el crecimiento se vio totalmente inhibido (Figura III.8).

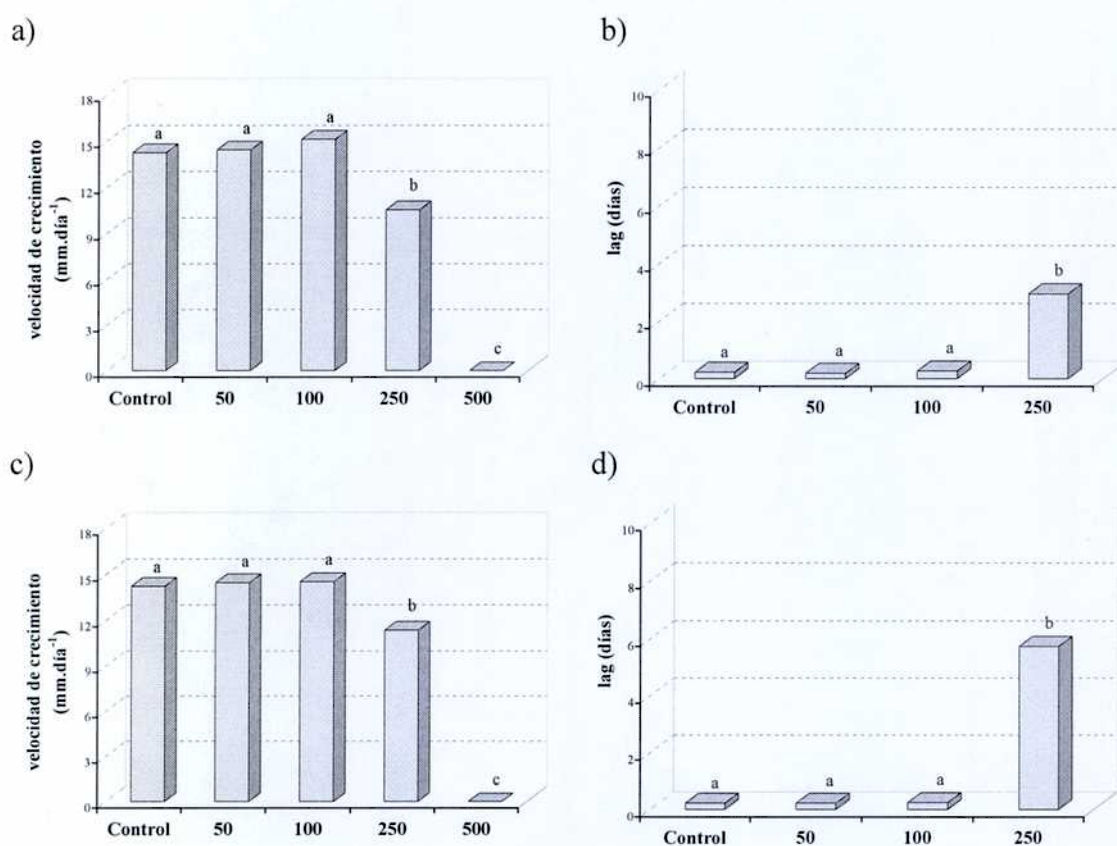


Figura III.8. Efecto de distintas concentraciones de rutina (a y b) y quercetina (c y d) sobre el crecimiento y fase lag de *A. carbonarius*. Distintas letras en las columnas indican que los valores son significativamente diferentes ($p = 0,05$).

Una característica particular observada en las placas de Petri en presencia de estos compuestos fue un halo de aclaramiento alrededor de las colonias a partir de las 24 horas

de crecimiento del hongo (Figura III.9). Probablemente esto podría atribuirse a la producción de enzimas extracelulares capaces de degradar los compuestos fenólicos tal como ha sido mencionado para diferentes especies de *Aspergillus*, incluyendo *A. flavus* (Medina *et al.*, 2004).

En relación a la producción de OTA las distintas concentraciones de rutina y quercetina y el tiempo de incubación tienen una influencia significativa sobre la biosíntesis de la toxina por *A. carbonarius*, no así el compuesto utilizado (Tabla 33, Apéndice 4).

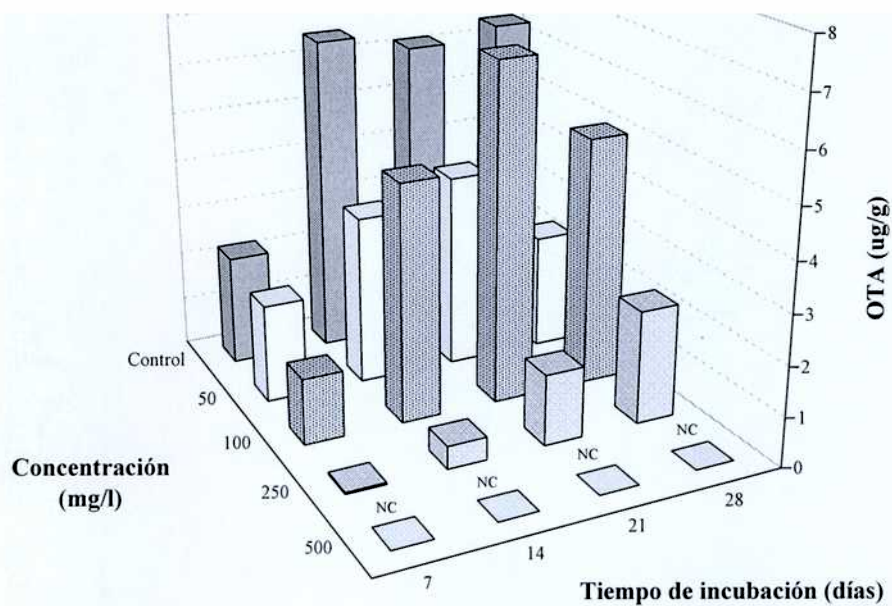
En la Figura III.10 se observa la concentración media producida en presencia de rutina y quercetina a las distintas concentraciones ensayadas y a los 7, 14, 21 y 28 días de incubación. Para ambos compuestos se encontraron diferencias significativas con respecto al control a todas las concentraciones ensayadas. Con 50 y 100 mg/l el efecto sobre la producción de OTA fue similar, en tanto que a 250 mg/l se produjo una importante inhibición de la producción de la toxina.

Se produjo mayor cantidad de OTA a mayor tiempo de incubación, aunque no se observaron diferencias significativas entre las concentraciones halladas a 21 y 28 días.

Nuestros resultados demuestran que la respuesta del hongo frente a rutina y quercetina es muy similar, lo cual está en concordancia con la similitud de sus estructuras químicas. La quercetina (forma aglicona) resultó más efectiva que la rutina (forma glicosídica) como inhibidor del crecimiento de algunas bacterias patógenas (Rodríguez Vaquero *et al.*, 2007). También se ha estudiado el efecto de estos compuestos sobre el crecimiento fúngico y la producción de micotoxinas, aunque los datos hallados en la bibliografía son escasos. Weidenbörner *et al.* (1990) informaron que la quercetina no tuvo efecto sobre el crecimiento de varias especies de *Aspergillus* que sí resultaron inhibidos por la flavona no sustituida. Estos autores, analizando el efecto de diversos compuestos flavonoides, concluyen que existe una relación entre la actividad antifúngica de los compuestos y la presencia de determinados sustituyentes. En general, los compuestos con mayor número de grupos hidroxilo, y por lo tanto con mayor polaridad, poseen la menor actividad antifúngica.



Figura III.9. Placas de Petri con *A. carbonarius* crecidos en medio de cultivo control, medio con 50 mg/l de rutina, y medio con 50 mg/l de quercetina (de arriba hacia abajo), a las 67 hs de siembra.



b)

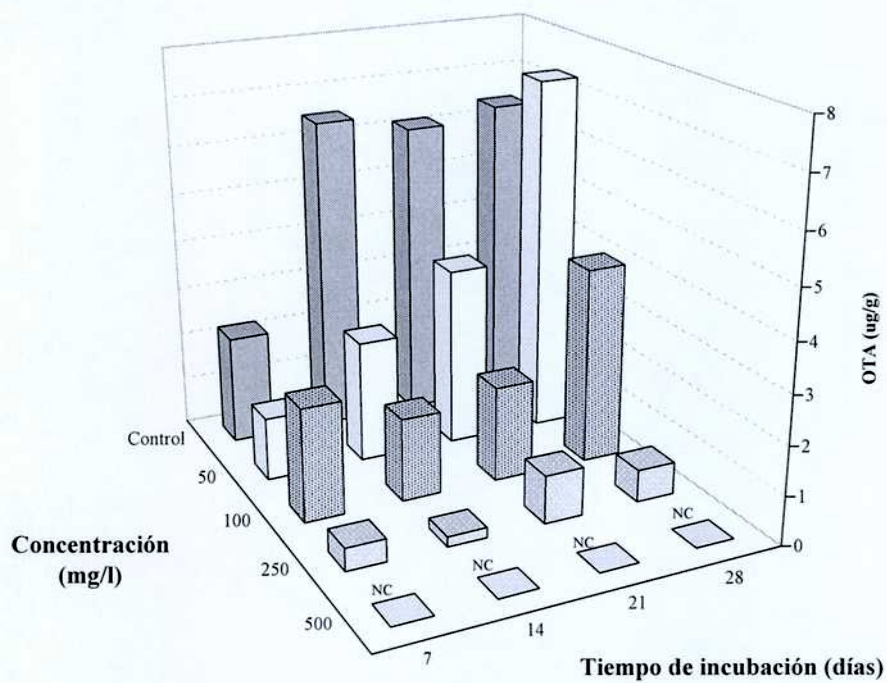


Figura III.10. Efecto de distintas concentraciones de compuestos fenólicos flavonoides sobre la producción de OTA (µg/g) por *A. carbonarius*. a) rutina, b) quercetina. (NC: no creció).

Norton (1999) también encontró que la quercetina, en comparación con otros compuestos flavonoides, no inhibió apreciablemente la producción de aflatoxinas por *A. flavus*, datos que coinciden con los de Mallozzi *et al.* (1996).

Los resultados del presente estudio demuestran que ambos flavonoides (quercetina y rutina) no tienen un efecto muy marcado sobre el crecimiento de *A. carbonarius* hasta concentraciones de 250 mg/l, si bien a esta concentración la producción de OTA disminuye considerablemente, resultados que no es posible cotejar con los de otros autores pues no se han encontrado referencias bibliográficas sobre la influencia de estos compuestos sobre la producción de OTA. Una concentración de 500 mg/l resultó totalmente inhibitoria para el crecimiento del hongo.

El efecto sobre el crecimiento y fase lag del compuesto fenólico catequina fue estudiado a 50, 1000 y 2000 mg/l. La concentración más baja fue la misma que se usó para todos los compuestos fenólicos y en este caso se seleccionaron concentraciones relativamente altas en relación a los otros dos flavonoides teniendo en cuenta la proporción en la que este compuesto está presente en el vino (Manca de Nadra, comunicación personal).

Se observó un efecto significativo de los tratamientos ($p < 0.0001$) tanto sobre el crecimiento como sobre la fase lag (Tablas 34 y 35, Apéndice 4). Con la concentración más baja ensayada hubo un efecto estimulante sobre el crecimiento, pero no hubo diferencias significativas con respecto al control para la fase lag (Figura III.11 a y b). A 1000 mg/l disminuyó la velocidad de crecimiento y aumentó la fase lag. A 2000 mg/l el crecimiento fue totalmente inhibido.

El análisis de varianza del efecto de las distintas concentraciones de catequina sobre la producción de OTA resultó significativo ($p < 0.0001$), en cambio no lo fue el tiempo de incubación y la interacción entre estos dos factores (Tabla 36, Apéndice 4). Se observó que a 1000 mg/l la producción de toxina fue significativamente menor en todos los tiempos de incubación con respecto al control y a 50 mg/l (Figura III.12).

