

Tesis Doctoral

# Factores que afectan el contenido de patulina y fumonisinas durante el procesamiento de alimentos

Funes, Gustavo Javier

2011

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

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

Cita tipo APA:

Funes, Gustavo Javier. (2011). Factores que afectan el contenido de patulina y fumonisinas durante el procesamiento de alimentos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Funes, Gustavo Javier. "Factores que afectan el contenido de patulina y fumonisinas durante el procesamiento de alimentos". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2011.

**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 Industrias**

**Factores que afectan el contenido de patulina y fumonisinas durante el  
procesamiento de alimentos.**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en  
el área Química Industrial

**Gustavo Javier Funes**

Director de tesis: Silvia Liliana Resnik  
Consejero de estudios: Silvia Liliana Resnik

Lugar de trabajo:  
Departamento de Industrias Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de  
Buenos Aires.  
Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad  
de Buenos Aires  
Fundación de Investigaciones Científicas Teresa Benedicta de la Cruz, Dorronzoro 141,  
Luján, Argentina

Buenos Aires, 2011

## FACTORES QUE AFECTAN EL CONTENIDO DE PATULINA Y FUMONISINAS DURANTE EL PROCESAMIENTO DE ALIMENTOS

Las micotoxinas, son contaminantes naturales que afectan la producción de alimentos, provocando fuertes impactos económicos y sobre la salud humana y animal. Se realizó el primer estudio de ocurrencia natural de patulina en productos sólidos y semisólidos, elaborados con manaza y pera. Para ello se desarrolló y validó una metodología de análisis. El 21 % de los productos analizados presentaban contaminación. El puré de manzana fue el producto mas contaminado con el 50% de muestras positivas y con un nivel máximo de 221  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .

Se procedió a aplicar una metodología emergente, luz pulsada con el fin de bajar la contaminación de patulina. La aplicación de esta técnica por 10 segundos permitió reducir un 49% la contaminación de patulina en pure de manzana y un 60% en jugos de manzana.

Las fumonisinas afectan principalmente al maíz. Se estudió como se modifica el nivel de contaminación al procesarse el maíz por molienda húmeda a escala planta piloto y en una planta industrial. Se cuantificó las fumonisinas libres en los productos obtenidos. Se realizó un balance de masa mostrando una pérdida entre el 85-99 % de las fumonisinas que se encontraban originalmente en el maíz.

Se estudió la posibilidad que esta reducción se deba a la transformación de las fumonisinas en alguno de sus derivados. Se desarrolló metodología para determinar fumonisinas unidas e hidrolizadas en harina de maíz y en un producto extrudado. Al realizar un balance entre las fumonisinas totales presentes en el maíz y las presentes

en el chizito, se encontró mayor cantidad en el maíz, lo cual indicaría que la reducción de fumonisinas libres no se debería a una hidrólisis o unión a la matriz.

Palabras claves: patulina, fumonisinas, molienda húmeda de maíz, luz pulsada, puré de manzana.

## FACTORS THAT AFFECT THE PATULIN AND FUMONISINS CONTENT IN FOOD PROCESSING

Mycotoxins, are natural contaminants that affect food production, causing heavy impacts on economic and animal and human health.

The first study of natural occurrence of Patulin was conducted in solid and semi-solid products made with apple and pear. For this purpose it has been developed and validated a methodology of analysis.

This study showed contamination on the 21% of the analyzed products. The apple puree was the most contaminated product with 50% of positive samples and a maximum level of 221  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .

A new methodology was conducted, the use of pulsed light to reduce patulin contamination. The use of this light for 10 seconds reduces a 49% the contamination of Patulin in apple puree and 60% in apple juice.

The fumonisins mainly affect maize. It was studied the changes on the level of contamination while the corn was processed by wet milling in a pilot scale and in an industrial plant. The amount of fumonisins in the final products was quantified and a loss between 85-99% of fumonisins was found.

The possibility that this reduction is due to the transformation of the fumonisins in any of its derivatives was studied.

A methodology to determine fumonisins and hydrolysed fumonisins in corn flour and in an extruded product was developed. In the study it was compared the amount of fumonisins in corn and in corn puff. It was found that in maize the

concentration of fumonisins was higher than in the corn puff. This indicates that free fumonisins reduction should not be because the hydrolysis or the union to the matrix.

Keywords: Patulin, fumonisins, wet milling of corn, pulsed light, apple puree

Siempre es de noche, sino no necesitaríamos luz.

**T. Monk**

La noche es LA NOCHE y por más plata que tengas, sino tenes talento, la  
noche es solo oscuridad.

**F. Posca**

Sobald das Geld im Kasten klingt, Die Seele aus dem Hölle Fegefeuer springt

**Proverbio aleman**

## **Agradecimientos**

A la Dra. Silvia L. Resnik, por su invaluable paciencia y por brindarme toda su confianza y libertad para investigar, jugar y aprender en este hermoso mundo de la ciencia.

A la Dra. Ana Pacin, por su ayuda y enorme colaboración, sin ella esta tesis no hubiera podido llevarse a cabo.

Al Dr. Constantino Suarez, por permitirme dar los primeros pasos en el camino de la investigación.

A la empresa Ledesma y todo el personal de la planta Glucovil Argentina S.A. (Villa Mercedes - San Luis), planta de molienda húmeda de maíz que proveyó todas las muestras de la escala industrial de esta tesis.

Al Ing. Aníbal Álvarez, de CAFAGDA (Camara Argentina de fructosas, almidones, glucosas, derivados y afines), por su inestimable colaboración.

A la Bqca. Patricia Knass, de Agrinea, por el estímulo que le dio a esta tesis al proveer de las columnas de extracción en fase sólida con la cual se desarrollo la metodología para determinar patulina.

A Paula Salas, Marcela Reynoso, Francisco (el Pancho) Federico, Víctor García Londoño, por la calidez de su compañía, por el enorme valor que fue tenerlos como colegas, consejeros y orejas, deseo que toda persona tenga compañeros de trabajo como ustedes.

A Gabriela Cano, Daniela Taglieri y Emilia Ciancio Bovier, sin ustedes tres, este trabajo nunca hubiera visto la luz y sin su amistad yo sería un poco peor persona.

A las chicas de micro, Andrea Patriarca, Paula Quintana, Stella Romero, Andrea Astoreca, Marianella Sánchez, Graciela Leiva y Carolina Schebor, por su incondicional amistad, sus consejos y su aguante.

Al Lic. Carlos F. Somoza, por tantos años de mates al lado del HPLC.

A la Dra. Mónica Haros, por agarrar un estudiante de la licenciatura y convertirlo en un investigador, por su amistad, por sus consejos, sin vos nada de esto hubiera sido posible.

A mis viejos y mi hermana, por estar siempre en las buenas y en las malas.

Al Dr. Marcelo Bello, por ser EL AMIGO que necesito.

Que largo se hizo, pero llego el postre, a Leonardo y Lourdes, mi hijo y mi compañera, motores de mi vida, mojones en este largo camino de vivir.

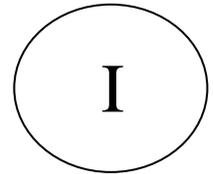
A mis tres L, sostenes de mi vida, amores de mi vida, la luz que necesito

# ÍNDICE

<b>I. MICOTOXINAS - ANTECEDENTES HISTÓRICOS</b>	<b>1</b>
<b>I.1 PATULINA</b>	<b>7</b>
<b>I.1.1. Propiedades físico-químicas</b>	<b>7</b>
<b>I.1.2. Especies productoras de patulina</b>	<b>8</b>
<b>I.1.3. Toxicidad</b>	<b>10</b>
I.1.3.1. Absorción, distribución y excreción	10
I.1.3.2. Estudios de toxicidad aguda	11
I.1.3.3. Estudios de inmunotoxicidad	13
I.1.3.4. Toxicidad reproductiva y teratogenicidad	14
I.1.3.5. Estudios de genotoxicidad	14
I.1.3.6. Estudios de carcinogenicidad	15
I.1.3.7. Mecanismos de toxicidad	15
I.1.3.8. Aspectos regulatorios	18
<b>I.1.4. Ocurrencia natural</b>	<b>19</b>
<b>I.1.5. Metodología analítica - Antecedentes bibliográficos</b>	<b>23</b>
<b>I.1.6. Procesos y su estabilidad frente a ellos</b>	<b>25</b>
<b>I.1.7. Luz pulsada</b>	<b>31</b>
<b>I.2. FUMONISINAS</b>	<b>33</b>
<b>I.2.1. Propiedades físico-químicas</b>	<b>36</b>
<b>I.2.2. Especies productoras de fumonisinas</b>	<b>39</b>
<b>I.2.3. Toxicidad</b>	<b>41</b>
I.2.3.1. Mecanismos de actividad bioquímica	42
I.2.3.2. Efectos en los seres humanos - Cáncer Esofágico	45
I.2.3.3. Defectos del tubo neural.	46
I.2.3.4. Leucoencefalomacia en equinos (LEM)	47
I.2.3.5. Edema pulmonar porcino	49
<b>I.2.4. Ocurrencia natural</b>	<b>50</b>
<b>I.2.5. Procesos y su estabilidad frente a ellos</b>	<b>53</b>
<b>I.2.6. Molienda seca y molienda húmeda de maíz</b>	<b>58</b>
I.2.6.1. Maiz	58
I.2.6.2. Molienda seca	60
I.2.6.3. Molienda húmeda	63
<b>II. OBJETIVOS</b>	<b>66</b>
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
<b>III.1. PATULINA</b>	<b>67</b>
<b>III.1.1. Materiales</b>	<b>67</b>
<b>III.1.2. Estándares</b>	<b>67</b>
III.1.2.1. Curvas de calibración	68
<b>III.1.3. Características de las muestras</b>	<b>69</b>
<b>III.1.4. Metodología analítica</b>	<b>70</b>
III.1.4.1. Preparación de las muestras	70
III.1.4.2. Cromatografía líquida	71