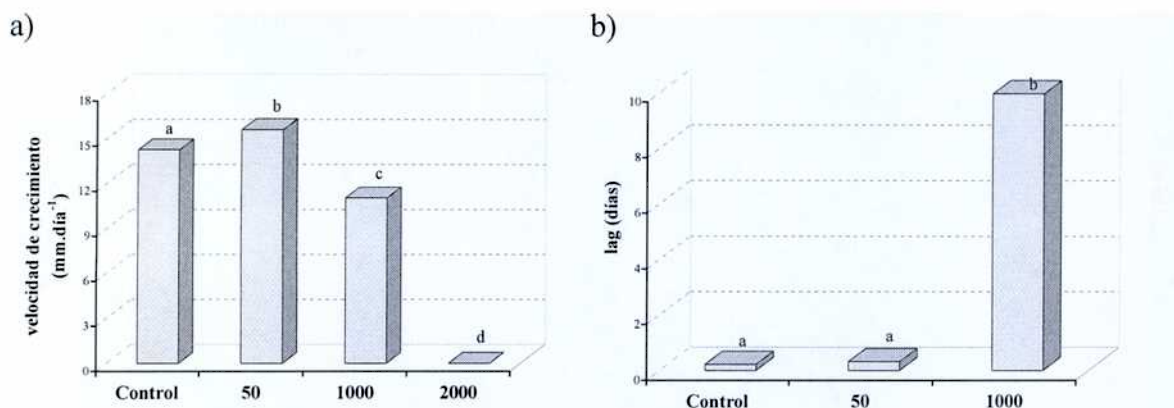


Figura III.11. Efecto de distintas concentraciones de catequina sobre el crecimiento y fase lag de *A. carbonarius*. a) crecimiento (mm.día⁻¹), b) fase lag (días). Distintas letras en las columnas indican que los valores son significativamente diferentes ($p = 0,05$).

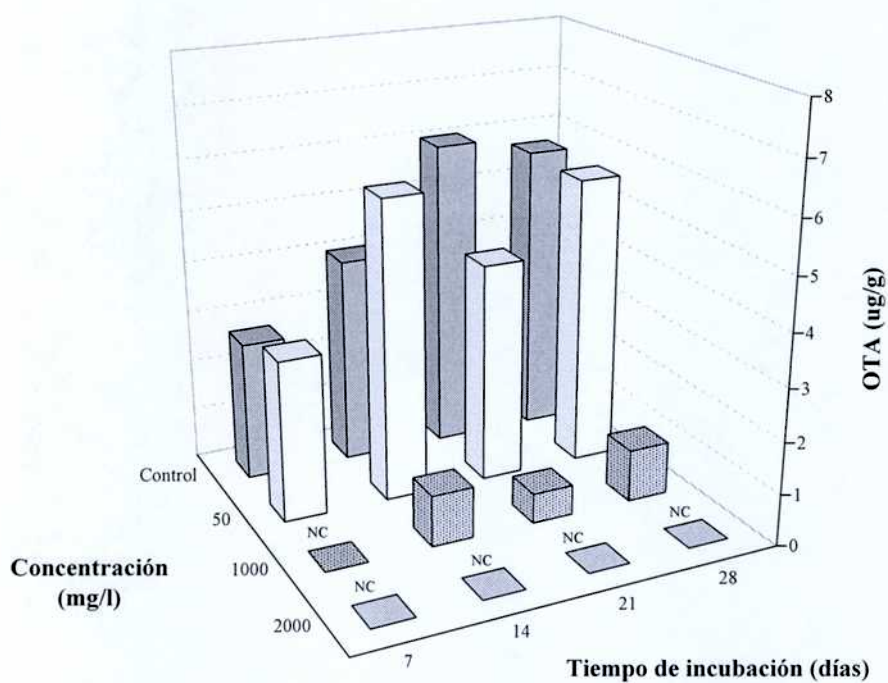


Figura III.12. Efecto de distintas concentraciones de catequina sobre la producción de OTA (µg/g) por *A. carbonarius* con respecto a un control. (NC: no creció).

La catequina fue el compuesto fenólico que menos afectó la velocidad de crecimiento, incluso a muy altas concentraciones: a 1000 mg/l sólo la disminuyó alrededor

de un 20 %. El comportamiento de este compuesto fue similar frente a otros hongos, evidenciándose un incremento del crecimiento a concentraciones relativamente bajas. Weidenbörner *et al.* (1990) señalaron que concentraciones entre 0,5 y $8 \cdot 10^{-4}$ mol.l⁻¹ (14,5 y 232 mg/l) estimularon el crecimiento de *A. chevalieri* y *A. flavus*. Norton (1999) caracterizó a la catequina como un débil inhibidor del crecimiento de *A. flavus* en comparación a otros flavonoides y no detectó ninguna influencia sobre la producción de AFB₁. En relación a su efecto sobre *A. carbonarius*, Palumbo *et al.* (2007) no observaron efectos significativos sobre el crecimiento a concentración 10 mM (2900 mg/l), ni tampoco detectaron inhibición de la biosíntesis de OTA en el rango de concentraciones de 1,25 a 20 mM (aproximadamente 360 a 5800 mg/l). En algunos trabajos (Bellí *et al.*, 2004a; Bellí *et al.*, 2005; Leong *et al.*, 2006) este compuesto ha sido incorporado al medio de cultivo utilizado para estudiar la cinética de crecimiento del hongo y la biosíntesis de OTA, tratando de asemejar la composición del medio base a la composición de las uvas, en las cuales este flavonoide se encuentra en concentraciones relativamente elevadas en relación a otros compuestos flavonoides. En el presente trabajo, cuando se utilizó una concentración similar a la encontrada en las uvas (50 mg/l) se observó un efecto estimulante del crecimiento. Los efectos inhibitorios de la catequina sobre el crecimiento de *A. carbonarius* y sobre la producción de OTA se evidenciaron cuando la concentración fue mayor de 1000 mg.l⁻¹.

Si bien algunos de los compuestos fenólicos estudiados, tales como el ácido cafeico, la rutina y la quercetina, producen una estimulación del crecimiento cuando se encuentran en bajas concentraciones, al aumentar la concentración de dichos compuestos todos ellos evidencian un efecto inhibitorio del crecimiento, así como de la producción de OTA. El efecto sobre el crecimiento no es muy marcado en algunos casos, en general se nota una mayor actividad en relación a la producción de la toxina. Estos resultados coinciden con los datos encontrados en la bibliografía, que muestran una tendencia a la inhibición de la producción de micotoxinas al incrementarse la concentración de los compuestos fenólicos, siendo muy escasos los datos encontrados en referencia a la producción de OTA por *A. carbonarius*.

Los compuestos fenólicos presentes en diversas especies vegetales posiblemente jueguen un rol importante en la compleja interacción entre el hongo y el sustrato,

conducente a la biosíntesis de metabolitos secundarios fúngicos. Varios mecanismos de acción han sido sugeridos en tal sentido. Al inhibir el estrés oxidativo, por su potente acción como antioxidantes, suprimirían una de las causas desencadenantes de la biosíntesis de las micotoxinas (Kim *et al.*, 2006). Por otra parte, también se ha señalado que podrían actuar como quelantes de metales que son esenciales para la producción de algunas micotoxinas, incluida la OTA (Mahoney y Molyneux, 2004). Estudios a nivel molecular señalan la posible influencia de estos compuestos sobre algunos genes involucrados en diferentes etapas de la biosíntesis de las micotoxinas (Mahoney y Molyneux, 2004; Kim *et al.*, 2006).

Palumbo *et al.* (2007) señalan la presencia de estos compuestos en el café, uvas y vinos, cebada, nueces, almendras y pistacho. Estas fuentes naturales de antioxidantes son, a la vez, hábitats comunes de especies ocratoxigénicas de *Aspergillus* y *Penicillium*, y la contaminación con OTA ha sido detectada en todas estas “commodities”. Esta aparente contradicción estaría indicando que el rol de los compuestos antioxidantes en la ecología de los hongos productores de OTA es bastante complejo. También es importante tener en cuenta que estos compuestos en las plantas se encuentran esterificados con carbohidratos formando parte de estructuras más complejas (por ejemplo los taninos) o en forma de glicósidos susceptibles de ser hidrolizados por las enzimas fúngicas (Mahoney y Molyneux, 2004; Medina *et al.*, 2004). Se ha sugerido el uso potencial de compuestos naturalmente presentes en las uvas para conferir resistencia a la colonización por *Aspergillus carbonarius* y el crecimiento, y la supresión de la biosíntesis de OTA. Estos compuestos podrían ser acrecentados a través de la selección de cultivares o por programas de mejoramiento genético.

Por tratarse de compuestos naturales presentes en diversos vegetales que forman parte de la dieta humana, la acción antimicrobiana de los compuestos fenólicos ha despertado en los últimos años considerable interés. En particular, su efecto sobre el crecimiento de los hongos y su posible rol en la biosíntesis de las micotoxinas son aspectos importantes a dilucidar para poder emplear a estos compuestos como antifúngicos naturales o como sinergistas de los fungicidas actualmente en uso. La utilización de compuestos para controlar el crecimiento y/o la producción de toxina, naturalmente presentes en plantas y considerados seguros, tendría menos riesgo de causar efectos

desfavorables que la utilización de sustancias químicas de introducción reciente. Además los compuestos fenólicos al ser metabolitos secundarios de prácticamente todas las plantas podrían ser agentes antifúngicos de fácil obtención, para la aplicación pre y/o post cosecha.



Conclusiones

III. CONCLUSIONES

Efecto de la actividad de agua y la temperatura sobre el crecimiento de *A. carbonarius* y la producción de OTA.

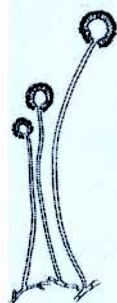
- El empleo de inóculos mixtos, integrados por suspensiones de esporas de diferentes aislamientos de la misma especie, resultó ser una metodología adecuada para minimizar el efecto de las cepas fúngicas en el estudio del crecimiento y la producción de OTA por *A. carbonarius*.
- El efecto de los factores ambientales sobre el crecimiento de cepas argentinas de *A. carbonarius* fue similar a lo observado en cepas de otros orígenes geográficos, aunque en el presente trabajo se encontraron mayores velocidades de crecimiento.
- La temperatura óptima de crecimiento fue 30 °C en todos los niveles de a_w ensayados.
- En el rango de a_w analizado la velocidad de crecimiento aumentó con el incremento de la a_w y la tolerancia a bajas actividades acuosas fue encontrada a temperaturas cercanas a la óptima.
- No se observó crecimiento a a_w por debajo de 0,85, lo cual sugiere que la a_w limitante para el crecimiento de *A. carbonarius* es muy cercana a ese valor.
- Las cepas aisladas de pasas de uva usadas en el presente trabajo mostraron una relativa tolerancia a bajas a_w , siendo capaces de crecer bastante rápido en el rango de a_w 0,87-0,89 a temperaturas de 25 ó 30°C, condiciones ambientales que podrían darse en la poscosecha de las uvas y durante las etapas de secado para obtener las pasas.

- La mayor producción de OTA fue observada a 15 °C en todos los niveles de a_w donde hubo crecimiento.
- En general la producción de OTA disminuyó con la disminución de la a_w . No se detectó producción de OTA a $a_w < 0,87$, y a esta actividad de agua la toxina fue encontrada a los 28 días en sólo uno de los triplicados a nivel de trazas.
- En las condiciones del presente estudio una combinación de a_w alta y temperatura baja favoreció la formación de mayores cantidades de OTA, mientras que una a_w baja en conjunción con una temperatura elevada resultó en una menor producción de esta toxina.
- Los rangos de temperatura para la producción de OTA fueron más restringidos que aquellos observados para crecimiento del hongo. Relativamente poca toxina fue producida a temperaturas cercanas a la óptima para el crecimiento.

Efecto de compuestos fenólicos presentes en las uvas sobre el crecimiento de *Aspergillus carbonarius* y la producción de ocratoxina A.

- Si bien algunos de los compuestos fenólicos estudiados produjeron una estimulación del crecimiento cuando se encontraron en bajas concentraciones, al aumentar la concentración de dichos compuestos todos ellos evidenciaron un efecto inhibitorio del crecimiento, así como de la producción de OTA.
- En general se observó un mayor efecto de estos compuestos sobre la producción de la toxina que en relación al crecimiento.
- Todos los compuestos fenólicos ensayados, a excepción de la catequina, fueron inhibitorios para el crecimiento en una concentración de 500 mg/l.

- Los dos compuestos no flavonoides (ácidos gálico y cafeico) mostraron un efecto similar sobre el crecimiento de *A. carbonarius*, si bien a la menor concentración ensayada, el ácido cafeico resultó estimulante para el crecimiento del hongo. El ácido gálico tuvo un mayor efecto inhibitorio sobre la producción de OTA.
- En relación a los compuestos flavonoides, quercetina y rutina presentaron un comportamiento similar entre sí y diferente del observado para catequina. Este último resultó menos inhibitorio tanto para el crecimiento como para la producción de la toxina.
- En función del efecto inhibitorio de estos compuestos, observado principalmente sobre la producción de OTA, podría ser considerado su uso potencial como antifúngicos naturales.



Bibliografía

V. BIBLIOGRAFÍA

- Abarca, M. L., Bragulat, M. R., Castellá, G., Cabañes, F. J. (1994). Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* var. *niger*. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 2650-2652.
- Abarca, M. L., Accensi, F., Bragulat, M. R., Cabañes, F. J. (2001). Current importance of ochratoxin A-producing *Aspergillus spp.* *Journal of Food Protection* 64: 903-906.
- Abarca, M. L., Accensi, F., Bragulat, M. R., Castellá, G., Cabañes, F. J. (2003). *Aspergillus carbonarius* as the main source of ochratoxin A contamination in dried vine fruits from the Spanish market. *Journal of Food Protection* 66: 504-506.
- Abrunhosa, L., Serra, R., Venâncio, A. (2002). Biodegradation of ochratoxin A by fungi isolated from grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 7493-7496.
- Accensi, F., Abarca, M. L., Cano, J., Figuera, L., Cabañes, F. J. (2001). Distribution of ochratoxin A producing strains in the *A. niger* aggregate. *Antonie Van Leeuwenhoek* 79: 365-370.
- Akiyama, H., Kikuchi, Y., Chen, D., Goda, Y., Takatori, K., Ichinoe, M., Toyoda, M. (1998). A rapid analytical method of ochratoxin A (OTA) in red pepper. *Revue de Médecine Vétérinaire* 149: 502.
- Alberto, M. R., Farías, M. E., Manca de Nadra, M. C. (2001). Effect of gallic acid and catechin on *Lactobacillus hilgardii* 5w growth and metabolism of organic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 4359-4363.
- Alberto, M. R., Farías, M. E., Manca de Nadra, M. C. (2002). Effect of wine phenolic compounds on *Lactobacillus hilgardii* 5w viability. *Journal of Food Protection* 65: 211-213.
- Al-Musallam, A. (1980). Revision of the black *Aspergillus* Species. Ph.D. Thesis. University of Utrecht.
- Anónimo (2005). Reglamento de la Comunidad Europea N° 123/2005 de la Comisión de 26 de enero de 2005 por el que se modifica el Reglamento (CE) N° 466/2001 con respecto a la ocratoxina A. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L25: 3-5.
- Anónimo (2006). Recomendación de la Comisión de 17 de agosto de 2006 sobre la presencia de deoxinivalenol, zearalenona, ocratoxina A, toxinas T-2 y HT-2 y fumonisinas en productos destinados a la alimentación animal. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L229: 7-9.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). *Official Methods of Analysis of AOAC International* (2000). Cap. 49, 970.44 y 973.37. 17th Edition, Maryland.
- Apostolou, E., El-Nezami, H., Ahokas, J., Donohue, E. (1998). The evaluation of ochratoxin A in breast milk in Victoria (Australia). *Revue de Médecine Vétérinaire* 149: 709.
- Arroyo, M., Aldred, D., Magan, N. (2005). Environmental factors and weak organic acid interactions have differential effects on control of growth and ochratoxin A production by *Penicillium verrucosum* isolates in bread. *International Journal of Food Microbiology* 98: 223-231.

- Bae, S., Fleet, G. H., Heard, G. M. (2004). Occurrence and significance of *Bacillus thuringiensis* on wine grapes. *International Journal of Food Microbiology* 94: 301-312.
- Bakan, B. D., Bily, A. C., Melcion, D., Cahagnier, B., Regnault-Roger, C., Philogène, B. J. R., Richard-Molard, D. (2003). Possible role of plant phenolics in the production of trichothecenes by *Fusarium graminearum* strains on different fractions of maize kernels. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 51: 2826-2831.
- Battilani, P., Pietri, A. (2002). Ochratoxin A in grapes and wine. *European Journal of Plant Pathology* 108: 639-643.
- Battilani, P., Pietri, A., Bertuzzi, T., Languasco, L., Giorgi, P., Kozakiewicz, Z. (2003). Occurrence of ochratoxin A-producing fungi in grapes grown in Italy. *Journal of Food Protection* 66: 633-636.
- Battilani, P., Pietri, A. (2004). Risk assessment and management in practice: ochratoxin in grapes and wine. En: *Mycotoxins in food: Detection and control*. Magan, N., Olsen, M. Eds. Cap. 11. Woodhead Publishing Limited, Cambridge.
- Battilani, P., Giorni, P., Bertuzzi, T., Formenti, S., Pietri, A. (2006). Black aspergilli and ochratoxin A in grapes in Italy. *International Journal of Food Microbiology* 111: S53-S60.
- Bau, M. (2005). Caracterización molecular de especies ocratóxigenas del género *Aspergillus* sección *Nigri*. Tesis doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona.
- Bau, M., Castellá, G., Bragulat, M. R., Cabañes F. J. (2005a). DNA-based characterization of ochratoxin-A-producing and non-producing *Aspergillus carbonarius* strains from grapes. *Research in Microbiology* 156: 375-381.
- Bau, M., Bragulat, M. R., Abarca, M. L., Mínguez, S., Cabañes, F. J. (2005b). Ochratoxigenic species from Spanish wine grapes. *International Journal of Food Microbiology* 98: 125-130.
- Baydar, N. G., Özkan, G., Sagdiç, O., (2004). Total phenolic contents and antibacterial activities of grape (*Vitis vinifera* L.) extracts. *Food Control* 15: 335-339.
- Bayman, P., Baker, J. L., Doster, M. A., Michailides, T. J., Mahoney, N. E. (2002). Ochratoxin production by the *Aspergillus ochraceus* group and *Aspergillus alliaceus*. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 2326-2329.
- Beekrum, S., Govinden, R., Padayachee, T., Odhav, B. (2003). Naturally occurring phenols: a detoxification strategy for fumonisin B₁. *Food Additives and Contaminants* 20: 490-493.
- Bellí, N., Ramos, A. J., Coronas, I., Sanchis, V., Marín, S. (2005). *Aspergillus carbonarius* growth and ochratoxin A production on a synthetic grape medium in relation to environmental factors. *Journal of Applied Microbiology* 98: 839-844.
- Bellí, N., Marín S., Sanchis, V., Ramos, A. J (2004a). Influence of water activity and temperature on growth of isolates of *Aspergillus* section *Nigri* strains isolated from grapes. *International Journal of Food Microbiology* 96: 19-27.
- Bellí, N., Ramos, A. J., Sanchis, V., Marín S. (2004b). Incubation time and water activity effects on ochratoxin A production by *Aspergillus* section *Nigri* strains isolated from grapes. *Letters in Applied Microbiology* 38: 72-77.

- Bellí, N., Marín S., Duaigues, A., Ramos, A. J., Sanchis, V. (2004c). Ochratoxin A in wines, musts and grapes juices from Spain. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 84: 591-594.
- Bisogno, F., Mascoti, L., Sanchez, C., Garibotto, F., Giannini, F., Kurina-Sanz, M., Enriz, R. (2007). Structure-antifungal activity relationship of cinnamic acid derivatives. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 55: 10635-10640.
- Bragulat, M. R., Abarca, M. L., Cabañes, F. J. (2001). An easy screening method for fungi producing ochratoxin A in pure culture. *International Journal of Food Microbiology* 71: 139-144.
- Brera, C., Caputi, R., Miraglia, M., Iavicoli, I., Salerno, A., Carelli, G. (2002). Exposure assessment to mycotoxins in workplaces: aflatoxins and ochratoxins A occurrence in airborne dusts and human sera. *Microchemical Journal* 73: 167-173.
- Cabañes, F. J., Accensi, F., Bragulat, M. R., Abarca, M. L., Castellá, G., Mínguez, S., Pons, A. (2002). What is the source of ochratoxin A in wine?. *International Journal of Food Microbiology* 79: 213-215.
- Cairns-Fuller, V., Aldred, D., Magan, N. (2005). Water, temperature and gas composition interactions affect growth and ochratoxin A production by isolates of *Penicillium verrucosum* on wheat grain. *Journal of Applied Microbiology* 99: 1215-1221.
- Castegnaro, M., Plestina, R., Dirheimer, G., Chernozemsky, I., Bartsch, H. (Eds.) (1991) *Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary Tract Tumors*. IARC Scientific Publication N° 115, p. 340. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France.
- Castegnaro, M., McGregor D. (1998). Carcinogenic risk assessment of mycotoxins. *Revue de Médecine Vétérinaire* 149: 671-678.
- Ciegler, A., Fennell, D. I., Sansing, G. A., Detroy, R. W., Bennett G. A. (1973). Mycotoxin-producing strains of *Penicillium viridicatum*: Classification into subgroups. *Applied and Environmental Microbiology* 26: 271-278.
- Codex Alimentarius Commission (1998). JOINT FAO/WHO Food Standards Programme Codex Committee on Food Additives and Contaminants. Position paper on ochratoxin A. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.
- Comisión del Codex Alimentarius (2001). Informe de la 33ª reunión del Comité del Codex sobre Aditivos Alimentarios y Contaminantes de los Alimentos. Food and Agriculture Organization of the United Nations La Haya, Países Bajos.
- Cooke, R. C., Whipps J. M. (1993). *Ecophysiology of Fungi*. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Cowan, M. M. (1999). Plants products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews* 12: 564-582.
- Cuppen, J. G., Van den Brink, P. J., Camps, E., Uil, K. F., Brock, T. C. (2000). Impact of the fungicide carbendazim in freshwater microcosms. I. Water quality, breakdown of particulate organic matter and responses of macroinvertebrates. *Aquatic Toxicology* 48: 233-250.