III.1.4.3.	Confirmación de las muestras positivas	72
III.1.4.4.	Recuperación, límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ)	73
<b>III.1.5.</b>	<b>Utilización de luz pulsada</b>	74
III.1.5.1.	Descripción del equipo de luz pulsada	74
III.1.5.2.	Cálculo de la dosis irradiada	75
III.1.5.3.	Medición de la evolución de la temperatura	76
III.1.5.4.	Tratamiento con luz pulsada	76
<b>III.2.</b>	<b>FUMONISINAS</b>	78
<b>III.2.1.</b>	<b>Materiales</b>	78
<b>III.2.2.</b>	<b>Estándares</b>	78
III.2.2.1.	Obtención de estándares de los hidrolizados de fumonisinas	79
<b>III.2.3.</b>	<b>Muestras</b>	80
III.2.3.1.	Molienda húmeda escala planta piloto	81
III.2.3.2.	Molienda húmeda escala planta industrial	83
III.2.3.3.	Proceso de elaboración de chizitos	85
<b>III.2.4.</b>	<b>Determinación y análisis</b>	87
III.2.4.1.	Extracción y limpieza de fumonisinas libres	87
III.2.4.1.1.	Muestras de maíz y harina de maíz	87
III.2.4.1.2.	Fracciones de la molienda húmeda de maíz	90
III.2.4.1.3.	Chizitos	90
III.2.4.2.	Extracción y limpieza de fumonisinas totales	91
III.2.4.2.1.	Muestras de harina de maíz	91
III.2.4.2.2.	Chizitos	92
III.2.4.3.	Cromatografía líquida	93
III.2.4.4.	Recuperación, LOD y LOQ, de las metodologías aplicadas	94
<b>IV.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	96
<b>IV.1.</b>	<b>PATULINA</b>	96
<b>IV.1.1.</b>	<b>Metodología analítica</b>	96
IV.1.1.1.	Comportamiento de la columna de extracción en fase sólida	96
IV.1.1.2.	Volumen de resuspensión de los extractos	97
IV.1.1.3.	Volumen de solventes de extracción y masa de muestra	98
IV.1.1.4.	Utilización de una digestión enzimática	99
IV.1.1.5.	Curva de calibración	101
IV.1.1.6.	Limites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ)	102
IV.1.1.7.	Cromatografía y confirmación de muestras positivas	103
IV.1.1.8.	Comparación de la metodología utilizada con la presente en la bibliografía	105
<b>IV.1.2.</b>	<b>Ocurrencia natural de patulina</b>	110
<b>IV.1.3.</b>	<b>Decontaminación de patulina por tratamiento con luz pulsada</b>	112
IV.1.3.1.	Dosis en la cabina de luz pulsada	113
IV.1.3.2.	Reducción de la contaminación inicial de patulina en soluciones modelos	114
IV.1.3.3.	Reducción de la contaminación de patulina en puré de	117

	manzana contaminado naturalmente	
	IV.1.3.4. Reducción de la contaminación de patulina en jugo de manzana clarificado	118
<b>IV.1.4.</b>	<b>Discusión</b>	120
<b>IV.2.</b>	<b>FUMONISINAS</b>	124
<b>IV.2.1.</b>	<b>Metodología analítica</b>	124
	IV.2.1.1. Fumonisinas libres	124
	IV.2.1.1.1. Fumonisinas	124
	IV. 2.1.1.2. Fumonisinas totalmente hidrolizadas	128
	IV.2.1.2. Fumonisinas unidas	133
	IV.2.1.2.1. Fumonisinas unidas en chizitos	133
	IV.2.1.2.2. Fumonisinas unidas en maíz	141
	IV.2.1.3. Recuperación en las distintas matrices	144
	IV.2.1.3.1. Recuperación de fumonisinas libres.	144
	IV.2.1.3.2. Recuperación de fumonisinas unidas.	147
	IV.2.1.4. Curvas de calibración y límites de detección y cuantificación.	148
<b>IV.2.2.</b>	<b>Ocurrencia natural - Distribución / reducción en el proceso de molienda húmeda</b>	150
<b>IV.2.3.</b>	<b>Fumonisinas hidrolizadas y fumonisinas unidas en la elaboración de chizitos.</b>	156
<b>IV.3.</b>	<b>Discusión</b>	157
<b>V.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	161
<b>VI.</b>	<b>REFERENCIAS</b>	163
	<b>ANEXOS</b>	



# **Micotoxinas - Antecedentes históricos**

Las micotoxinas son productos naturales de bajo peso molecular, metabolitos secundarios de ciertos hongos filamentosos (hongos toxicogénicos). Estos compuestos constituyen un grupo muy heterogéneo desde el punto de vista toxicológico y químico; estos metabolitos son peligrosos tanto para humanos como para animales. La ingesta de alimentos contaminados con estos productos resultaron en brotes de enfermedades agudas denominadas micotoxicosis y también en daños crónicos a menudo no reconocidos como enfermedades producidas por la ingesta de micotoxinas (Dutton, 1996).

Hasta el momento no se pudo dilucidar la función específica de estos compuestos, lo que se sabe es que a los hongos productores les otorgan ventajas competitivas contra otros microorganismos por el sustrato alimenticio o aumentan su capacidad patogénica sobre los hospedadores. Son muy activas frente a plantas, animales y microorganismos inhibiendo su crecimiento y reproducción y compitiendo por el hábitat y sus nutrientes (Bennett y Klich, 2003; Jestoi y col., 2004).

Micotoxicosis es la enfermedad causada por la ingesta de alguno de estos metabolitos secundarios. Bennet y Klich (2003) definen la micotoxicosis como un ejemplo de “envenenamiento por medios naturales”, haciéndola así análoga a las patologías causadas por intoxicación con pesticidas o residuos de metales pesados.

Los síntomas de la micotoxicosis dependen de:

- El tipo de micotoxina
- La cantidad y duración de la exposición
- La edad, salud y sexo de la persona expuesta

Se conoce muy poco sobre los efectos sinérgicos que pueden llegar a tener la genética, la dieta y la interacción con otros tóxicos.

Prácticamente no hay tratamientos para la exposición a micotoxinas. La mayoría de las micotoxicosis resultan de la ingesta de comidas contaminadas y exceptuando una terapia de soporte de acuerdo a los síntomas, un cambio en la alimentación es la única medida adecuada.

Los efectos de las micotoxinas están bien documentados a través de la historia. El egotismo fue reportado en la Edad Media, pero no fue hasta el principio de 1960 cuando las micotoxinas fueron reconocidas como potenciales causas de enfermedades. Este reconocimiento surgió cuando se desencadenó una epidemia en pavos en Inglaterra en 1961 y se descubrió que el causal de ésta fueron las aflatoxinas (Sargeant y col., 1961).

Cuando fueron descubiertas las aflatoxinas, se comenzó a analizar un amplio rango de hongos en búsqueda de toxinas. Hasta 1984 se habían reportado más de 240 metabolitos fúngicos que tenían propiedades tóxicas en animales o en cultivos de células animales (Dutton, 1996).

Dentro de los hongos toxicogénicos se encuentran los géneros *Fusarium* y *Penicillium*, con capacidad de producir una gran cantidad de estos metabolitos secundarios que pueden provocar diferentes respuestas fisiológicas y farmacológicas en plantas y animales (Nelson y col., 1993).

*Penicillium expansum* es considerado el mayor productor de patulina en alimentos, en particular en frutos de cáscara blanda como manzana. Se reportó como productor de más de 59 metabolitos secundarios tales como citrinina, ácido

ciclopiazónico, ácido penicílico, ocratoxina A, aflatrem, brevianamida A, chaetoglobosina A y C, expansolidas A y B, alcohol gentisyl, griseofulvin, ácido micofenólico, penitrem A, PR-toxina, fenol Raistrick, roquefortina C y rubratoxina B, pero estudios recientes sugieren que el rango de metabolitos encontrados en alimentos es más limitado (patulina, citrinina, chaetoglobosina, roquefortina). La citrinina también producida por el *P. expansum* tiene capacidad sinergista en la toxicidad de la patulina, lo cual hace necesario un examen para analizar la presencia de esta especie en alimentos (Jackson y Dombrink-Kurtzman, 2006).

El *P. expansum* está involucrado en la mayoría de los problemas de putrefacción en manzanas y peras y es el mayor productor de patulina en jugos de manzana y otros productos de manzana y pera, también pudiendo afectar otras frutas tales como tomate, frutilla, palta, banana, mango, uva, durazno y damasco (Jackson y Dombrink-Kurtzman, 2006). Asociada comúnmente con las áreas de descomposición, la patulina puede penetrar aproximadamente 1 cm alrededor de la zona afectada, sin embargo no se detectó la misma cuando se midió a 2 cm de distancia del área afectada por *P. expansum* (Trucksess y Tang, 1999; Fernández-Cruz y col., 2010). Se encuentra en frutas que exhiben pudrición marrón; la presencia de esta pudrición indica que el uso de estas partes en los procesamientos llevará a una casi segura presencia de la toxina en el producto final.

El *P. expansum* es un hongo psicrófilo cuya temperatura óptima es alrededor de los 25 °C, existiendo reportes que se obtuvo crecimiento de colonias aún a -3 °C. La mínima actividad de agua para la germinación es 0,82-0,83, tiene bajo requerimiento de oxígeno, debido a esto se encontraron colonias en atmósferas con

niveles de oxígeno menores al 2% y hasta un 15% de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). El rango de temperatura para el crecimiento de esta especie y para la producción de patulina es de 0-24 °C y la mínima actividad de agua (a<sub>w</sub>) para la producción de la toxina es de 0,99. Estas características son las que explican el hallazgo de *P. expansum* y patulina en manzanas almacenadas bajo condiciones de atmósfera modificada. Dicho hongo y sus esporas generalmente son destruidas en procesos que incluyen calor como la pasteurización de jugos, en cambio otras especies productoras de patulina como *Byssochlamys fulva* y *B. nivea* producen esporas resistentes a procesos con temperaturas de 90 °C. En consecuencia, es posible que se encuentre patulina y ácido micofenólico en jugos pasteurizados y almacenados si dichas esporas logran germinar (Frisvad y col., 2006; Jackson y Dombrink-Kurtzman, 2006; Fernández-Cruz y col., 2010).

El género *Fusarium* es conocido como productor de una gran cantidad de micotoxinas, como por ejemplo: zearalenona, tricotecenos tipo A y B, moniliformina, fumonisinas, beauvericina y fusarina (Nelson y col., 1993; Jackson y Jablonski, 2004; Krska y col., 2007).

Dentro del género *Fusarium* el *F. verticillioides* (nombre actual del *F. moniliforme*, teleomorfo *Gibberella moniliformis*) es la especie de mayor importancia económica, debido a que puede crecer en forma endógena en el maíz. Se lo encuentra prácticamente como contaminante de todas las muestras de dicho cereal. Se aisló este hongo aún en granos que aparentaban estar sanos, ya que el hongo puede causar infección tanto asintomática como presentando síntomas. De ocurrir esto último, los daños se ven tanto en la mazorca como en los granos: presencia de enmohecimiento

de color blanco, rosa, salmón o marrón. La sola presencia de este hongo no da por hecho encontrar toxinas en los granos, la presencia de micotoxinas no tiene una correlación con la cantidad de contaminación fúngica. Altas concentraciones de fumonisinas se reportaron en granos aparentemente sanos (Bullerman, 1996; Marasas, 2001; Bennet y Klich, 2003; Jackson y Jablonski, 2004).

Se sospecha que *F. verticillioides* está involucrado en enfermedades de animales y humanos, según descripciones encontradas del año 1904, por el hecho de estar en casi la totalidad del maíz cosechado. Se lo describió en una época como “toxicosis de maíz hongueado” (*moldy corn toxicosis*; Nelson y col., 1993). Este hongo es el que predomina en los aislados de maíz en el año 1970, asociados con la leucoencefalomacia en equinos (ELEM) en Sudáfrica, enfermedad caracterizada por una licuefacción necrótica de la materia blanca de los hemisferios cerebrales en caballos (Marasas, 2001). El rol del *F. verticillioides* en esta enfermedad fue confirmado con posteriores aislados del hongo, y cambios distintivos de ciertas patologías características que indicaban que el *F. verticillioides* puede ser un hongo carcinogénico (Kellerman y col., 1972; Marasas y col., 1976).

Posteriormente, fue involucrado en el estudio del posible rol de las toxinas fúngicas, en la etiología del cáncer esofageal humano (EC), en la región de Transkei en Sudáfrica. La incidencia del EC tanto en hombres como mujeres en el sur de esta región está entre las más altas del mundo, incluso más alta que en la zona norte. La diferencia se encuentra en la dieta en base a maíz, cultivado en forma particular en cada casa y a que el *F. verticillioides* se mostró como el hongo prevalente en los granos

consumidos en estas regiones de alta incidencia del EC (Jaskiewicz y col., 1987; Makaula y col., 1996).

Investigaciones toxicológicas sobre el *F. verticillioides*, asociado al ELEM y al EC (designado *F. verticillioides* MRC 826), encontraron que provocaba edema pulmonar en porcinos (EPP) y una alta hepatotoxicidad y cardiotoxicidad en ratas (Marasas y col., 1984). Todo esto indicaba la presencia de, hasta ese momento, uno o varios compuestos carcinogénicos producidos por *F. verticillioides*, y que se encontraba presente no sólo en los aislados de este hongo sino también en el maíz, no sólo en Sudáfrica, ya que se estaban reportando epidemias de ELEM en Estados Unidos que implicaban la ingesta de este cereal. El mayor componente aislado a partir de *F. verticillioides* MRC 826 en maíz fue designado como fumonisina B<sub>1</sub> “FB<sub>1</sub>”, la elucidación de la estructura, conjunta a la demostración de actividad biológica de éstos, fue la culminación de décadas de estudio y el comienzo de otra nueva etapa (Nelson y col., 1993; Marasas, 2001; Jackson y Jablonski, 2004).

La otra especie de *Fusarium*, asociado mayormente a la contaminación de fumonisinas en maíz, es *F. proliferatum* (Bullerman, 1996).

A pesar que *F. verticillioides* y *F. proliferatum* se consideran las especies más importantes en la producción de fumonisinas, por su amplia distribución mundial y alta capacidad de producción de esta micotoxina, otras especies incluidas *F. nygamai*, *F. acutatum*, *F. begoniae*, *F. brevicatenuatum*, *F. phyllophilum*, *F. napiforme*, *F. sacchari*, *F. fujikuroi*, *F. subglutinans*, *F. thapsinum*, *F. anthophilum*, *F. globosum*, *F. dlamini*, *F. andiyazi*, *F. pseudonygamai*, *F. oxysporum* y *F. polyphialidicum*, son capaces de producir

fumonisinias pero sólo bajo condiciones muy cuidadosamente definidas (Rheeder y col., 2002; Jackson y Jablonski, 2004).

## **I.1. PATULINA**

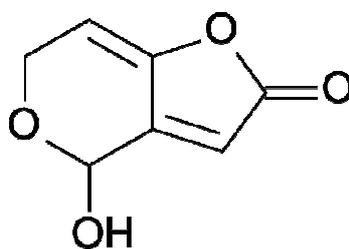
Los primeros estudios sobre patulina (PAT) datan de la década del 40 del siglo XX, cuando se la aisló por primera vez a partir de *Penicillium patulum* (nombre actual: *Penicillium griseofuuum*) y se le encontró a este compuesto actividad antimicrobiana. Por su capacidad de inhibir más de 75 especies de bacterias, tanto Gram positivas como Gram negativas, se estudió la posibilidad de su utilización como antibiótico. Durante esta década los estudios sólo tendían a su uso con fines medicinales. Fue probada como tratamiento de un simple resfrío, hasta como en unguento para curar infecciones micóticas, pero los estudios en animales revelaron que, sumada a su capacidad antimicrobiana, posee efectos tóxicos (Jackson y Dombrink-Kurtzman, 2006; Lee y Röschenthaler, 1986).

Los estudios de las propiedades toxicológicas realizados en patulina mostraron que originaba síntomas agudos en animales y también posible genotoxicidad, inmunotoxicidad y efectos teratogénicos.

### **I.1.1. Propiedades físico-químicas**

La patulina es una lactona (4-hidroxi-4H-furo[3,2-c]piran-2(6H)-uno), producida por más de 60 especies de hongos filamentosos (Figura I.1),

**Figura I.1.** Estructura de la patulina



Las propiedades físico-químicas estudiadas incluyen la de formar cristales incoloros, de un peso molecular de 154 Dalton y un punto de fusión de 111 °C. Es soluble en agua, etanol, acetona, acetato de etilo, éter etílico y cloroformo, e insoluble en benceno y éter de petróleo. Su espectro UV-Vis presenta un máximo de absorbancia en 276 nm.

### **I.1.2. Especies productoras de patulina**

Entre las principales especies productoras de patulina se encuentran *Aspergillus clavatus*, *A. giganteus*, *A. terreus*, *Byssochlamys fulva*, *B. nivea*, *Paecilomyces variotii*, *Penicillium carnuem*, *P. claviforme*, *P. clavigerum*, *P. concentricum*, *P. coprobium*, *P. cyclopium*, *P. cyaneo-fulvum*, *P. dipomycola*, *P. equinum*, *P. expansum*, *P. gladicola*, *P. granularum* (*P. divergens*) *P. griseofulvum*, *P. lanosum*, *P. lapidosum*, *P. melinii*, *P. novae-zeelandiae*, *P. roqueforti*, *P. sclerotignum* y *P. vulpinum* (Harrison, 1989; Jackson y Dombrink-Kurtzman, 2006).

*P. expansum* es la principal especie productora de patulina y es el hongo encontrado con mayor frecuencia en la flora contaminante de las manzanas destinadas a la producción de jugos (Welke y col., 2010). Esta especie también produce los compuestos tóxicos chaetoglobosina A y C, communesinas, roquefortina

C y a menudo también puede producir citrinina (Andersen y Frisvad, 2004; Andersen y col. 2004). *Byssochlamys nivea*, otro de los hongos productores de patulina, puede estar presente en los zumos de frutas pasteurizados, debido a la gran resistencia de este hongo a los tratamientos térmicos y puede también tener la capacidad de producir ácido micofenólico (Puel y col., 2005).

En estudios de capacidad toxicogénica con *P. expansum*, *P. urticae* y *B. nivea*, se observó producción de patulina en duraznos, piñas, bananas, fresas, melones, tomates, pepinos y zanahorias entre las frutas y vegetales, como así también en cebada inoculada con *Aspergillus clavatus* (Kawashima y col., 2002).

*P. griseofulvum* posee una alta capacidad toxicogénica y puede producir esta toxina en cereales. *P. carneum* y *P. paneum* son capaces de sintetizarla en cerveza, vino, productos cárnicos y pan de centeno, ya que se han encontrado dichos hongos en estos sustratos, pero todavía no hay ningún informe sobre la ocurrencia natural de patulina por estas especies en los alimentos citados. *P. carneum* también puede producir ácido micofenólico, roquefortina C y penitrem A (Frisvad y col., 2004, 2006).

*P. dipodomyicola* es un productor eficiente y se lo ha encontrado en el arroz en Australia y en mezclas de balanceados para pollos en Eslovaquia, pero tiene una incidencia esporádica (Frisvad y col., 2007b)

Los hongos coprofílicos *P. concentricum*, *P. clavigerum*, *P. coprobium*, *P. formosanum*, *P. glandicola*, *P. vulpinum*, *A. clavatus*, *A. longivesica* y *A. giganteus* son productores muy eficientes de patulina en el laboratorio, pero sólo *A. clavatus* puede desempeñar algún papel importante respecto de la salud humana, ya que puede

estar presente en la cerveza de malta pudiendo producir patulina y citocalasina E (López-Díaz y Flannigan, 1997).

Laidou y col. (2001) informaron que *Alternaria alternata* tiene la capacidad de producir patulina, resultado también mencionado por Drusch y Ragab (2003). Las conclusiones expuestas por Frisvad y col. (2007b), del trabajo de Andersen en la Universidad Técnica de Dinamarca, contradicen a los autores mencionados anteriormente, pues no encuentran patulina en ningún extracto de diversas cepas de *Alternaria*.

### **I.1.3. Toxicidad**

Durante la década del cuarenta, en el transcurso de la 2ª Guerra Mundial y pocos años después que se descubriera la penicilina, bioquímicos londinenses informaron a la Royal Navy acerca de otro producto extraído de otro *Penicillium*, *P. patulinum*, que resulto beneficioso en la cura de resfriados comunes (D'Arcy Hart, 1999).

Tal como fuera mencionado anteriormente, se estudió la patulina como posible antibiótico debido a su capacidad antimicrobiana, pero a esto posteriores estudios en animales le sumaron actividad toxicológica y se la clasificó como micotoxina.

#### **I.1.3.1. Absorción, distribución y excreción**

Estudios realizados por Dailey y col. (1977a), donde administraron a ratones en su dieta una sola dosis de una solución de buffer citrato con una concentración de

3 mg/kg de peso corporal de  $^{14}\text{C}$  patulina, mostraron que después de 7 días se recupera aproximadamente el 49% por heces y 36% por orina. La mayor excreción ocurre dentro de las primeras 24 h. Al final de los 7 días, 2-3% de la radioactividad se observa en tejidos blandos y sangre. La mayor retención del  $^{14}\text{C}$  se encontró en eritrocitos y órganos ricos en sangre como el bazo, el riñón, el pulmón y el hígado.

La patulina se degrada rápidamente después de la absorción en el tracto gastrointestinal y probablemente la toxicidad sea sólo a nivel local (Baert y col., 2006).

#### **I.1.3.2. Estudios de toxicidad aguda**

En la Tabla I.1 se ven expresados los valores de toxicidad aguda, mostrando los valores de dosis letal 50 (LD50).

Camguilhem y col. (1976), estudiaron los efectos de una intoxicación aguda en ovejas. Se les administró por vía oral extractos de cultivos de *Byssochlamys nivea* conteniendo patulina, la administración se realizó por medio de jeringa o por medio de un tubo esofageal, en dosis de 15 a 50 mg/kg de peso corporal y obtuvieron como resultado que la administración utilizando jeringas producía la muerte de los animales cinco horas después, con las dosis de 20 mg/kg, mientras que una dosis de 50 mg al utilizar el tubo esofageal, sólo dio lugar a algunos problemas temporales y leves.

**Tabla I.1.** Toxicidad aguda - LD50 (*adaptado de la monografía 689. JECFA [Joint Expert Committee on Food Additives], 1996. Patulin, WHO Food Additives Series 26*)

Especies	Sexo	Ruta	LD50(mg/kg p.c. <sup>1</sup> )
<i>Ratón</i>	M <sub>5</sub>	Oral	29-48
	H <sub>6</sub>		46,31
	MyH		17
	M	i.p. <sup>2</sup>	5,7-8,17
	H		10,85
	MyH		7,6
	MyH	i.v. <sup>3</sup>	8,57
M	10		
<i>Rata</i>	M	Oral	30,53-55,0
	H		27,79
	MyH		108-118
	M	i.p.	4,59-10,0
<i>Ratas animales recién nacidos</i>	H	Oral	5,70
	MyH		6,8
<i>Ratas animales recién destetados</i>	MyH	i.p.	5,9
	M	i.v.	8,57
	M	s.c. <sup>4</sup>	11,0
<i>Hamster</i>	M	Oral	31,5
		i.p.	10
		s.c.	23

<sup>1</sup> p.c. peso corporal,

<sup>2</sup> i.p. intra peritoneal

<sup>3</sup> i.v. intra venoso

<sup>4</sup> s.c. subcutáneo

<sup>5</sup> macho

<sup>6</sup> hembra

Restani (2003), exhibe resultados de Obrazhei del año 1987, en éstos se muestran detalles de toxicidad aguda en cerdos. En animales de 17-20 días se les administró patulina por vía oral, en dosis únicas de 2,5 mg/kg y 5 mg/kg de peso corporal, observando que las dosis menores inducen intoxicación aguda, mientras que las dosis altas fueron letales.