- Dalcero, A., Magnoli, C., Hallak, C., Chiacchiera, S. M., Palacio, G., Rosa, C. A. R. (2002). Detection of ochratoxin A in animal feeds and capacity to produce this mycotoxin by *Aspergillus* section *Nigri* in Argentina. *Food Additives and Contaminants* 19: 1065-1072.
- Da Rocha Rosa, C. A., Palacios, V., Combina, M., Fraga, M. E., De Oliveira Rekson, A., Magnoli, C. E., Dalcero, A. M. (2002). Potential ochratoxin A producers from wine grapes in Argentina and Brazil. *Food Additives and Contaminants* 19: 408-414.
- Davis, N. D., Searcy, J. W., Dienner, U. L. (1969). Production of ochratoxin A by *Aspergillus ochraceus* in a semisynthetic medium. *Applied Microbiology* 17: 742-744.
- Domijan, A. -M., Peraica, M., Žlender, V., Cvjetković, B., Jurjević, Ž., Topolovec-Pintarić S., Ivić, D. (2005). Seed-borne fungi and ochratoxin A contamination of dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.) in the Republic of Croatia. *Food and Chemical Toxicology* 43: 427-432.
- El Khoury, A., Rizk, T., Lteif, R., Azouri, H., Delia, M., Lebrihi, A. (2006). Occurrence of ochratoxin A- and aflatoxin B₁-producing fungi in Lebanese grapes and ochratoxin A content in musts and finished wines during 2004. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 8977-8982.
- El Modafar, C., Tantaoui, A., El Boustani, E. (2000). Changes in cell wall-bound phenolic compounds and lignin in roots of date palm cultivars differing in susceptibility to *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*. *Journal of Phytopathology* 148: 405-411.
- Esteban, A., Abarca, M. L., Bragulat, M. R. and Cabañes, F. J. (2004). Effect of temperature and incubation time on production of ochratoxin A by black aspergilli. *Research in Microbiology* 155: 861-866.
- Esteban, A. (2005). *Aspergillus* Sección *Nigri*: Estudio fisiológico y molecular de especies ocratoxígenas. Tesis Doctoral. Facultat de Veterinària. Universitat Autònoma de Barcelona.
- Esteban, A., Abarca, M. L., Bragulat, M. R. and Cabañes, F. J. (2006a). Study of the effect of water activity and temperature on ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius*. *Food Microbiology* 23: 634-640.
- Esteban, A., Abarca, M. L., Bragulat, M. R. and Cabañes, F. J. (2006b). Effect of water activity on ochratoxin A production by *Aspergillus niger* aggregate species. *International Journal of Food Microbiology* 108: 188-195.
- Frankel, E. N., Waterhouse, A. L., Teissedre, P. L. (1995). Principal phenolic phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low-density lipoproteins. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 43: 890-894.
- Frisvad, J. C., Frank, J. M., Houbraken, J., Kuijpers, A., Samson, R. A. (2004). New ochratoxin A producing species of *Aspergillus* section *Circumdati*. *Studies in Mycology* 50: 23-43.
- Frisvad, J. C., Thrane, U., Samson, R., Pitt, J. I. (2006). Important mycotoxins and the fungi which produce them. En: *Advances in Food Mycology* p. 3-31. Hocking A. D., Pitt J. I., Samson R. A., Thrane U. (Eds.). Springer, New York.
- Gams, W., Christensen, M., Onions, A. H. S., Pitt, J. I., Samson, R. A. (1985). Infrageneric taxa of *Aspergillus*. En: *Advances in Penicillium and Aspergillus systematics* p. 55-64. Samson R. A., Pitt J. I. (Eds.). Plenum Press, New York..

- Gibson, A. M., Baranyi, J., Pitt, J. I., Eyles, M. J., Roberts, T. A. (1994). Predicting fungal growth: the effect of water activity on *Aspergillus flavus* and related species. *International Journal of Food Microbiology* 23: 419-431.
- Gómez, C., Bragulat, M. R., Abarca, M. L., Mínguez, S., Cabañes, F. J. (2006). Ochratoxin A-producing fungi from grapes intended for liqueur wine production. *Food Microbiology* 23: 541-545.
- Guzev, L., Danshin, A., Ziv, S., Lichter, A. (2006). Occurrence of ochratoxin A producing fungi in wine and table grapes in Israel. *International Journal of Food Microbiology* 111: S67-S71.
- Häggbloom, P. E., Ghosh, J. (1985). Postharvest production of ochratoxin A by *Aspergillus ochraceus* and *Penicillium viridicatum* in barley with different protein levels. *Applied and Environmental Microbiology* 49: 787-790.
- Hammer, K. A., Carson, C. F., Riley, T. V. (1999). Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology* 86: 985-990.
- Heenan, C. N., Shaw, K. J., Pitt, J. I. (1998). Ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* isolates and detection using coconut cream agar. *Journal of Food Mycology* 1: 67- 72.
- Hocking, A. D., Miscamble, B. F. (1995). Water relations of some Zygomycetes isolated from foods. *Mycological Research* 99: 113-118.
- Horie, Y., (1995). Productivity of ochratoxin A of *Aspergillus carbonarius* in *Aspergillus* section *Nigri*. *Nippon Kingakukai Kaiho* 36: 73-76.
- Huang, Z., White, D. G., Payne, G. A. (1997). Corn seed proteins inhibitory to *Aspergillus flavus* and aflatoxin biosynthesis. *Phytopathology* 87: 622-627.
- IARC (International Agency for Research on Cancer) (1993). Ochratoxin A. En: Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins p. 489-521. Vol. 56, IARC, Lyon.
- Joosten, H. M. L. J., Goetz, J., Pitte, A., Schellenberg, M., Bucheli, P. (2001). Production of ochratoxin A by *Aspergillus carbonarius* on coffee cherries. *International Journal of Food Microbiology* 65: 39-44.
- Jorgensen, K., Bilde, B. (1996). Occurrence and estimated dietary intakes of ochratoxin A in European countries-results from a SCOOP project. *Food Additives and Contaminants* 13 (Suppl.): 15-16.
- Jorgensen, K. (1998). Survey of pork, poultry, coffee, beer and pulses for ochratoxin A. *Food Additives and Contaminants* 15: 550-554.
- Kanner, J., Frankel, E., Granit, R., German, B., Kinsella, J. E. (1994). Natural antioxidants in grapes and wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 42: 64-69.
- Kim, J. H., Mahoney, N., Chan, K. L., Molyneux, R. J., Campbell, B. C. (2006). Controlling food-contaminating fungi by targeting their antioxidative stress-response system with natural phenolic compounds. *Applied Microbial and Cell Physiology* 70: 735-739.

- Klich, M. (2002). Identification of common *Aspergillus* species. Centraalbureau Voor Schimmelcultures. Utrecht, The Netherlands.
- Kokkonen, M., Jestoi, M., Rizzo, A. (2005). The effect of substrate on mycotoxin production of selected *Penicillium* strains. *International Journal of Food Microbiology* 99: 207-214.
- Krogh, P. (1987). Ochratoxins in Food. En: *Mycotoxins in Food*. Krogh, P. (Ed.). Academy Press. London.
- Kuiper-Goodman, T. (1996). Risk assessment of ochratoxin A: an update. *Food Additives and Contaminants* 13 (Suppl.): 53-57.
- Kusters-van Someren, M. A., Samson, R. A., Visser, J. (1991). The use of RFLP analysis in classification of the black *Aspergilli*: reinterpretation of the *Aspergillus niger* aggregate. *Current Genetics* 19: 21-26.
- Lai, M., Semeniuk, G., Hesseltine, C. W. (1970). Conditions for production of ochratoxin A by *Aspergillus* species in a synthetic medium. *Applied Microbiology* 19: 542-544.
- Larsen, T. O., Svendsen, A., Smedsgaard, J. (2001). Biochemical characterization of ochratoxin A-producing strains of the genus *Penicillium*. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 3630-3635.
- 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. *International Journal of Food Microbiology* 61: 11-16.
- Leong, S. L., Hocking, A. D., Scott, E. S. (2006). Effect of temperature and water activity on growth and ochratoxin A production by Australian *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* isolates on a simulated grape juice medium. *International Journal of Food Microbiology* 110: 209-216.
- Leoni, L. A. B., Valente Soares, L. M., Oliveira, P. L. C. (2000). Ochratoxin A in Brazilian roasted and instant coffees. *Food Additives and Contaminants* 17: 867-870.
- Lo Curto, R., Pellicanò, T., Vilasi, F., Munafò, P., Dugo, G. (2004). Ochratoxin A occurrence in experimental wines in relationship with different pesticide treatment on grapes. *Food Chemistry* 84: 71-75.
- Lombaert, G. A., Pellaers, P., Neumann, G., Kitchen, D., Huzel, V., Telka, R., Kotello, S., Scott, P. M. (2004). Ochratoxin A in dried vine fruits on the Canadian retail market. *Food Additives and Contaminants* 21: 578-585.
- Lopez de Cerain, A., González-Peñas, E., Jiménez, A. M., Bello, J. (2002). Contribution to the study of ochratoxin A in Spanish wines. *Food Additives and Contaminants* 19: 1058-1064.
- López-Malo, A., Alzamora, S. M., Palou, E. (2005). *Aspergillus flavus* growth in the presence of chemical preservatives and naturally occurring antimicrobial compounds. *International Journal of Food Microbiology* 99: 119-128.
- MacDonald, S., Wilson, P., Barnes, K., Damant, A., Massey, R., Mortby, E., Sheperd, M. (1999). Ochratoxin A in dried vine fruit: method developments and survey. *Food Additives and Contaminants* 16: 253-260.

- MacDonald, S., Prickett, T. J., Wildey, K. B., Chan, D. (2004). Survey of ochratoxin A and deoxynivalenol in stored grains from the 1999 harvest in the UK. *Food additives and Contaminants* 21: 172-181.
- Madhyastha, S. M., Marquardt, R. R., Frohlich, A. A., Platford, G., Abramson, D. (1990). Effects of different cereal and oilseed substrates on the growth and production of toxins by *Aspergillus alutaceus* and *Penicillium verrucosum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 38: 1506-1510.
- MAFF (Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, UK) (1999). Survey of retail products for ochratoxin A. Food surveillance sheet 185.
<http://archive.food.gov.uk/maff/archive/food/infsheet/1999/no171/171ochr.htm>
- Magnoli, C., Violante, M., Combina, M., Palacio, G., Dalcero, A. (2003). Mycoflora and ochratoxin-producing strains of *Aspergillus* section *Nigri* in wine grapes in Argentina. *Letters in Applied Microbiology* 37: 179-184.
- Magnoli, C., Astoreca, A., Ponsone, L., Combina, M., Palacio, G., Rosa, C. A. R., Dalcero, A. M. (2004). Survey of mycoflora and ochratoxin A in dried vine fruits from Argentina markets. *Letters in Applied Microbiology* 39: 326-331.
- Mahoney, N., Molyneux, R. J. (2004). Phytochemical inhibition of aflatoxigenicity in *Aspergillus flavus* by constituents of walnut (*Juglans regia*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 1882-1889.
- Mallozzi, M. A. B., Correa, B., Haraguchi, M., Neto, F. B. (1996). Effect of flavonoids on *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin production. *Revista de Microbiologia* 27: 161-165.
- Malir, F., Jergeova, Z., Severa, J., Cerna, M., Smid, J., Betbeder, A., Baudrimont, I., Creppy, E. (1998). The level of ochratoxin A in blood serum of adults in the Czech Republic. *Revue de Médecine Vétérinaire* 149: 710.
- Marín, S., Sanchis, V., Sáenz, A. J., Ramos, A. J., Vinas, I., Magan, N. (1998). Ecological determinants for germinations and growth of some *Aspergillus* and *Penicillium spp.* from maize grain. *Journal of Applied Microbiology* 84: 25-36.
- Marín, S., Bellí, N., Lasram S., Chebil S., Ramos, A. J., Ghorbel, A., Sanchis, V. (2006). Kinetics of ochratoxin A production and accumulation by *Aspergillus carbonarius* on synthetic grape medium at different temperature levels. *Journal of Food Science* 71: M196-M200.
- Martini, N. D., Katerere, D. R. P., Eloff, J. N. (2004). Biological activity of five antibacterial flavonoids from *Combretum erythrophyllum* (Combretaceae). *Journal of Ethnopharmacology* 93: 207-212.
- Markaki, P., Delpont Binet, C., Grosso, F., Dragacci, S. (2001). Determination of ochratoxin A in red wine and vinegar by immunoaffinity high-pressure liquid chromatography. *Journal of Food Protection* 64: 533-537.
- McKeehen, J. D., Busch, R. H., Fulcher, R. G. (1999). Evaluation of wheat (*Triticum aestivum* L.) phenolic acids during grain development and their contribution to *Fusarium* resistance. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 1476-1482.
- Medina, M. L., Kiernan, U. A., Francisco, W. A. (2004). Proteomic analysis of rutin-induced secreted proteins from *Aspergillus flavus*. *Fungal Genetics and Biology* 41: 327-335.