Estudios en gallos fueron realizados por Lovett (1972), después de un día de ayuno, distintas dosis de patulina fueron agregadas en los alimentos de gallos White Leghorn, dando como resultado un LD50 de 170 mg/kg de alimento.

Los efectos anatomopatológicos que se detectan en los distintos animales estudiados son lesiones en el tracto gastrointestinal, degeneración del epitelio, hemorragia y ulceración de la mucosa gástrica, así como lesiones en cerebro, congestión de órganos viscerales, hepática, necrosis renal y edema de pulmones (Becci y col., 1981; Jackson y Dombrink-Kurtzman, 2006; McKinley y Carlton, 1980; McKinley y col., 1982; Speijers y col., 1988).

### **I.1.3.3. Estudios de inmunotoxicidad**

Los estudios de inmunotoxicidad mostraron que a dosis relativamente altas, la patulina deprime el sistema inmunológico, con efectos que van desde la citotoxicidad en macrófagos alveolares detectados en ratas, a los aumentos de los neutrófilos (Escoula y col., 1988; Jackson y Dombrink-Kurtzman, 2006; Sorenson y col., 1985). Llewellyn y col. (1998) encontraron que, después de 28 días de exposición oral con zumo de manzana, con niveles comparables a la exposición humana (los autores tomaron el valor estimado de ingesta diaria en infantes 1,06 mg/kg/día, lo extrapolaron a ratones, administrando 1,272 mg/kg/día), esta ingesta en ratones hembra B6C3F1, no presentaba efectos tóxicos para el sistema inmune.

#### **I.1.3.4. Toxicidad reproductiva y teratogenicidad**

Los resultados de ensayos de toxicidad en la reproducción y teratogenicidad en ratones, ratas y embriones de pollo, indican que la patulina posee efecto teratogénico.

Se obtuvieron efectos embriotóxicos en estudios sobre huevos de pollo cuando se inyectó en la cámara de aire de dichos huevos niveles de 2,35-68,7 µg/huevo, dependiendo de la edad de los embriones, y efectos teratogénicos cuando los niveles fueron de 1 a 2 µg/huevo. Estos estudios dieron una amplia variedad de efectos, predominando patas aplastadas y rotaciones anómalas en las alas (Ciegler y col., 1976).

Al administrarse vía intraperitoneal en dosis de 3,8 mg/kg peso corporal/día en ratones hembra, a los días 12 y 13 de gestación, se provocó un aumento en la incidencia de paladar hendido y malformación de los riñones de los fetos en desarrollo (Roll y col., 1990).

#### **I.1.3.5. Estudios de genotoxicidad**

Pese a no mostrar mutagenicidad en ensayos bacteriológicos como el test de Ames, la patulina demostró, en diferentes estudios, producir daños a nivel de cromosoma en los sistemas de animales mamíferos. La inducción de daño cromosómico y la formación de micronúcleos en células de mamíferos sugieren una posible propiedad clastogénica de la patulina. También se han reportado inhibidas las síntesis de ácidos nucleicos y de proteínas (Alves y col., 2000; Cooray y col., 1982; JECFA, 1996; Liu y col., 2003; Roll y col., 1990; Sorenson y col., 1986).

### **I.1.3.6. Estudios de carcinogenicidad**

Los estudios de carcinogenicidad, no dan resultados claros en cuanto a si la patulina es una sustancia cancerígena (IARC, 1986).

En niveles de patulina de 4,348  $\mu\text{mol/ml}$ , se reportó que *in vitro* en preparados de hígado de ratas se inhibe la actividad de RNA polimerasa I y II dependiente de ADN, en un 29 y 84 % respectivamente (Tashiro y col., 1979).

Cuando se administró vía subcutánea en ratas, dosis de 0,2 mg en 0,5 ml de aceite de maní, dos veces por semana, durante 15 meses, se observó que inducía sarcomas en los sitios de inyección (Dickens y Jones, 1961). No obstante, en estudios a largo plazo, cuando la patulina fue administrada vía oral por sonda, en dosis de 1 mg/kg peso corporal por 4 semanas y 2,5 mg/kg peso corporal por las siguientes 70 semanas (dosis total: 358 mg/kg peso corporal de patulina), no se observaron efectos en el peso y en la supervivencia, como tampoco se observaron diferencias en la incidencia de tumores (Osswald y col., 1978).

La International Agency for Research on Cancer en su revisión 40 (IARC, 1986) concluyó que no podría hacerse una evaluación de la carcinogenicidad para los seres humanos y que no había pruebas suficientes en animales de experimentación y la clasificó como agente del grupo 3. Los agentes incluidos en este grupo no pueden ser clasificados como sustancias cancerígenas en humanos.

### **I.1.3.7. Mecanismos de toxicidad**

Los mecanismos de toxicidad celular, *in vivo* o *in vitro*, no están claros. Se sabe que altera las funciones al nivel de la membrana plasmática, en los cultivos de células

de hígado, riñón y cerebro de ratones, inhibiendo la actividad de ATPasa Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> (Phillips y Hayes, 1977; 1978). El compuesto también inhibe la biosíntesis de varias enzimas claves como la RNA polimerasa y aminoacil-tRNA (Arafat y col., 1985; Riley y col., 1990; Riley y Showker, 1991).

Un estudio llevado a cabo con ratones, a los que se administró por vía intraperitoneal 100 µg de patulina, en días alternados durante un mes, permitió observar que la reducción en la actividad de: ATPasa, NaKATPasa y fosfatasa alcalina, provoca no sólo la reducción intestinal de la absorción de glicina, alanina y lisina marcadas, sino también la inhibición enzimática de acetilcolinesterasa y NaKATPasa en el hemisferio cerebral, cerebelo y médula oblonga ocasionando convulsiones, temblores, falta de coordinación en la locomoción, rigidez en los miembros traseros y movimientos en la cabeza (Devaraj y col., 1982).

Braunberg y col (1982) concluyeron que PAT interfiere en el ciclo de Krebs al medir la capacidad de convertir <sup>14</sup>C glucosa en <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> de las células provenientes de tejidos de riñón de ratas.

Un grupo de 10 ratas alimentadas con dieta regular, dieta infectada con *P. patulum*, o inyectadas por vía intraperitoneal con patulina purificada (1 mg/kg peso corporal, en días alternados) durante 3 meses, permitió observar un incremento rápido de los niveles de glucosa y los test de tolerancia de glucosa revelaron una curva elevada con reducida producción de insulina. Cuando fueron inyectados ratones albinos machos con 10 dosis de 0,1 mg de patulina en propilenglicol en días alternados, se mostró activación del glucógeno fosforilasa en el hígado e incremento

de 60% en niveles de glucosa en sangre. Algunos autores concluyen que la patulina es diabetogénica (Devaraj y col., 1986).

La patulina, debido a su naturaleza electrofílica, reacciona rápidamente con nucleófilos celulares en los compuestos que contienen sulfhidrilo, como la cisteína y el glutatión. El modo de acción de la patulina puede ser a través de la oxidación de grupos sulfhidrilo en las membranas celulares o de estos grupos componentes de las enzimas. Los autores concuerdan que la acción que determina estos efectos enzimáticos es la capacidad de la patulina de modificar los grupos sulfhidrilos de las proteínas. Aductos de patulina formados con cisteína o glutatión presentaron menor toxicidad que el compuesto sin modificar (JECFA, 1996; Fliege y Metzler, 2000; Lindroth y von Wright, 1978; Riley y Showker, 1991).

*En resumen, se puede concluir que:*

En ratas, la mayor parte de la dosis administrada se elimina dentro de las 48 h por heces y orina. No se identificaron otros metabolitos y menos del 2% todavía está presente después de 7 días de administrada, asociada principalmente con los eritrocitos (Dailey y col., 1977a).

La patulina tiene gran afinidad con los grupos sulfhidrilos, esta afinidad explica la capacidad inhibitoria en la mayoría de las enzimas. Forma aductos tóxicos con la cisteína que son menos tóxicos que el compuesto no modificado (Lindroth y von Wright, 1978; Riley y Showker, 1991).

En los estudios de toxicidad aguda y a corto plazo, la patulina causa hiperemia gastrointestinal, distensión, hemorragias y ulceraciones. Es de destacar

que los monos Pigtail toleraron el consumo de patulina arriba de 0,5 mg/kg de peso corporal/día durante 4 semanas sin efectos adversos (Garza y col., 1977).

Los estudios de reproducción no mostraron efectos reproductivos o teratogénicos, a niveles mayores de 1,5 mg/kg de peso corporal/día, pero se tuvo un incremento en la reabsorción fetal (muerte temprana del embrión durante el período fetal, con la lisis y la reabsorción completa de todos los productos de la concepción) en niveles más altos, indicando propiedades embriotóxicas de esta toxina (Dailey y col., 1977b).

#### **I.1.3.8. Aspectos regulatorios**

Basándose en los resultados de toxicidad reproductiva y los estudios de toxicidad a largo plazo con animales, el Joint Expert Committee in Food Additives (JECFA, 1996) estableció una ingesta máxima provisoria diaria de patulina de 0,4 µg/kg de peso corporal.

Por lo menos diez países han establecido niveles de acción de 50 µg/l para la patulina en zumo de manzana, y varios han establecido límites más bajos (25 a 35 µg/l). En el año 2005, la World Trade Organisation de la CEE propuso los siguientes límites: 50 µg/kg para jugos de manzana y otras bebidas que tengan como ingrediente jugo de manzana, 50 µg/kg para bebidas espirituosas como sidra u otras bebidas obtenidas a partir del fermento de manzana, 25 µg/kg para productos sólidos como compota o puré de manzana. La Comisión Europea, en el año 2003, introdujo un límite separado para alimentos para bebés e infantes, quienes consumen altas cantidades de alimentos basado en frutas, comparados con el consumo en los

adultos, fijando en 10 µg/kg, el límite para alimentos de manzana destinados a este grupo (Boozzaijer y col., 2005; Drusch y Ragab, 2003; van Egmond, 1989).

Es de destacar, que se ha planteado en numerosas reuniones, la necesidad de limitar aún más los niveles mencionados para bebés e infantes, debido a que este sector es un gran consumidor de productos con manzana en su formulación como puré o papillas de esta fruta.

#### **I.1.4. Ocurrencia natural**

A continuación se presenta un resumen de los estudios de ocurrencia natural de patulina en distintas zonas del mundo. La Tabla I.2, muestra los valores de contaminación por patulina en jugos de manzana y, en la Tabla I.3, fueron colocados los alimentos en base a frutas, donde se encontró presencia de esta micotoxina.

En jugo de manzana 57,4% de las muestras analizadas (un total de 4633) presentaban contaminación, con valores medios de 1,4 (Suecia) hasta 70,6 µg/kg (Italia) y con un máximo de 1150 µg/kg; el 96,0% de las muestras (1175) de jugos de manzana concentrados, presentaban contaminación con valores medios que van de 3,2 (Noruega) a 161,49 µg/kg (Austria), un máximo de 1227 µg/kg.

El puré de manzana, presentó el 7,2% de las 97 muestras de fueron positivas, con una media de 1,6 (Suecia) a 10 µg/kg (Alemania) y un máximo de 86 µg/kg. En el caso de alimentos para bebe el 13,8% de 312 muestras dieron resultados positivos, con valores entre 0,2 µg/kg (Italia) a 68 µg/kg (Alemania) y una media de contaminación en el rango de 0,55 (Italia) a 11,7 µg/kg (Alemania).

**Tabla I.2.** Contaminación en jugos de manzana

Año	Nivel (ppb)	Nº muestras o Nº pos/Nº muestras	Max. (ppb)	Prom. (ppb)	Media (ppb)	País	Bibliografía
1993	<20	5				Turquía	Gökmen y Acar (1996)
	20-50	13					
	>50	2					
1999			3,03			Italia	Beretta y col. (2000)
2001		36/43	38,8	9,0	6,0	Belgica	Tangni y col. (2003)
2002		2640/4633	1150 (Italia)	1,4 (Suecia)/70,6 (Italia)			Scoop 3.2.8 (2002)
2003		3/143	10			Japón	Watanabe y Shimizu (2005)
2003-2004		16/33	53,4	3,14	0,07	Italia	Piemontese y col. (2005)
2003-2004		25/53	47,91	9,32	1,39	Italia	Spadaro y col. (2007)
2005		22/177		22,2 (de las +)		Bélgica	Baert y col. (2006)
2007/2009		28/68	42			Portugal	Barreira y col. (2010)

Con posterioridad Tangni y col. (2003) estudiaron la contaminación en bebidas elaboradas con manzana, jugos y sidras en Italia, obteniendo un 81% de los jugos contaminados con una media de 9,0 µg/l y un 43% de las sidras contaminadas con una media de 3,4 µg/l. Spadaro y col. (2007) analizaron la incidencia y el nivel de contaminación por patulina en purés y jugos mezcla de manzana que se encuentran en los mercados italianos; observaron que el 34,8% del total de las muestras dieron positivas, con una media de 6,42 µg/kg y un máximo de 55,41 µg/kg de patulina.

**Tabla I.3.** Contaminación de otros productos distintos al jugo de manzana común

Producto	Año	N° muestras o N° pos/N° muestras	Max. (ppb)	Prom. (ppb)	Media (ppb)	País	Bibliografía
<i>Manzana</i>	1992		267	220		Brasil	de Sylos y Rodriguez-Amaya (1999)
<i>Pera</i>	-		245	196			
<i>Durazno</i>	1993-1994		174	120			
<i>Alimentos para bebé</i>	2000		6,39			Italia	Beretta y col. (2000)
<i>Jugos orgánicos</i>			28,24				
<i>Jugos con pulpa</i>			1150				
<i>Sidra</i>	2001	3/4	6,1	3,4	2,8	Bélgica	Tangni y col. (2003)
<i>Jugo de manzana conc.</i>	2002	1128/1175	1227 (Austria)	3,2 (Noruega)/161,49 (Austria)		UE	Scoop 3.2.8 (2002)
<i>Sidra</i>		126/339	1604 (Francia)	0,83 (España)/1,5-2,8 (Francia)			
<i>Jugo de pera</i>		17/100	91 (Alemania)	2,5 (Alemania)/14,3 (Alemania)			
<i>Jugo de uva</i>		128/324	750 (Austria)	4,3 (Alemania)/23,97 (Austria)			
<i>Puré de manzana</i>		7/97	86 (Francia)	1,4 (Suecia)/10 (Alemania)			
<i>Otros purés</i>		0/50					
<i>Alimento para bebés</i>		43/312	68 (Alemania)	0,55 (Italia)/11,7 (Alemania)			
<i>Jugo de pera</i>	2003	1/7	1,1	0,22	0,07	Italia	Piemontese y col. (2005)
<i>Otros jugos</i>	-	8/45	1,7	0,19	0,07		
<i>Puré de frutas</i>	2004	1/15	0,7	0,11	0,07		
<i>Mezcla de jugos</i>	2003-2004	22/82	55,41	4,54	0,27	Italia	Spadaro y col. (2007)
<i>Jugos comunes</i>		35/98	44,89	4,77	0,77		
<i>Jugos Orgánicos</i>		12/37	55,41	10,92	0,8		

Producto	Año	Nº muestras o Nº posit	Max. (ppb)	Prom. (ppb)	Media (ppb)	País	Bibliografía
<i>Jugos con más de 50% de fruta</i>		25/52	55,41	11,26	1,31		
<i>Jugos con menos de 50% de fruta</i>		22/83	44,89	3,35	0,69		
<i>Jugo Clarificado</i>	2006	54/58	121	29,2		Irán	Karimi y col. (2008)
<i>Jugos clarificados</i>	2007 / 2009	32	5,5			Portugal	Barreira y col. (2010)
<i>Jugos Orgánicos</i>		35	9,2				
<i>Puré de manzana</i>		76	5,7				

Recientemente Fernández-Cruz y col. (2010) realizaron una recopilación a nivel mundial de los datos de ocurrencia natural de patulina, tanto en productos de manzana como otras frutas susceptibles de presentar contaminación por esta micotoxina (Tabla I.4).

Gökmen y col. (2005) plantean que la mayor exposición de las personas a la patulina es por la ingestión de jugos de manzanas que fueron producidos con frutos que se desprendieron naturalmente del árbol y fueron recogidos del suelo.

No existen hasta el momento estudios de ocurrencia de patulina en productos sólidos o semisólidos comercializados en Argentina.

**Tabla I.4.** Ocurrencia natural de patulina a nivel mundial (*adaptado de Fernández Cruz y col., 2010*)

Producto	Positivos/total	Concentración máxima	Rango de concentración
<i>Manzanas con putrefacción visible</i>	30/30	1000 µg/kg	2-11, 3000 µg/kg
<i>Residuos de manzana</i>	30/30	300 µg/kg	
<i>Arándanos</i>	1/12	21 µg/kg	
<i>Cerezas</i>	9/10	113 µg/kg	
<i>Frutillas</i>	8/10	145 µg/kg	
<i>Frambuesas</i>	3/5	746 µg/kg	
<i>Jugo de manzana</i>	3-100%	Media 1-140 µg/l	0,5-1150 µg /l
<i>Jugo de manzana conc.</i>	78-100%	7-376 µg /l	
<i>Sidra de molinos</i>	19%	36,9 µg /l	4.6-467,4 µg /l
<i>Sidra en botellas</i>	28%	24,2 µg /l	15,3-35,2 µg /l

### I.1.5. Metodología analítica - Antecedentes Bibliográficos

En la bibliografía se encontraron metodologías analíticas para la determinación de patulina casi exclusivamente para su análisis en jugos de manzana (Baert y col., 2007; Boonzaaijer y col., 2005; Iha y Sabino, 2006; MacDonald y col., 2000).

La metodología analítica presenta, dependiendo de la matriz a analizar, diferencias en los solventes para la extracción, etapas en la limpieza y utilización de pasos previos para mejorar la extracción.

Debido a que la mayor exposición viene dada por la ingestión de jugos de manzanas, se encuentran ampliamente difundidos los métodos para determinar patulina en estas bebidas. Estas técnicas utilizan para la extracción de esta micotoxina, acetato de etilo (AcEt), o una combinación de éste con hexano. Toman

una cantidad dada de jugo de manzana, adicionan el solvente orgánico inmiscible con el agua y realizan una extracción líquido-líquido, repiten este paso las veces que consideren necesarias hasta obtener una recuperación óptima. Se concentran los extractos y se determina y cuantifica la toxina utilizando un cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC), un ejemplo de ello es el método publicado por el *Journal of AOAC* realizado por Iha y Sabino (2006), donde validan una técnica para jugos de manzanas en esta línea.

Baert y col. (2007) demostraron que la utilización previa de pectinasa es imprescindible para mejorar la recuperación en matrices rica en pectina donde la patulina se encuentra atrapada. Esto sucede en los jugos que no sufrieron un proceso de clarificación.

Respecto a matrices distintas al jugo de manzana, MacDonald y col. (2000) publicaron un estudio colaborativo, donde desarrollaron un método en puré de manzana para analizar la contaminación natural por patulina, con una incubación con enzima pectinasa previa a la extracción con solventes. En esta misma dirección, Boonzaaijer y col. (2005) publicaron un estudio donde determinaron el contenido de patulina en productos como alimento para bebés y puré de manzana, aparte de los jugos de manzana y al igual que MacDonald y col. (2000) realizaron una hidrólisis enzimática previa a la extracción. En las dos publicaciones citadas desarrollan una metodología de extracción que aplicaron tanto para el caso del análisis de jugos como para los productos sólidos mencionados, donde adicionan, luego de la extracción, un paso de limpieza con columnas de extracción en fase sólida (SPE).

La forma de determinar y cuantificar la presencia de patulina, luego de todos los pasos que se realizaron en la preparación de la muestra, es casi exclusivamente por medio de HPLC con detección con UV-Vis.

En el momento de empezar con la puesta a punto de la metodología de extracción de patulina se encontró el trabajo publicado por Li y col. (2007) donde utilizan, para jugos de manzana, una extracción con una mezcla de agua/ACN y el extracto sucio obtenido es purificado pasándolo por una columna SPE Multisep® 228 AflaPat Multifunctional Columns (Romer Labs®, US). Esta técnica, con la utilización de esta columna de limpieza, tiene como resultado extractos con menos interferencias y lleva una disminución en la cantidad de solventes utilizados en la extracción.

Los límites de detección y cuantificación, de las metodologías mencionadas, se encuentran en el rango de 0,23 y 15,0  $\mu\text{g}/\text{l}$  para jugos de manzana y para productos sólidos o semisólidos elaborados con manzana 0,3 y 5,0  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (Marín y col., 2011).

Sólo se encontró en la bibliografía la descripción de una metodología analítica para patulina que consideraran mermeladas y dulces de manzana, con altos límites de detección y utilizando cromatografía en placa delgada (TLC), para la determinación y cuantificación de esta toxina (Lindroth y Niskanen, 1978).

#### **I.1.6. Procesos y su estabilidad frente a ellos**

Por la alta frecuencia en que se encuentra la patulina en jugos de manzana y jugos de manzana concentrados (57-96 % según distintos estudios de ocurrencia), Fernández-Cruz y col. (2010) plantean que es necesario el desarrollo de técnicas en el

ámbito industrial que permitan controlar y reducir la incidencia y el nivel de contaminación por patulina en estos productos.

Kadakal y Nas (2002) encontraron que la contaminación por patulina aumenta desde 1,99  $\mu\text{g}/\text{l}$  hasta 179,31  $\mu\text{g}/\text{l}$ , cuando se utiliza un 30% de manzanas recogidas del suelo, y la contaminación aumenta hasta 860,95  $\mu\text{g}/\text{l}$  cuando en el proceso de fabricación de jugo se utilizan sólo manzanas caídas del árbol. La patulina se transformó en un indicador de calidad en la fruta usada para la producción de jugos, debido a que la presencia de esta micotoxina en estos productos es atribuida a la utilización de manzanas en estado de putrefacción. Si bien la contaminación no se reduce por completo, una cuidadosa selección, lavado y clasificación de las frutas a utilizar son los factores más importantes para la reducción de la contaminación por micotoxinas durante la producción de jugos (Fernández-Cruz y col., 2010; Koca y Eksi, 2005; Marín y col., 2006).

Varios investigadores estudiaron la posibilidad de reducir la patulina en los productos obtenidos de las frutas susceptibles de tener contaminación por esta toxina. Para ello se estudió la estabilidad de esta micotoxina respecto de los distintos procesos aplicados en la elaboración de los alimentos, como así la posibilidad de la inclusión de nuevas metodologías de descontaminación.