- Medina, A., Mateo, R., Valle-Algarra, F. M., Mateo, E. M., Jiménez, M. (2007). Effect of carbendazim and physicochemical factors on the growth and ochratoxin A production of *Aspergillus carbonarius* isolated from grapes. *International Journal of Food Microbiology* 119: 230-235.
- Meyvaci, K. B., Altindisli, A., Aksoy, U., Eltem, R., Turgut, H., Arasiler, Z., Kartal, N. (2005). Ochratoxin A in sultanas from Turkey I: Survey of unprocessed sultanas from vineyards and packing-houses. *Food Additives and Contaminants* 22: 1138-1143.
- Micco, C., Grossi, M., Miraglia, M., Brera, C. (1989). A study of the contamination by ochratoxin A of green and roasted coffee beans. *Food Additives and Contaminants* 6: 333-339.
- Micco, C., Miraglia, M., Brera, C., Corneli, S., Ambrozzi, A. (1996). Evaluation of ochratoxin A level in human milk in Italy. *Food Additives and Contaminants* 12: 351-354.
- Miraglia, M., Brera, C., Cava, E., Calfapietra, F. (1998). The evaluation of mayor sources of ochratoxin A (OA) intake through the analysis of OA in biological fluids in Italy. *Revue de Médecine Vétérinaire* 149: 711.
- Mitchell, D., Parra, R., Aldred, D., Magan, N. (2004). Water and temperature relations of growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* strains from grapes in Europe and Israel. *Journal of Applied Microbiology* 97: 439-445.
- Morello, L. G., Sartori, D., Oliveira Martinez, A. L., Carneiro Vieira, M. L., Taniwaki, M. H., Pelegrinelli Fungaro, M. H. (2007). Detection and quantification of *Aspergillus westerdijkiae* in coffee beans based on selective amplification of β -tubulin gene by using real-time PCR. *International Journal of Food Microbiology* 119: 270-276.
- Moss, M. (1996). Mode of formation of ochratoxin A. *Food Additives and Contaminants* 13 (Suppl.): 5-9.
- Mühlencoert, E., Mayer, I., Zapf, M. W., Vogel, R. F., Niessen, L. (2004). Production of ochratoxin A by *Aspergillus ochraceus*. *European Journal of Plant Pathology* 110: 651-659.
- Nguefack, J., Leth, V., Amvam Zollo, P. H., Mathur, S. B. (2004). Evaluation of five essential oils from aromatic plants of Cameroon for controlling food spoilage and mycotoxin producing fungi. *International Journal of Food Microbiology* 94: 329-334.
- Norholt, M. D., Van Egmond, H. P., Paulsch, W. E. (1979). Ochratoxin A production by some fungal species in relation to water activity and temperature. *Journal of Food Protection* 42: 485-490.
- Norton, R. A. (1999). Inhibition of aflatoxin B₁ biosynthesis in *Aspergillus flavus* by anthocyanidins and related flavonoids. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 47: 1230-1235.
- Nychas, G. J. E. (1995). Natural antimicrobials from plants. En: *New methods of food preservation* p. 58-59. Gould G. W. (Ed.). Blaxkie Academic & Professional, Glasgow.
- Odhav, B., Naicker, V. (2002). Mycotoxins in South African traditionally brewed beers. *Food Additives and Contaminants* 19: 55-61.

- Ottener, H., Majerus, P. (2000). Occurrence of ochratoxin A (OTA) in wines: influence of the type of wine and its geographical origin. *Food Additives and Contaminants* 17: 793-798.
- Parra, R., Magan, N. (2004). Modelling the effect of temperature and water activity on growth of *Aspergillus niger* strains and applications for food spoilage moulds. *Journal of Applied Microbiology* 97: 429-438.
- Palumbo, J. D., O'Keeffe, T. L., Mahoney, N. E. (2007). Inhibition of ochratoxin A production and growth of *Aspergillus* species by phenolic antioxidant compounds. *Mycopathologia* 164: 241-248.
- Pardo, E., Marín, S., Solsona, A., Sanchis, V., Ramos, A. J. (2004). Modeling of germination and growth of ochratoxigenic isolates of *Aspergillus ochraceus* as affected by water activity and temperature on a barley-based medium. *Food Microbiology* 21: 267-274.
- Pardo, E., Ramos, A. J., Sanchis, V., Marín, S. (2005). Modelling of the effects of water activity and growth of ochratoxigenic isolates of *Aspergillus ochraceus* on a green coffee-based medium. *International Journal of Food Microbiology* 98: 1-9.
- Parenicova, L., Skouboe, P., Samson, R. A., Rossen, L., Visser, J. (2000). Molecular tools for the classification of black *Aspergilli*. En: *Integration of Modern Taxonomic Methods for Penicillium and Aspergillus Classification* p. 413-424. Samson R. A., Pitt J. I. (Eds.). Harwood Academic Publishers, Amsterdam.
- Parenicova, L., Skouboe, P., Frisvad, J., Samson, R. A., Rossen, L., Hoor-Suykerbuyk, M. T., Visser, J. (2001). Combined molecular and biochemical approach identifies *Aspergillus japonicus* and *Aspergillus aculeatus* as two species. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 521-527.
- Paster, N., Lisker, N., Chet, I. (1983). Ochratoxin A production by *Aspergillus ochraceus* Wilhelm growth under controlled atmospheres. *Applied and Environmental Microbiology* 45: 1136-1139.
- Patel, S., Hazel, C. M., Winterton, A. G., Mortby, E. (1996). Survey of ethnic foods for mycotoxins. *Food Additives and Contaminants* 13: 833-841.
- Patel, S. (1997). Survey of ochratoxin A in retail coffees. *Food Additives and Contaminants* 14: 217-222.
- Patriarca, A. (2004). Factores que influyen en la co-producción de aflatoxinas y ácido ciclopiazónico en maní por *Aspergillus* Sección *Flavi*. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.
- Peraica, M., Radic, B., Lucic, A., Fuchs, R., Bosanac, I., Balija, M., Grgicevic, D. (1998). Ochratoxin A in blood of people from regions in Croatia with and without endemic nephropathy. *Revue de Médecine Vétérinaire* 149: 713.
- Petzinger, E., Weindenbach, A. (2002) Mycotoxins in the food chain: the role of ochratoxins. *Livestock Production Science* 76: 245-250.
- Pietri, A., Bertuzzi, T., Pallaroni, L., Piva, G. (2001). Occurrence of ochratoxin A in Italian wines. *Food Additives and Contaminants* 18: 647-654.
- Pitt, J. I. (1987). *Penicillium viridicatum*, *Penicillium verrucosum* and production of ochratoxin A. *Applied and Environmental Microbiology* 53: 266-269.

- Pitt, J. I., Hocking, A. (1997). Fungi and food spoilage. Blackie Academic & Professional, Cambridge.
- Pittet, A. (1998). Natural occurrence of mycotoxins in food and feeds- an update. Review. *Revue de Médecine Vétérinaire* 149: 479-492.
- Puntarić, D., Bošnjir, J., Šmit, Z., Škes, I., Baklaić, Z. (2001). Ochratoxin A in corn and wheat: geographical association with endemic nephropathy. *Croatian Medical Journal* 42: 175-180.
- Ramos, A. J., Labernia, N., Marín, S., Sanchis V., Magan, N. (1998). Effect of water activity and temperature on growth and ochratoxin production by three strains of *Aspergillus ochraceus* on a barley extract medium and on barley grains. *International Journal of Food Microbiology* 44: 133-140.
- Raper, K. B., Fennell, D. I. (1965). The genus *Aspergillus*. Williams & Wilkins Co., Baltimore.
- Rasooli, I., Rezaei, M. B., Allameh, A. (2006). Growth inhibition and morphological alterations of *Aspergillus niger* by essential oils from *Thymus eriocalyx* and *Thymus x-porlock*. *Food Control* 17: 359-364.
- Reguant, C., Bordons, A., Arola, L., Rozès, N. (2000). Influence of phenolic compounds on the physiology of *Enococcus oeni* from wine. *Journal of Applied Microbiology* 88: 1065-1071.
- Rodríguez Vaquero, M. J., Alberto, M. R., Manca de Nadra, M. C. (2007). Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. *Food Control* 18: 93-101.
- Romero, S. M., Comerio, R. M., Larumbe, G., Ritieni, A., Vaamonde, G., Fernández Pinto, V. (2005). Toxigenic fungi isolated from dried vine fruits in Argentina. *International Journal of Food Microbiology* 104: 43-49.
- Rosa, C. A. R., Magnoli, C. E., Fraga, M. E., Dalcero, A. M., Santana, D. M. N. (2004). Occurrence of ochratoxin A in wine and grape juice marketed in Rio de Janeiro, Brazil. *Food Additives and Contaminants* 21: 358-364.
- Sage, L., Krivobok, S., Delbos, E., Seigle-Murandi, F., Creppy, E.E. (2002). Fungal flora and ochratoxin production in grapes and musts from France. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 1306-1311.
- Samapundo, S., De Meulenaer, B., Osei-Nimoh, D., Lamboni, Y., Debevere, J., Devlieghere, F. (2007). Can phenolic compounds be used for the protection of corn from fungal invasion and mycotoxin contamination during storage?. *Food Microbiology* 24: 465-473.
- Samson, R. A., Houbaken, J. A. M. P., Kuijpers, A. F. A., Frank, J. M., Frisvad, J. C. (2004). New ochratoxin A or sclerotium producing species in *Aspergillus* section *Nigri*. *Studies in Mycology* 50: 45-61.
- Scalbert, A. (1991). Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry* 30: 3875-3883.
- Schuster, E., Dunn-Coleman, N., Frisvad, J. C., van Dijck, P. W. M. (2002). On the safety of *Aspergillus niger*— a review. *Applied Microbiology and Biotechnology* 59: 426-435.

Scott, P. M., Kanhere, S. R., Lau, B. P.-Y., Lewis, D. A., Hayward S., Ryan J. J., Kuiper-Goodman, T. (1998). Survey of Canadian human blood plasma for ochratoxin A. *Food Additives and Contaminants* 15: 555-562.

Serra, R., Abrunhosa, L., Kozakiewicz, Z., Venâncio, A. (2003). Black *Aspergillus* species as ochratoxin A producers in Portuguese wine grapes. *International Journal of Food Microbiology* 88: 63-68.

Serra, R., Mendonça, C., Venâncio, A. (2005). Fungi and ochratoxin A detected in healthy grapes for wine production. *Letters in Applied Microbiology* 42: 42-47.

Serra, R., Cabañes, F. J., Perrone, G., Castellá, G., Venâncio, A., Mulè, G., Kozakiewicz (2006). *Aspergillus ibericus*: a new species of section *Nigri* isolated from grapes. *Mycologia* 98: 295-306.

Singleton, V. L., Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16: 144-158.

Siranidou, E., Kang, Z., Buchenauer, H. (2002). Studies on symptom development, phenolic compounds and morphological defence responses in wheat cultivars differing in resistance to *Fusarium* head blight. *Journal of Phytopathology* 150: 200-208.

Skaug, M. (1999). Analysis of Norwegian milk and infant formulas for ochratoxin A. *Food Additives and Contaminants* 16: 75-68.