Se reportó la reducción de 15-75% en jugos después de un calentamiento por 10 minutos y 50-80% después de 20 minutos a 80°C (Jackson y Dombrink-Kurtzman, 2006; Kawashima y col., 2002; Scott y Somers, 1968; Stinson y col., 1978). Drusch y col. (2007) exhiben estudios de Lovett y Peeler (1973), donde muestran que en el rango de pH 2,5-5,5 en un período de 30 días se conserva entre el 69-73% de la

patulina inicial; a pH neutro ocurre una gran caída en la concentración de la toxina (aproximadamente 60% en los primeros 20 días).

Lindroth (1980) realizó un estudio donde analizó la destrucción térmica de la patulina en frutos rojos (*berries*) y dulces elaborados con esos frutos. Durante el tratamiento térmico, la cinética de reducción es diferencial respecto del fruto estudiado (grosellas, arándanos o frutillas), aunque en todas se observó el mismo tipo de curva de degradación. Además, encontraron que el agregado de sacarosa durante el procesamiento térmico otorga un efecto protector a la patulina.

En un trabajo de Wheeler y col. (1987), donde aplicaron a la sidra para su pasteurización tratamientos de alta temperatura en cortos tiempos (HTST), se obtuvo una reducción máxima del 18% de la patulina presente. Por otra parte, encontraron que el almacenamiento de la sidra no afecta el nivel de patulina.

Scott y Somers (1968) comparan la alta estabilidad de la PAT en los jugos, respecto de la presencia de la toxina en harina de trigo, en la cual se degrada completamente luego de dos días a 22 °C, planteando que esto puede deberse a alta concentración de compuestos sulfidrilos en este último producto.

La adición de ácido ascórbico (500 ppm) y dióxido de azufre (100 ppm) para clarificar los jugos de manzana reducen el contenido de patulina hasta en un 25%. Brackett y Marth (1979) adicionaron ácido ascórbico en jugos de manzana contaminados y reportaron la desaparición de la toxina dentro de las tres semanas de agregado. Resultados similares fueron mostrados por Lovett y Peeler (1973), donde comprobaron que el agregado de ácido ascórbico aumenta la velocidad de degradación de la patulina en soluciones acuosas, donde simularon las condiciones

existentes en un jugo de frutas. En esa misma línea Drusch y col. (2007) mostraron la baja estabilidad de la patulina en modelos acuosos cuando se agrega ácido ascórbico a estos.

Roland y Beuchat (1984) encontraron que la adición de 25 y 50 ppm de SO<sub>2</sub> reduce la cantidad de patulina producida por *B. nivea*, y que a 21°C y 50 ppm SO<sub>2</sub> la patulina no es producida por el hongo.

La patulina presenta gran estabilidad durante el almacenamiento, la cual se ve alterada cuando el alimento cuenta con el agregado de sulfito, grupos sulfidrilos y/o ácido ascórbico.

La producción de jugos lleva en sus etapas un paso de clarificación, el proceso convencional se realiza por medio de gelatina, bentonita (arcilla mineral) y carbón vegetal activado. Todos estos pasos provocan una reducción de la concentración de patulina (Acar y col., 1998; Leggott y col., 2001; Gökmen y col., 2001). El proceso térmico utilizado cuando se quieren obtener jugos concentrados, no provoca una reducción en la contaminación y, a su vez, prueba la falta de volatilidad de esta micotoxina (Kryger, 2001).

Los resultados recién expuestos no concuerdan totalmente con las conclusiones expresadas con posterioridad por Kadakal y col. (2002), donde resaltan que sólo el tratamiento con carbón activado reduce la concentración de patulina, no teniendo influencia sobre la contaminación los demás pasos de la elaboración de jugo de manzana: tratamiento térmico, enfriamiento, clarificación/despectinización (tratamiento con pectinasa, amilasa y gelatina).

La metodología convencional, para obtener jugos clarificados, está siendo desplazada por la ultrafiltración, ya que esta última es adaptable a un proceso continuo de clarificación de los jugos. Trabajos de Gökmen y col. (2001) y posteriormente Marín y col. (2011) mostraron que la ultrafiltración de los jugos provoca una reducción en la contaminación final por patulina. La suma de un paso de decoloración con resinas adsorbentes después de la ultrafiltración mejora la eliminación de patulina. Welke y col. (2009) estudiaron en su totalidad el proceso de fabricación del jugo de manzanas (molienda, pasteurización, tratamiento enzimático, microfiltración y evaporación), analizando como afecta cada paso la concentración residual de patulina. Observaron que en el total del proceso se reduce cuatro veces la contaminación, incluso en el caso de la utilización de manzanas altamente contaminadas.

Paster y col. (1995) almacenaron peras y manzanas inoculadas con *P. expansum*, en atmósferas controladas variando las concentraciones de oxígeno y dióxido de carbono; comprobaron que se inhibe la producción de patulina bajo condiciones de 3% CO<sub>2</sub>/2% O<sub>2</sub> a 25 °C. Sin embargo, Baert y col. (2007) mostraron que a 20 °C, 10 °C y 7 °C, al descender los niveles de oxígeno, se corresponde un aumento en la producción de patulina por parte de *P. expansum*.

Sant'Ana y col. (2010) observaron la influencia del material utilizado para empaquetar jugos en la producción de patulina por *B. nivea* y *B. fulva*. A pesar que encontraron crecimiento de *Byssoclamys*, tanto en botellas de Polietileno tereftalato (PET) como en envases laminados, no detectaron patulina en estos últimos, pero sí en los envases PET. Los autores atribuyen estos resultados a la diferencia en la

permeabilidad al oxígeno, entre los dos tipos de envase. Esta diferencia en la concentración de oxígeno es lo que altera la capacidad de producir patulina por *Byssoclamys*.

Los procesos de fermentación mediados por levaduras provocan una reducción en la contaminación por patulina, llegando a niveles no detectables después de dos semanas (Harwing y col., 1973; Stinson y col., 1978).

La incubación de soluciones de patulina y ocratoxina (OTA), con bacterias lácticas, provoca una reducción en la concentración de estas toxinas. Las mayores reducciones fueron obtenidas con *Lactobacillus acidophilus*, que redujo en más de un 95% la cantidad de OTA, y *Bifidobacterium animalis*, con el que lograron disminuir en un 80% la concentración de patulina inicial. Estas bacterias pueden ser utilizadas en la producción de alimentos probióticos, por eso la importancia de estos resultados (Fuchs y col., 2008).

Un estudio de degradación química de micotoxinas realizado por McKenzie y col. (1997), mostraron que una solución con 32  $\mu\text{M}$  de patulina, después de un tratamiento con 10 % peso en peso de ozono durante 15 segundos, elimina por completo la toxina, no observando formación de nuevos productos al seguir la degradación por medio de los cromatogramas UV que se obtuvieron de los productos tratados.

Un estudio de Dong y col. (2010) mostró que la exposición de sidra a la luz UV a 254 nm disminuye en un 9,4 % la presencia de PAT, cuando la sidra es irradiada con una potencia de 14,2  $\text{mJ}/\text{cm}^2$ . Los autores encontraron una relación lineal entre el

incremento en la reducción de patulina con el aumento de la dosis de luz UV a la que es expuesta la sidra.

Los resultados promisorios en la utilización de luz UV, del trabajo de Dong y col. (2010), nos impulsó a probar la utilización de luz pulsada, una metodología emergente que se usa en la descontaminación de alimentos, en aquellos productos que presentaran contaminación por patulina.

### **I.1.7. Luz pulsada**

La utilización de pulsos de luz de alta intensidad y corta duración es una técnica emergente utilizada para la descontaminación de la superficie de los alimentos (Butz y Tauscher, 2002; Elmnasser y col., 2007; Gómez-López y col., 2007), al contrario de la utilización de la luz UV en forma continua que tiene un amplio uso para la esterilización de superficies, utensilios, aire y materiales de empaquetamiento. Se ha evaluado en alimentos líquidos su uso para la inactivación de microorganismos en jugos de frutas y vegetales.

La región ultravioleta se divide en tres regiones:

- Radiación UV de onda corta (UV-C) entre 200-280 nm
- Radiación UV de onda media (UV-B) entre 280-320 nm
- Radiación UV de onda larga (UV-A) entre 320-400 nm

El efecto germicida de la luz UV-C es bien conocido desde hace más de cien años. Esta radiación es fuertemente absorbida por los componentes celulares, los

daños más severos ocurren cuando los ácidos nucleicos absorben la radiación ocasionando mutaciones en el ADN (Gómez y col., 2010). 254 nm es la longitud considerada germicida (Bintsis y col., 2000).

La técnica de luz pulsada se basa en la utilización de lámparas de xenón conectadas a un controlador el cual actúa almacenando energía en capacitores de alta capacidad, por tiempos relativamente prolongados (fracciones de segundo), del cual se libera hacia la lámpara en plazos más cortos (nano a milisegundos). La alta energía enviada produce un intenso pulso de luz enfocado hacia el área de tratamiento, este pulso tiene una duración típica de pocos de cientos de milisegundos (Elmnasser y col., 2007). La utilización de alto voltaje en la descarga de la lámpara genera un pulso de luz en la región UV/Visible e incluso puede llegar hasta el IR cercano (100-1100 nm), dicho espectro está determinado por la densidad de corriente existente en lámpara, altas densidades de corriente conducen a la emisión de un espectro rico en la región UV-C. Como estos pulsos son de alta intensidad se genera calor y la emisión cercana al UV provoca la formación de ozono, por lo cual las lámparas generalmente se encuentran conectadas a un soplador para disipar el calor y ozono formados por medio de una corriente de aire filtrado que pasa continuamente por dentro del receptáculo de la lámpara (Manual Xenon Corp.).

La utilización de esta metodología de descontaminación en alimentos es una técnica no térmica que hasta el momento se utiliza por su efecto letal sobre microorganismos. Se demostró que tiene una gran efectividad para matar bacterias y hongos y tiene un efecto más poderoso y en menor tiempo al tratamiento con luz UV continua (Takeshita y col., 2003).

El poder germicida proviene de la conjunción de efectos fotoquímicos y/o fototérmicos. El mecanismo fotoquímico involucra el daño en el ADN provocado por la absorción de la luz de la región UV-C, mientras que el fototérmico está relacionado al sobrecalentamiento provocado por la absorción de luz en la región visible-infrarroja (Gómez-López y col., 2007).

Las pruebas realizadas por Takeshita y col. (2003) compararon la inactivación de *Saccharomyces cerevisiae* utilizando luz UV-C continua y pulsada; en ambas pruebas vieron que el daño en el ADN fue esencialmente el mismo en ambos casos, sin embargo, las células expuestas a la luz pulsada presentaron cambios estructurales que no presentaban las células irradiadas con luz UV-C continua.

En el año 2010, Tripathi y Mishra estudiaron la posible utilización de luz UV continua conjuntamente con una degradación enzimática de aflatoxina B<sub>1</sub>, aplicados en tándem a polvo de morrón rojo. Observaron una reducción del 77% luego de 30 minutos de exposición y de un 87,8 % después de 60 minutos, no provocando este tratamiento cambios cualitativos en el alimento tratado.