Slayne, M. A. (2000). Ochratoxin A in food in the UK. *Mycotoxins and phycotoxins in perspective at the turn of the millenium*. Proceedings "International IUPAC symposium on mycotoxins and phycotoxins", Guarujá, Brasil. Koe, W. J., Samson, R. A., Van Egmond, H. P., Gilbert, J., Sabino, M. (Eds.).

Smith, J. E., Moss, M. O. (1985). *Mycotoxins. Formation, analysis and significance*. John Wiley & Sons Ltd.

Soliman, K. M., Badeaa, R. I. (2002). Effect of oil extract from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. *Food and Chemical Toxicology* 40: 1669-1675.

Stefanaki, I., Foufa, E., Tsatsou-Dritsa, A., Dais, P. (2003). Ochratoxin A concentrations in Greek domestic wines and dried vine fruits. *Food Additives and Contaminants* 20: 74-83.

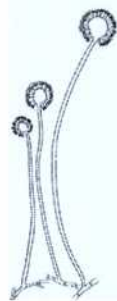
Tafari, A., Ferracane, R., Ritieni, A. (2004). Ochratoxin A in Italian marketed cocoa products. *Food Chemistry* 88: 487-494.

Taniwaki, M. H., Pitt, J. I., Teixeira, A. A., Iamanaka, B. T. (2003). The source of ochratoxin A in Brazilian coffee and its formation in relation to processing methods. *International Journal of Food Microbiology* 82: 173-179.

Téren, J., Varga, J., Hamari, Z., Rinyu, E., Kevei, F. (1996). Immunochemical detection of ochratoxin A in black *Aspergillus* strains. *Mycopathologia* 134: 171-176.

Tjamos, S. E., Antoniou, P. P., Kazantzidou, A., Antonopoulos, D. F., Papageorgiou, I., Tjamos, E. C. (2004). *Aspergillus niger* and *Aspergillus carbonarius* in corinth raisin and wine-producing vineyards in Greece: Population composition, ochratoxin A production and chemical control. *Journal of Phytopathology* 152: 250-255.

- Tsubouchi, H., Terada, H., Yamamoto, K., Hisada, K., Sakabe, Y. (1988). Ochratoxin A found in commercial roast coffee. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 36: 540-542.
- Urbano, G., Taniwaki, M. H., Leitao, M., Vicentini, M. (2001). Occurrence of ochratoxin A-producing fungi in raw Brazilian coffee. *Journal of Food Protection* 64: 1226-1230.
- Vaamonde, G., Fernández Pinto, V. (1993). Influencia de la actividad de agua en el crecimiento del hongo xerofílico *Eurotium herbariorum*. *Revista Argentina de Microbiología* 25: 59-69.
- Valero, A., Farré, J. R., Sanchis, V., Ramos, A. J., Marín, S. (2006). Effects of fungal interaction on ochratoxin A production by *A. carbonarius* at different temperatures and a_w . *International Journal of Food Microbiology* 110: 160-164.
- Van den Brink, P. J., Hattink, J., Bransen, F., Van Donk, E., Brock, T. C. M. (2000). Impact of the fungicide carbendazim in freshwater microcosms. II. Zooplankton, primary producers and final conclusions. *Aquatic Toxicology* 48: 251-264.
- Van der Merwe, K. J., Steyn, P. S., Fourie, L., Scott, D. B., Theron, J. J. (1965). Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. *Nature* 205: 1112-1113.
- Varga, J., Kevei, E., Hamari, Z., Toth, B., Teren, J., Croft, H., Kozakiewicz, Z. (2000a). Genotypic and phenotypic variability among black *Aspergilli*. En: *Integration of Modern Taxonomic Methods for Penicillium and Aspergillus Classification* p. 397-411. Samson R. A., Pitt J. I. (Eds.). Harwood Academic Publishers, Amsterdam.
- Varga, J., Rigó, K., Téren, J. (2000b). Degradation of ochratoxin A by *Aspergillus* species. *International Journal of Food Microbiology* 59: 1-7.
- Varga, J., Kozakiewicz, Z. (2006). Ochratoxin A in grape-derived products. *Trends in Food Science & Technology* 17: 72-81.
- Vega, F. E., Mercadier, G. (1998). Insects, coffee and ochratoxin A. *Florida Entomologist* 81: 543-544.
- Vinson, J. A., Xuehui, S., Zubik, L., Bose, P. (2001). Phenol antioxidant quantity and quality in foods: Fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 5315-5321.
- Vujanovic, V., Smoragiewicz, W., Krzysztyniak, K. (2001). Airborne fungal ecological niche determination as one of the possibilities for indirect mycotoxin risk assessment in indoor air. *Environmental Toxicology* 16: 1-8.
- Weidenbörner, M., Hindorf, H., Chandra Jha, H., Tsotsonos, P. (1990). Antifungal activity of flavonoids against storage fungi of the genus *Aspergillus*. *Phytochemistry* 29: 1103-1105.
- Zimmerli, B., Dick, R. (1995). Determination of ochratoxin A at the ppt level in human blood, serum, milk and some foodstuffs by high-performance liquid chromatography with enhanced fluorescence detection and immunoaffinity column cleanup methodology and Swiss data. *Journal of Chromatography B* 666: 85-99.
- Zimmerli, B., Dick, R. (1996). Ochratoxin A in table wine and grape-juice: occurrence and risk assessment. *Food Additives and Contaminants* 13: 655-668.



Apéndice

APÉNDICE 1. Abreviaturas

ADNmt: Ácido desoxirribonucleico mitocondrial

ADNr: Ácido desoxirribonucleico ribosomal

AFB₁: Aflatoxina B₁.

AMM: *Aspergillus* Minimal Medium

A_w: Actividad de agua

BEN: Nefropatía Endémica de los Balcanes

CYA: Agar Czapek Extracto de Levadura

FDA: Food and Drug Administration

GAE: Equivalentes de Ácido Gálico

GRAS: Generalmente reconocido como seguro

HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Resolución

IARC: International Agency for Research on Cancer

JECFA: Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives

MEA: Agar Extracto de Malta

MIC: Concentración Mínima Inhibitoria

NRRL: Northern Regional Research Laboratory

OTA: Ocratoxina A

PTWI: Ingesta Provisional Semanal Tolerable

RAPD: Random Amplification of Polymorphic DNA

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphisms

YES: Sacarosa Extracto de Levadura

APÉNDICE 2: COMPOSICIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO EMPLEADOS

Agar Czapek Extracto de Levadura (Klich, 2002)

K ₂ HPO ₄	1,0 g
Concentrado Czapek	10 ml
Extracto de levadura	5,0 g
Sacarosa	30,0 g
Agar	15,0 g
Agua destilada	1000 ml

Concentrado Czapek (con metales traza):

NaNO ₃	30,0 g
KCl	5,0 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	5,0 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,1 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,1 g
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,05 g
Agua destilada	100 ml

El pH final es 6,7.

Agar Extracto de Malta (Klich, 2002)

Extracto de malta en polvo	20,0 g
Peptona	1,0 g
Glucosa	20,0 g
Agar	20,0 g
Agua destilada	1000 ml

Ambos medios se esterilizan en autoclave a 121 °C durante 15 min.

APÉNDICE 3: TABLAS DE DATOS

Tabla 1. Velocidades de crecimiento (mm.día^{-1}) de cada placa para las cepas A, B, C y D y el inóculo mixto.

A	B	C	D	A+B+C+D
13,95	14,67	15,45	14,43	15,68
15,19	15,87	15,93	16,03	14,54
15,02	14,60	16,10	15,34	15,62
14,64	15,74	16,11	15,78	15,80
14,39	14,99	16,34	14,52	15,15
14,99	15,32	16,01	14,01	15,47
14,63	15,75	16,19	15,29	15,42
14,76	14,89	14,18	14,31	15,71
14,70±0,40	15,23±0,51	15,79±0,70	14,96±0,74	15,42±0,41

Tabla 2. Fase lag (días) calculadas para cada placa de las cepas A, B, C y D y el inóculo mixto.

A	B	C	D	A+B+C+D
0,30	0,16	0,40	0,35	0,31
0,20	0,35	0,39	0,51	0,33
0,13	0,18	0,60	0,22	0,51
0,25	0,27	0,47	0,29	0,43
0,19	0,35	0,55	0,37	0,55
0,31	0,61	0,48	0,10	0,42
0,30	0,38	0,43	0,19	0,48
0,44	0,31	0,27	0,17	0,57
0,26±0,10	0,33±0,14	0,45±0,10	0,28±0,13	0,45±0,09

Tabla 3. Producción de OTA de cepas A, B, C, D y del inóculo mixto (A+B+C+D).

Cepa	Días	$\mu\text{g OTA.g agar}^{-1}$	Valor promedio $\mu\text{g.g}^{-1}$
A	7	1,34	1,54
		1,20	
		2,08	
	14	2,22	2,33
		2,64	
		2,13	
	21	2,57	2,17
		1,75	
		2,19	
	28	3,36	3,10
		3,28	
		2,68	
B	7	2,52	2,37
		2,37	
		2,23	
	14	4,26	3,66
		3,05	
		3,66	
	21	5,79	5,44
		4,17	
		6,36	
	28	6,34	4,89
		2,72	
		5,60	
C	7	5,46	3,29
		1,63	
		2,76	
	14	6,19	5,66
		5,13	
		5,65	
	21	DP	7,40
		6,87	
		7,93	
	28	4,35	7,75
		8,96	
		9,95	
D	7	0,45	0,68
		0,45	
		1,14	
	14	1,38	1,82
		1,37	
		2,72	
	21	DP	5,57
		5,81	
		5,33	

Tabla 3. Producción de OTA de las cepas A, B, C, D y del inóculo mixto (A+B+C+D) (continuación).

Cepa	Días	$\mu\text{g OTA.g agar}^{-1}$	Valor promedio $\mu\text{g.g}^{-1}$
D	28	1,36	2,36
		3,54	
		2,17	
A+B+C+D	7	1,08	2,00
		2,24	
		2,69	
	14	2,77	4,52
		7,14	
		3,65	
	21	5,67	6,28
		5,22	
		7,94	
	28	3,60	4,35
		3,55	
		5,90	

DP: dato perdido.

Tabla 4. Velocidades de crecimiento (mm.día^{-1}) de cada placa de *A. carbonarius* a las diferentes a_w y temperaturas ($^{\circ}\text{C}$) estudiadas.

A_w	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)				
	35	30	25	20	15
0,95	12,76	17,41	15,09	9,82	5,45
	12,61	17,34	15,29	9,87	5,54
	12,74	17,60	15,41	9,90	5,69
	12,76	17,31	15,00	9,87	5,54
	12,38	17,63	15,36	9,78	5,64
0,925	7,47	9,49	9,42	5,34	3,60
	7,14	9,55	9,82	5,20	3,76
	6,25	9,95	9,68	5,14	3,89
	7,03	10,07	9,53	5,05	4,12
	7,27	9,65	9,37	5,21	3,73
0,90	6,88	7,87	7,04	3,70	NC
	7,28	8,30	6,90	3,82	NC
	7,04	7,89	7,00	3,80	NC
	7,38	7,95	6,87	3,73	NC
	7,39	8,08	6,84	3,66	NC
0,89	2,43	4,28	3,63	0,86	NC
	1,80	4,36	3,82	0,92	NC
	2,33	4,18	3,77	0,94	NC
	3,05	4,02	3,73	0,89	NC
	2,49	4,13	3,66	0,91	NC
0,87	0,82	2,03	1,92	NC	NC
	0,85	2,16	1,57	NC	NC
	0,72	2,09	1,77	NC	NC
	0,72	1,87	1,93	NC	NC
	0,74	2,12	1,80	NC	NC
0,85	NC	0,94	0,71	NC	NC
	NC	0,88	0,41	NC	NC
	NC	0,91	0,40	NC	NC
	NC	0,98	0,47	NC	NC
	NC	1,02	0,37	NC	NC

NC: no creció.