Debido a que es una tecnología emergente, existe un número relativamente pequeño de trabajos publicados que utilizaron luz pulsada, si bien está clara la eficacia en la destrucción de microorganismos, pero no se ha estudiado en profundidad si puede afectar el contenido de micotoxinas.

## **I.2. FUMONISINAS**

El aislamiento y la elucidación de las primeras estructuras de las fumonisinas, fue producto de una investigación conjunta entre el "Programme on Mycotoxins and

Experimental Carcinogenesis (PROMEC Unit) del “South African Medical Research Council” (MRC, Tygerberg, Sudáfrica), el “Council for Scientific and Industrial Research” (CSIR, Pretoria, Sudáfrica) y el “Onderstepoort Veterinary Research Institute” (Universidad of Pretoria, Sudáfrica). El trabajo comenzó con la idea de encontrar la etiología del ELEM (síndrome de leucoencefalomalacia equina) (Marasas, 2001).

El primer paso de este trabajo, fue aislar e identificar los hongos presentes en los alimentos causantes de ELEM. Se encontró que predominaba el *Fusarium verticillioides* (nombre actual de *F. moniliforme*). También se encontró relación entre este hongo y el edema pulmonar en porcinos (PPE) (Jaskiewicz y col., 1987; Makaula y col., 1996).

A continuación se evaluó el posible papel de las toxinas producidas por este hongo, en la etiología del cáncer esofágial humano (EC) en la región de sur de Transkei, Sudáfrica. La tasa de incidencia de EC en hombres y mujeres en esta región se encuentra entre las más altas del mundo, mientras que la tasa en la parte norte es menor. El alimento básico en ambas áreas, es el maíz de cosecha propia, encontrándose al *F. verticillioides*, como el hongo de prevalente en el maíz consumido por los habitantes de las zonas con alta incidencia de la EC. Una de las cepas aisladas fue denominada *F. verticillioides* MRC 826 y fue con la que se realizaron la mayoría de los estudios subsiguientes.

Hacia 1984, el *F. verticillioides* MRC 826, demostró ser hepatocarcinogénico en ratas y causante de carcinoma hepatocelular y colangiocarcinoma (cáncer de las vías biliares).

Aunque las investigaciones químicas, sobre la/s micotoxina/s producidas por *F. verticillioides* MRC 826 comenzaron en Sudáfrica en julio de 1970, la naturaleza química del metabolito/s responsable de ELEM todavía no se había identificado en 1984 (Marasas y col., 1984).

Si bien se sabía que cepas de *F. verticillioides* eran capaces de producir, deoxinivalenol, ácido diacetoxiscirpenol, fusárico, fusarinas A, B, C y D, fusariocinas, giberelinas, moniliformina, toxina T-2, y zearalenona, la cepa MRC 826 aislada de alimentos relacionados con las enfermedades nombradas, no produjo moniliformina, tricotecenos o zearalenona (Kriek y col., 1981a; Kriek y col., 1981b)

Se hicieron estudios a corto y largo plazo en ratas con aislados de *F. verticillioides* MRC 1069, conteniendo altos niveles de fusarina C, pero estos estudios no demostraron que esta sustancia tuviera capacidad cancerígena en ratas. O sea que este compuesto no era el causante de la capacidad cancerígena del *F. verticillioides* MRC 826.

Finalmente en 1988, fue elucidada la naturaleza química del compuesto que le da capacidad carcinogénica al *F. verticillioides* MRC 826. Estos compuestos fueron denominados fumonisinas, aislando por primera vez en PROMEC fumonisina B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>) y la fumonisina B<sub>2</sub> (FB<sub>2</sub>), las cuales resultaron promotoras del cáncer en hígado de rata.

Sus estructuras fueron determinadas en colaboración con el CSIR (Gelderblom y col. 1983, 1984a, 1984b, 1986, 1988a; Kellerman y col., 1972; Marasas y col., 1976, 1981, 1984; Thiel y col., 1986; Wilson y col., 1985).

### I.2.1 Propiedades físico-químicas

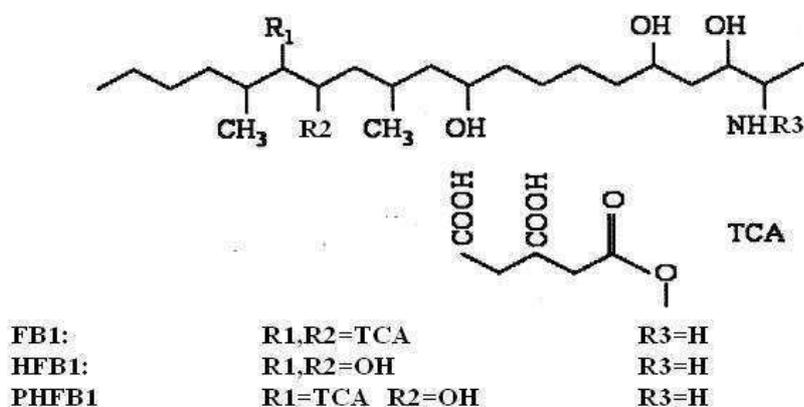
Las fumonisinas son un grupo numeroso de micotoxinas, 28 análogos fueron caracterizados hasta el año 2002, los mismos fueron separados dentro de cuatro familias principales, serie B, C, A y P (Rheeder, 2002). Estos son compuestos polares, solubles en agua y soluciones acuosas de metanol y acetonitrilo, pero no lo son en solventes no polares.

Bezuidenhout y col. (1988) describen a FB<sub>1</sub> como un sólido amorfo con un punto de fusión de 103 a 105 °C, con una rotación óptica  $[\alpha]_D$  de -28 ° (2 mg/ml en agua). Por espectrometría de masas (EM), se han obtenido una relación masa/carga (m/z) de 721 para FB<sub>1</sub> (C<sub>34</sub>H<sub>59</sub>NO<sub>15</sub>) y una relación m/z de 706 para FB<sub>2</sub> (C<sub>34</sub>H<sub>59</sub>NO<sub>14</sub>).

FB<sub>1</sub> es un diester de propano-1,2,3-ácido tricarboxílico y 2-amino-12,16-dimetil, 3,5,10,14,15-pentahidroxiicosano, donde los grupos hidroxilos de los C-14 y C-15 están esterificados con el grupo carboxilo terminal de los ácidos tricarbálico (figura I.2)

FB<sub>1</sub> es la fumonisina más polar, presentando características de zwitterion en solventes polares debido a los grupos carboxílicos y al grupo amino en C-1.

**Figura I.2.** Estructura de las fumonisinas



Tomando como base la estructura de FB<sub>1</sub>, tenemos en la serie B fumonisina B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub> y B<sub>4</sub> donde en estos compuestos homólogos a FB<sub>1</sub>, su estructura tiene la pérdida de un grupo hidroxilo, FB<sub>2</sub> en C-10, FB<sub>3</sub> en C-5 y FB<sub>4</sub> sufre la pérdida de ambos hidroxilos. Recientemente se identificó FB<sub>6</sub> que es un isómero posicional de FB<sub>1</sub> y presenta los grupos hidroxilo en C3, C4, y C5 (Månsson y col., 2010).

La serie C asiladas a partir de maíces con contaminación visible de hongos, es similar estructuralmente a la serie B, teniendo como diferencia la pérdida del grupo metilo en C-1, FC<sub>1</sub> fue encontrada en maíces contaminados naturalmente en una proporción del 1% respecto a FB<sub>1</sub> (Nelson, 1993).

La denominada serie A, cuyas toxinas fueron aisladas a partir de siembras de *F. verticillioides* en maíz entero, cuentan con la presencia del grupo N-acetil amida en la posición C-2.

En la serie P, que se aisló a partir de siembras de *F. proliferatum* en maíz, el grupo amino de C-2 de la serie B es reemplazado por el grupo 3-hidroxipiridina.

De la serie "B", las mayores formas encontradas en maíz son FB<sub>1</sub> que representa el 70-80% del contenido de fumonisinas B a partir de *F. verticillioides*, seguida por FB<sub>2</sub> y FB<sub>3</sub>. La ocurrencia natural de otros análogos ocurre en muy bajos niveles, menos del 5% del total de las fumonisinas presentes (Nelson, 1993; Rheeder, 2002; Jackson y Jablonski, 2004).

Recientemente, se detectaron 28 isómeros de FB<sub>1</sub> en un cultivo de arroz contaminado con *Fusarium verticillioides* que representaron el 2,8% del total de FB<sub>1</sub> presente en el cultivo (Bartok y col., 2010b). Existen, por los diez centros quirales presentes en FB<sub>1</sub>, 1024 probables estereoisómeros, que se pueden encontrar en cultivos de distintas cepas.

McKenzie y col. (1997) aislaron una fumonisina del cultivo de *F. verticillioides* NRRL 13613, la cual fue llamada iso- FB<sub>1</sub> y difiere de FB<sub>1</sub>, en la presencia de un grupo oxidrilo en C-4 en lugar que en C-5.

Se identificaron fumonisinas que no contenían ácido tricarbálico en sus estructuras y en su reemplazo se encontraba el propano-1,2,3-ácido tricarbóxico y 2-amino-12,16-dimetil, 3,5,10,14,15-pentahidroxiicosano, donde los grupos hidroxilos de los C-14 y C-15 están esterificados con el grupo carboxilo terminal de los ácidos cis-aconítico, oxalilsuccínico o oxalilfumárico, denominando a esta serie FBX (Bartók y col., 2006).

Bartók y col. (2010a) describieron nuevas fumonisinas que son significativamente menos polares que las mencionadas anteriormente. Se propuso mencionarlas como EFB<sub>1</sub> o sea FB<sub>1</sub> esterificada y sugirió los nombres EFB<sub>1</sub> PA, iso-EFB<sub>1</sub> PA, EFB<sub>1</sub> LA, iso-EFB<sub>1</sub> LA, EFB<sub>1</sub> OA e iso-EFB<sub>1</sub> OA donde la estructura base de

las fumonisinas estaba esterificada por ácidos grasos: C<sub>16</sub>H<sub>32</sub>O<sub>2</sub> (palmitic acid, PA), C<sub>18</sub>H<sub>32</sub>O<sub>2</sub> (linoleic acid, LA) y C<sub>18</sub>H<sub>34</sub>O<sub>2</sub> (oleic acid, OA). La cantidad total de estas nuevas fumonisinas es del orden de 0.1% de la concentración de FB<sub>1</sub>.

### **I.2.2. Especies productoras de fumonisinas**

Se considera al género *Fusarium* como los productores por excelencia de estas toxinas en maíz. Dentro de este género las más importantes son, *Fusarium verticillioides* (anteriormente conocido como *F. moniliforme*), *F. proliferatum*, *F. subglutinans*, *F. thapsinum*, *F. anthophilum* y *F. globosum*, estas especies pertenecen a la sección *Liseola*. Otras cinco especies pertenecen a la sección *Dlaminia* son, *F. nygamai*, *F. dlamini*, *F. napiforme*, *F. andiyazi* y *F. pseudonygamai*. Las dos especies restantes son *F. oxysporum* y *F. polyphialidicum* correspondientes a las secciones *Elegans* y *Arthrosporiella* respectivamente. De estas especies, solo *F. verticillioides* y *F. proliferatum*, se han asociado a contaminación de productos maíz por fumonisinas (Nelson y col., 1992; Rheeder y col., 2002; Marin y col., 2004).