Tabla 5. Fase lag calculada (días) para cada placa de *A. carbonarius* a las diferentes a_w y temperaturas (°C) estudiadas.

A_w	Temperatura (°C)				
	35	30	25	20	15
0,95	0,61	1,01	1,63	2,67	4,58
	0,57	0,98	1,50	2,47	5,47
	0,64	0,98	1,59	2,43	5,21
	0,62	1,01	1,50	2,51	4,68
	0,68	1,04	1,47	2,58	5,21
0,925	0,05	0,65	2,92	5,41	10,97
	0,37	0,71	2,84	5,77	14,22
	0,46	0,95	2,78	5,91	18,48
	0,00	0,81	2,94	5,86	25,29
	0,42	0,85	2,86	5,38	25,97
0,90	1,38	1,66	3,12	8,45	NC
	1,31	2,17	3,04	8,17	NC
	1,29	1,61	2,75	7,35	NC
	1,35	1,72	3,23	9,80	NC
	1,19	2,02	3,07	7,33	NC
0,89	1,76	2,24	3,85	27,25	NC
	4,71	1,45	4,16	33,39	NC
	2,32	1,50	3,64	33,14	NC
	3,43	1,91	4,11	41,12	NC
	3,17	1,42	3,44	33,63	NC
0,87	2,95	4,00	11,93	NC	NC
	2,87	4,94	9,41	NC	NC
	6,69	3,31	9,68	NC	NC
	9,15	3,59	12,30	NC	NC
	10,80	4,10	11,95	NC	NC
0,85	NC	9,44	25,99	NC	NC
	NC	10,68	35,89	NC	NC
	NC	10,62	31,45	NC	NC
	NC	12,63	28,46	NC	NC
	NC	11,92	33,54	NC	NC

NC: no creció.

Tabla 6. Producción de OTA ($\mu\text{g.g}^{-1}$) de cada réplica de *A. carbonarius* a las diferentes a_w y temperaturas estudiadas.

A_w	Tiempo	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)				
		35	30	25	20	15
0,95	7	n.d.	n.d.	0,06	0,45	n.d.
		n.d.	n.d.	0,24	0,15	n.d.
		0,02*	n.d.	0,05	0,51	n.d.
	14	0,38	0,06	0,32	0,46	4,10
		0,79	n.d.	0,20	1,56	6,83
		0,36	0,13	0,19	2,72	3,14
	21	0,84	0,04*	0,48	3,93	13,71
		0,76	0,04*	0,75	1,55	15,33
		0,49	0,16	2,21	0,73	16,20
	28	1,31	0,08	0,22	0,91	24,12
		0,77	0,09	0,18	0,94	9,37
		0,47	0,21	0,29	0,75	29,64
	7	n.d.	n.d.	0,03*	0,04*	NC
		n.d.	n.d.	0,04*	n.d.	NC
		n.d.	n.d.	0,09	n.d.	NC
0,925	14	0,05	n.d.	0,04*	1,39	NC
		n.d.	n.d.	0,04*	0,63	NC
		0,03*	n.d.	0,06	1,32	NC
	21	1,06	n.d.	0,02*	2,21	6,28
		0,34	n.d.	0,08	1,67	10,85
		0,28	n.d.	0,04*	2,01	DP
	28	0,05	n.d.	0,02*	0,63	8,79
		0,05	0,05	n.d.	1,20	0,47
		0,04*	0,06	n.d.	3,02	DP
	7	n.d.	n.d.	n.d.	NC	NC
		n.d.	n.d.	n.d.	NC	NC
		n.d.	n.d.	n.d.	NC	NC
	14	n.d.	n.d.	n.d.	0,02*	NC
		n.d.	n.d.	n.d.	0,03*	NC
		n.d.	n.d.	n.d.	0,03*	NC
0,90	21	n.d.	n.d.	0,03*	2,67	NC
		n.d.	n.d.	n.d.	2,68	NC
		n.d.	n.d.	n.d.	1,44	NC
	28	n.d.	n.d.	n.d.	13,56	NC
		n.d.	n.d.	n.d.	16,69	NC
		n.d.	n.d.	n.d.	20,15	NC
	7	n.d.	n.d.	n.d.	NC	NC
		n.d.	n.d.	n.d.	NC	NC
		n.d.	n.d.	n.d.	NC	NC
	14	n.d.	n.d.	n.d.	NC	NC
		n.d.	n.d.	n.d.	NC	NC
		n.d.	n.d.	n.d.	NC	NC
0,89	7	n.d.	n.d.	n.d.	NC	NC
		n.d.	n.d.	n.d.	NC	NC
		n.d.	n.d.	n.d.	NC	NC
	14	n.d.	n.d.	n.d.	NC	NC
		n.d.	n.d.	n.d.	NC	NC
		n.d.	n.d.	n.d.	NC	NC

Tabla 6. Producción de OTA ($\mu\text{g.g}^{-1}$) de cada réplica de *A. carbonarius* a las diferentes a_w y temperaturas estudiadas (continuación).

A_w	Tiempo	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)				
		35	30	25	20	15
0,89	21	n.d.	n.d.	n.d.	NC	NC
		n.d.	n.d.	0,05	NC	NC
		n.d.	n.d.	DP	NC	NC
	28	n.d.	n.d.	n.d.	NC	NC
		n.d.	n.d.	n.d.	NC	NC
		n.d.	n.d.	n.d.	NC	NC
0,87	7	NC	NC	NC	NC	NC
		NC	NC	NC	NC	NC
		NC	NC	NC	NC	NC
	14	n.d.	n.d.	n.d.	NC	NC
		n.d.	n.d.	n.d.	NC	NC
		n.d.	n.d.	n.d.	NC	NC
	21	n.d.	n.d.	n.d.	NC	NC
		n.d.	n.d.	n.d.	NC	NC
		n.d.	n.d.	n.d.	NC	NC
	28	n.d.	n.d.	n.d.	NC	NC
		n.d.	n.d.	n.d.	NC	NC
		n.d.	n.d.	0,02*	NC	NC
0,85	7	NC	NC	NC	NC	NC
		NC	NC	NC	NC	NC
		NC	NC	NC	NC	NC
	14	NC	NC	NC	NC	NC
		NC	NC	NC	NC	NC
		NC	NC	NC	NC	NC
	21	NC	n.d.	NC	NC	NC
		NC	n.d.	NC	NC	NC
		NC	n.d.	NC	NC	NC
	28	NC	n.d.	NC	NC	NC
		NC	n.d.	NC	NC	NC
		NC	n.d.	NC	NC	NC

NC: no creció, n.d.: no detectado, DP: dato perdido. Límite de detección $0,02 \mu\text{g/g}$, límite de cuantificación $0,05 \mu\text{g/g}$. (*) Si bien se encuentran por debajo del límite de cuantificación se informan los valores calculados en carácter de aproximación.

Tabla 7. Velocidades de crecimiento (mm.día^{-1}) de cada placa de *A. carbonarius* en medio CYA con el agregado del concentrado de vino Merlot.

Control	M. clarificado	Merlot
16,80	28,14	28,50
16,85	27,74	29,77
16,17	28,60	30,31
15,92	27,55	29,86
14,27	28,43	29,56
16,39	28,88	29,93
14,40	28,37	30,18
DP	28,11	30,84

DP: dato perdido, aparición de colonias satélites que impidieron la medición de los diámetros de la colonia.

Tabla 8. Fase lag calculada (días) para cada placa de *A. carbonarius* en medio CYA con el agregado del concentrado de vino Merlot.

Control	M. clarificado	Merlot
0,49	0,61	0,67
0,32	0,61	0,72
0,52	0,60	0,73
0,43	0,61	0,65
0,32	0,66	0,69
0,55	0,61	0,68
0,41	0,62	0,67
DP	0,62	0,64

DP: dato perdido.

Tabla 9. Producción de OTA por duplicado ($\mu\text{g.g}^{-1}$), por *A. carbonarius* en medio CYA con el agregado del concentrado de vino Merlot.

Tiempo (días)	Control*	M. clarificado	Merlot
7	2,92		
	3,46	5,55	2,01
	3,14	6,15	2,91
14	6,21		
	2,10	4,04	1,87
	2,37	3,80	2,67
21	3,00		
	6,83	4,72	3,44
	5,66	6,47	3,04
28	4,67		
	2,09	6,17	2,95
	4,12	7,55	3,33

(*) El control realizado en medio CYA fue analizado por triplicado.

Tabla 10. Velocidades promedio de crecimiento (mm.día⁻¹) y desvío estándar de *A. carbonarius* en medio CYA con los compuestos fenólicos a las diferentes concentraciones ensayadas (mg.l⁻¹).

	A. gálico	A. cafeico	Rutina	Quercetina	Catequina
Control	16,08 ± 0,62	14,23 ± 0,96	14,23 ± 0,96	14,23 ± 0,96	14,23 ± 0,96
50		15,69 ± 1,00	14,40 ± 0,54	14,46 ± 0,47	15,58 ± 0,52
100	13,21 ± 1,13		15,09 ± 0,90	14,53 ± 0,49	
200	12,52 ± 0,86				
250		12,45 ± 1,31	10,51 ± 1,46	11,36 ± 0,64	
300	9,70 ± 2,47				
400					
500	NC	NC	NC	NC	
1000					11,03 ± 1,96
2000					NC

NC: no creció.

Tabla 11. Fase lag calculada (días) y desvío estándar de *A. carbonarius* en medio CYA con los compuestos fenólicos a las diferentes concentraciones ensayadas (mg.l⁻¹).

	A. gálico	A. cafeico	Rutina	Quercetina	Catequina
Control	3,48 ± 0,41	0,22 ± 0,12	0,22 ± 0,12	0,22 ± 0,12	0,22 ± 0,12
50		0,50 ± 0,28	0,19 ± 0,09	0,22 ± 0,04	0,32 ± 0,11
100	7,78 ± 1,40		0,27 ± 0,15	0,25 ± 0,11	
200	14,20 ± 0,24				
250		3,98 ± 1,17	2,96 ± 1,01	5,73 ± 1,15	
300	15,24 ± 2,61				
400					
500	NC	NC	NC	NC	
1000					9,96 ± 1,16
2000					NC

Tabla 12. Producción de OTA por duplicado (µg.g⁻¹), por *A. carbonarius* en medio CYA con ácido gálico a las diferentes concentraciones ensayadas (mg.l⁻¹) y en el control con etanol.

Tiempo (días)	Control	100	200	300
7	0,74	NC	NC	NC
	3,75	NC	NC	NC
14	4,59	0,05	0,00	NC
	8,38	0,11	0,00	NC
21	7,13	0,80	0,07	NC
	5,14	0,16	0,02	NC
28	8,36	2,82	0,89	0,11
	4,43	1,55	0,37	0,61

NC: no creció.

Tabla 13. Producción de OTA ($\mu\text{g.g}^{-1}$) por duplicado, por *A. carbonarius* en medio CYA con ácido cafeico a las diferentes concentraciones ensayadas (mg.l^{-1}) y en el control con etanol.

Tiempo (días)	Control	50	250
7	2,00	1,36	0,80
	3,39	2,22	0,14
14	3,34	7,16	0,92
	4,71	3,88	0,72
21	7,67	3,05	3,13
	4,39	6,33	4,44
28	4,76	7,57	4,11
	6,59	5,98	2,70

Tabla 14. Producción de OTA por duplicado ($\mu\text{g.g}^{-1}$), por *A. carbonarius* en medio CYA con rutina y quercetina a las diferentes concentraciones ensayadas (mg.l^{-1}) y en el control con etanol.

Tiempo (días)	Control	Rutina			Quercetina		
		50	100	250	50	100	250
7	2,00	1,58	0,95	0,05	1,04	2,73	0,40
	3,39	2,40	1,72	0,03	1,58	1,96	0,54
14	3,34	2,96	3,40	0,27	2,08	1,32	0,39
	4,71	3,93	6,21	0,65	2,97	2,10	0,03
21	7,67	4,59	4,79	1,44	3,38	1,97	1,26
	4,39	3,34	8,94	1,43	4,03	1,97	0,72
28	4,76	3,39	5,33	1,90	7,47	4,05	1,02
	6,59	1,32	4,80	2,70	7,21	4,05	0,30

Tabla 15. Producción de OTA por duplicado ($\mu\text{g.g}^{-1}$), por *A. carbonarius* en medio CYA con catequina a las diferentes concentraciones ensayadas (mg.l^{-1}) y en el control con etanol.

Tiempo (días)	Control	50	1000
7	2,00	3,51	NC
	3,39	2,72	NC
14	3,34	4,66	0,68
	4,71	6,97	1,30
21	7,67	3,17	0,76
	4,39	5,34	0,39
28	4,76	5,90	0,80
	6,59	5,35	1,24

APÉNDICE 4: TABLAS DE ANÁLISIS DE VARIANZA

Tabla 16. Análisis de varianza de las velocidades de crecimiento de 4 cepas de *A. carbonarius* y un inóculo mixto.

Fuente de variación	Grados de libertad	SS	MS	F
Cepa	4	5,64	1,41	4,32*
Error	35	11,42	0,33	
Total	39	17,06		

SS: suma de cuadrados, MS: media de cuadrados. (*): significativo $p < 0,01$.

Tabla 17. Análisis de varianza de las fases lag de 4 cepas de *A. carbonarius* y un inóculo mixto.

Fuente de variación	Grados de libertad	SS	MS	F
Cepa	4	0,26	0,07	5,05*
Error	35	0,46	0,01	
Total	39	0,72		

SS: suma de cuadrados, MS: media de cuadrados. (*): significativo $p < 0,01$.

Tabla 18. Análisis de varianza de la producción de OTA de 4 cepas de *A. carbonarius* y un inóculo mixto.

Fuente de variación	Grados de libertad	SS	MS	F
Cepa	4	99,23	24,81	15,04*
Tiempo	3	88,46	29,49	17,88*
Cepa - Tiempo	12	28,34	2,36	1,43 ^{ns}
Error	38	62,69	1,65	
Total	57			

SS: suma de cuadrados, MS: media de cuadrados. (*): significativo $p < 0,0001$. ^{ns}: no significativo.

Tabla 19. Análisis de varianza sobre el efecto de la a_w , temperatura y su interacción sobre la velocidad de crecimiento de *A. carbonarius*.

Fuente de variación	Grados de libertad	SS	MS	F
Temperatura	4	601,35	150,34	5395,18*
a_w	5	2528,14	505,63	18145,60*
Temperatura - a_w	20	275,34	13,76	494,07*
Error	120	3,34	0,03	
Total	149	3408,17		

SS: suma de cuadrados, MS: media de cuadrados. (*): significativo $p < 0,0001$.

Tabla 20. Análisis de varianza del efecto de la a_w , temperatura y su interacción sobre la fase lag de *A. carbonarius*.

Fuente de variación	Grados de libertad	SS	MS	F
Temperatura	4	91914	22978,50	6669,34*
a_w	5	77225	15445,00	4482,80*
Temperatura - a_w	20	72432,7	3621,60	1051,15*
Error	120	413	3,40	
Total	149	241985		

SS: suma de cuadrados, MS: media de cuadrados. (*): significativo $p < 0,0001$.

Tabla 21. Análisis de varianza del efecto de la a_w , temperatura, tiempo de incubación y su interacción sobre la producción de OTA por *A. carbonarius*.

Fuente de variación	Grados de libertad	SS	MS	F
Temperatura	4	400,63	100,16	50,64*
a_w	3	190,84	63,61	32,17*
Tiempo	3	199,43	66,48	33,61*
Temperatura - a_w	12	799,47	66,62	33,69*
Temperatura - tiempo	12	331,87	27,66	13,98*
a_w - Tiempo	9	158,23	17,59	8,89*
Temperatura - a_w - Tiempo	36	875,48	24,32	12,30*
Error	158	312,48	1,98	
Total	237			

SS: suma de cuadrados, MS: media de cuadrados. (*): significativo $p < 0,0001$.

Tabla 22. Análisis de varianza del efecto de los concentrados de vino sobre la velocidad de crecimiento de *A. carbonarius*.

Fuente de variación	Grados de libertad	SS	MS	F
Tratamiento	2	861,76	430,88	752,09*
Error	20	11,46	0,57	
Total	22			

SS: suma de cuadrados, MS: media de cuadrados. (*): significativo $p < 0,0001$.

Tabla 23. Análisis de varianza del efecto de los concentrados de vino sobre la fase lag de *A. carbonarius*.

Fuente de variación	Grados de libertad	SS	MS	F
Tratamiento	2	0,24	0,12	40,39*
Error	20	0,06	0,00	
Total	22			

SS: suma de cuadrados, MS: media de cuadrados. (*): significativo $p < 0,0001$.

Tabla 24. Análisis de varianza del efecto de los concentrados de vino, el tiempo de incubación y su interacción sobre la producción de OTA por *A. carbonarius*.

Fuente de variación	Grados de libertad	SS	MS	F
Tratamiento	2	31,45	15,72	9,79*
Tiempo	3	8,84	2,95	1,84 ^{ns}
Tratamiento - Tiempo	6	8,36	1,39	0,87 ^{ns}
Error	16	25,68	1,61	
Total	27			

SS: suma de cuadrados, MS: media de cuadrados. (*): significativo $p < 0,01$. ^{ns}: no significativo.

Tabla 25. Análisis de varianza del efecto del ácido gálico sobre la velocidad de crecimiento de *A. carbonarius*.

Fuente de variación	Grados de libertad	SS	MS	F
Tratamiento	4	1097,91	274,48	263,36*
Error	25	26,06	1,04	
Total	29			

SS: suma de cuadrados, MS: media de cuadrados. (*): significativo $p < 0,0001$.

Tabla 26. Análisis de varianza del efecto del ácido gálico sobre la fase lag de *A. carbonarius*.

Fuente de variación	Grados de libertad	SS	MS	F
Tratamiento	4	2981,97	745,49	652,53*
Error	25	28,56	1,14	
Total	29			

SS: suma de cuadrados, MS: media de cuadrados. (*): significativo $p < 0,0001$.

Tabla 27. Análisis de varianza del efecto del ácido gálico, el tiempo de incubación y su interacción sobre la producción de OTA por *A. carbonarius*.

Fuente de variación	Grados de libertad	SS	MS	F
Tratamiento	3	151,68	50,56	35,65*
Tiempo	3	13,67	4,55	3,21 ^{ns}
Tratamiento - Tiempo	9	18,62	2,06	1,46 ^{ns}
Error	16	22,69	1,42	
Total	31	206,65		

SS: suma de cuadrados, MS: media de cuadrados. (*): significativo $p < 0,0001$. ^{ns}: no significativo.

Tabla 28. Análisis de varianza del efecto del ácido cafeico sobre la velocidad de crecimiento de *A. carbonarius*.

Fuente de variación	Grados de libertad	SS	MS	F
Tratamiento	3	1110,90	370,30	419,74*
Error	26	22,94	0,88	
Total	29			

SS: suma de cuadrados, MS: media de cuadrados. (*): significativo $p < 0,0001$.

Tabla 29. Análisis de varianza del efecto del ácido cafeico sobre la fase lag de *A. carbonarius*.

Fuente de variación	Grados de libertad	SS	MS	F
Tratamiento	6	4435,30	1478,43	4315,61*
Error	26	8,91	0,34	
Total	29			

SS: suma de cuadrados, MS: media de cuadrados. (*): significativo $p < 0,0001$.

Tabla 30. Análisis de varianza del efecto del ácido cafeico, el tiempo de incubación y su interacción sobre la producción de OTA por *A. carbonarius*.

Fuente de variación	Grados de libertad	SS	MS	F
Tratamiento	2	34,17	17,08	8,75*
Tiempo	3	48,06	16,02	8,20*
Tratamiento - Tiempo	6	10,82	1,80	0,92 ^{ns}
Error	12	23,44	1,95	
Total	23	116,49		

SS: suma de cuadrados, MS: media de cuadrados. (*): significativo $p < 0,01$, ^{ns}: no significativo.

Tabla 31. Análisis de varianza del efecto de rutina y quercetina sobre la velocidad de crecimiento de *A. carbonarius*.

Fuente de variación	Grados de libertad	SS	MS	F
Tratamiento	4	2279,11	569,77	960,71*
Compuesto	1	0,09	0,09	0,15 ^{ns}
Tratamiento – Compuesto	4	3,54	0,89	1,49 ^{ns}
Error		38,55	0,59	
Total	65			

SS: suma de cuadrados, MS: media de cuadrados. (*): significativo $p < 0,0001$.

Tabla 32. Análisis de varianza del efecto de rutina y quercetina sobre la fase lag de *A. carbonarius*.

Fuente de variación	Grados de libertad	SS	MS	F
Tratamiento	4	9680,04	2420,01	11932,8*
Compuesto	1	5,78	5,78	28,52*
Tratamiento – Compuesto	4	20,64	5,16	25,45*
Error	65	13,18	0,20	
Total	74			

SS: suma de cuadrados, MS: media de cuadrados. (*): significativo $p < 0,0001$.

Tabla 33. Análisis de varianza del efecto de rutina y quercetina, el tiempo de incubación y su interacción sobre la producción de OTA por *A. carbonarius*.

Fuente de variación	Grados de libertad	SS	MS	F
Tratamiento	3	123,01	41,00	35,55*
Compuesto	1	2,87	2,87	2,49 ^{ns}
Tiempo	3	65,57	21,86	18,95*
Tratamiento - Compuesto	3	16,46	5,49	4,76**
Tratamiento - Tiempo	9	8,73	0,97	0,84 ^{ns}
Compuesto - Tiempo	3	11,02	3,67	3,19 ^{ns}
Tratamiento – Compuesto - Tiempo	9	34,60	3,84	3,33**
Error	32	36,90	1,15	
Total	63	299,17		

SS: suma de cuadrados, MS: media de cuadrados. (*): significativo $p < 0,0001$, (**): significativo $p < 0,01$.
^{ns}: no significativo.

Tabla 34. Análisis de varianza del efecto de la catequina sobre la velocidad de crecimiento de *A. carbonarius*.

Fuente de variación	Grados de libertad	SS	MS	F
Tratamiento	3	1063,70	354,57	399,46*
Error	22	19,53	0,89	
Total	25			

SS: suma de cuadrados, MS: media de cuadrados. (*): significativo $p < 0,0001$.

Tabla 35. Análisis de varianza del efecto de la catequina sobre la fase lag de *A. carbonarius*.

Fuente de variación	Grados de libertad	SS	MS	F
Tratamiento	3	4233,53	1411,18	491,23*
Error	22	63,20	2,87	
Total	25			

SS: suma de cuadrados, MS: media de cuadrados. (*): significativo $p < 0,0001$.

Tabla 36. Análisis de varianza del efecto de la catequina, el tiempo de incubación y su interacción sobre la producción de OTA por *A. carbonarius*.

Fuente de variación	Grados de libertad	SS	MS	F
Tratamiento	2	85,72	42,86	34,75 [*]
Tiempo	3	16,24	5,41	4,39 ^{ns}
Tratamiento - Tiempo	6	9,06	1,51	1,22 ^{ns}
Error	12	14,80	1,23	
Total	23	125,82		

SS: suma de cuadrados, MS: media de cuadrados. (*): significativo $p < 0,0001$.

FE DE ERRATAS

Página 20, Fig. I.3: El ácido cafeico posee los grupos hidroxilos en la posición 3, 4 y no en 3, 5.