A pesar que algunas especies del género *Fusarium* están relacionadas con la contaminación por fumonisinas en cereales, Mirocha y col, en el año 1996 informaron que *Alternaria arborescens* patógeno del tomate era capaz de producir fumonisinas, sin embargo esto no pudo ser confirmado posteriormente.

Las temperaturas óptimas de crecimiento de *F. verticillioides* se encuentran entre 22,5 a 27,5°C, tolerando este hongo temperaturas de 37°C y 2,5°C. A pesar que su desarrollo óptimo es a a<sub>w</sub>=0,87 y 25°C, la máxima producción de micotoxinas se produce por encima de una actividad de agua de 0,92 (Pitt y Hocking, 1997).

La mayor parte de la contaminación con fumonisinas ocurre a nivel de campo, donde *F. verticillioides* puede infectar la planta de maíz durante cualquier etapa de desarrollo de la misma (Munkvold y Desjardins, 1997). Marin y col. (2004) han mostrado que el contenido de fumonisinas puede incrementarse cuando el almacenamiento es defectuoso

La distribución de *F. verticillioides* es amplia, encontrándose en países de climas húmedos, templados, subtropicales y tropicales, pero no es común en zonas de clima frío (Pitt y Hocking, 1997).

*F. proliferatum*, la otra especie perteneciente al género *Fusarium* importante en la producción de fumonisinas, es un hongo que puede ser aislado a partir sustratos distintos al maíz, como puede ser, sorgo, arroz y espárragos. Se caracteriza por producir una amplia variedad de micotoxinas entre las que se puede mencionar a beauvericina, fusaproliferina, ácido fusárico, fusarinas, moniliformina y fumonisinas. Las velocidades de crecimiento a diferentes temperaturas y  $a_w$  son similares a las de *F. verticillioides*, produciendo una mayor contaminación a 25°C y a  $a_w$  altas (Pitt y Hocking, 1997).

Frisvad y col. (2007a) detectaron por primera vez FB<sub>2</sub> en cultivos de *Aspergillus niger*. Posteriormente se demostró que las cepas de *A. niger* pueden producir FB<sub>2</sub> y FB<sub>4</sub> en las uvas y las pasas (Morgensen y col., 2010), y también FB<sub>2</sub> en el café (Noonim y col., 2009).

Månsson y col. (2010) aislaron una nueva fumonisina FB<sub>6</sub>, junto con FB<sub>2</sub> de cultivos estacionarios del hongo *A. niger* NRRL 326.

Las FBs presentan características similares con otras micotoxinas, como son las producidas por *Alternaria alternata* f.sp *lycopersici*, que produce AAL toxina TA y AAL toxina TB. Estas fitotoxinas presentan en sus moléculas grupos ácidos tricarbónicos al igual que las FBs (Nelson y col., 1993; Riley y col., 1993). Otros metabolitos relacionados son aquellos producidos por *Aspergillus fumigatus*, quien se caracteriza por producir esfingofunginas A, B, C y D y fumifungina (Scott, 1993).

### **I.2.3 Toxicidad**

Las fumonisinas fueron descubiertas en Sudáfrica a partir de cultivos de *F. verticillioides* tratando de identificar las posibles causas de incidencia de cáncer esofágico en la región de Transkei, como fuera mencionado en I.2. (Scott, 1993).

Como ocurre habitualmente, se han detectado diversas epidemias en animales relacionadas con el consumo de maíz contaminado por fumonisinas. La leucoencefalomalacia equina (LEM o ELEM), es una patología frecuente en el ganado equino, que se manifiesta ante el consumo de raciones contaminadas con *F. verticillioides* y/o fumonisinas (Morgavi y Riley, 2007).

Por otra parte, se ha demostrado que raciones contaminadas son cardiopáticas, causando edema pulmonar en cerdos.

Parecería que otras especies son menos susceptibles, tales como patos y pollos, en comparación con equinos, cerdos, conejos o roedores de laboratorio. Esta diferencia de toxicidad se refleja en los diferentes niveles máximos aceptables sugeridos de contaminación de maíz y productos a base de maíz, en raciones de

animales propuestos en Guías del Centro de Seguridad Alimentaria y Nutrición de USDA (2009) y las Guías y Reglamentaciones de la Comunidad Europea (C.E., 2009).

Las fumonisinas han sido evaluadas por la Agencia Internacional de Investigación de Cáncer (IARC, 2002), que concluye que es insuficiente la información para clasificarlas como carcinógenas en humanos. La evaluación realizada por dicha agencia llevó a la clasificación de estas micotoxinas dentro del grupo 2B (IARC, 2002). El Comité de Expertos en Aditivos Alimentarios y Contaminantes de la FAO/OMS (Joint Expert Committee in Food Additives, JECFA) sugiere una ingesta tolerable máxima de 2  $\mu\text{g}$  de fumonisinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> y B<sub>3</sub> solas o en combinación por kg de peso corporal por día (WHO, 2002).

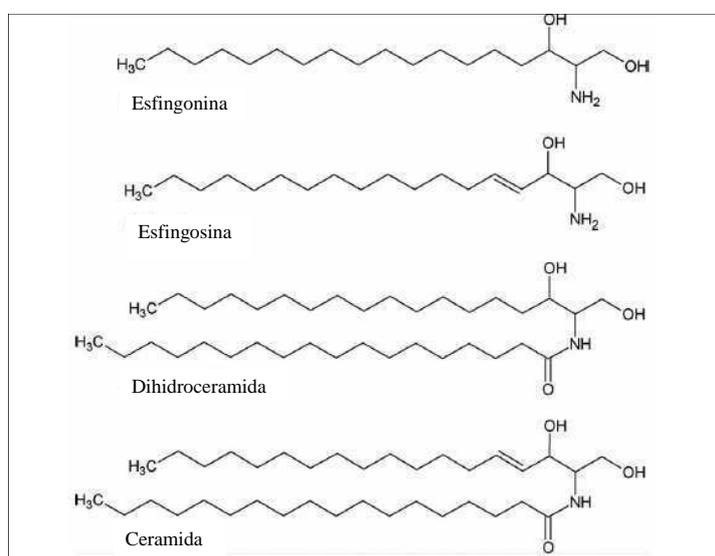
### **I.2.3.1. Mecanismos de actividad bioquímica**

Las fumonisinas son estructuralmente similares a los esfingolípidos, en la figura I.3 se puede observar la estructura de cuatro de estos compuestos. En la actualidad, se han identificado más de 300 esfingolípidos y todos ellos contienen una cadena larga (esfingoides) espina dorsal de base, cumpliendo funciones estructurales y actuando como reguladores de un número de funciones celulares.

Los esfingolípidos se sintetizan a través de una vía de *novo* (figura I.4). El paso principal, incluye la formación de esfingonina, la cual es transformada en dihidroxiceramida y ceramida, por medio de la enzima N-aciltransferasa (ceramida sintetasa). La ruta de formación de los esfingolípidos, implica la hidrólisis de los esfingolípidos complejos a la ceramida y a continuación a esfingosina. Los primeros pasos de la biosíntesis de la ruta, la condensación de serina y palmitoil-coenzima A

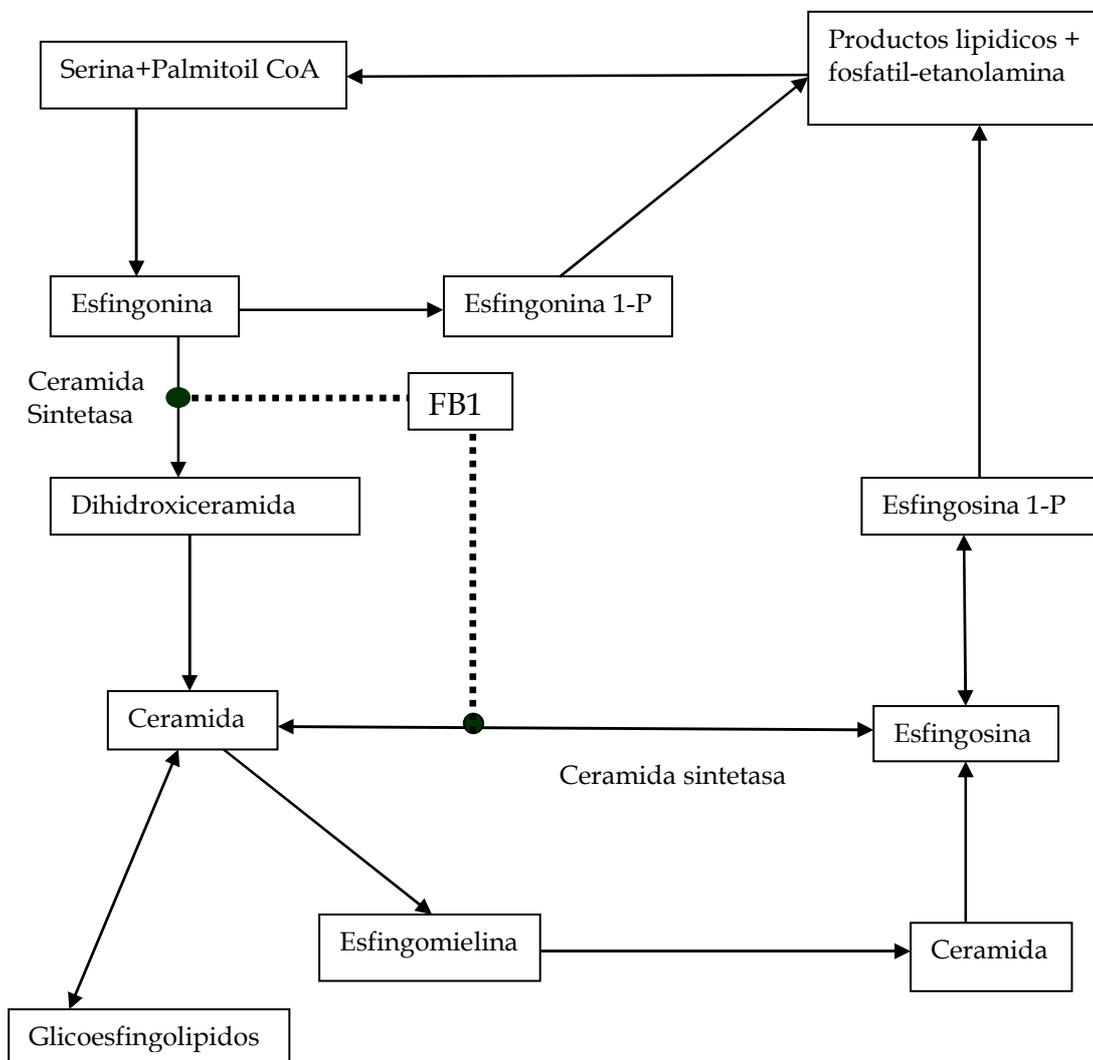
(CoA), formando ceramidas, tienen lugar en el retículo endoplásmico. El tratamiento posterior de la ceramida, se produce en el retículo endoplasmático y aparato de Golgi, mientras que la degradación de los esfingolípidos complejos se lleva a cabo en los lisosomas, endosomas, y la membrana plasmática. Por último, la degradación de las bases libres esfingoides se produce en el citosol.

**Figura I.3.** Estructura de cuatro esfingolípidos



Debido a la similitud estructural de la fumonisina B<sub>1</sub> y los esfingolípidos, se planteó la hipótesis que FB<sub>1</sub>, altera el metabolismo de estos lípidos. Primero se puso de manifiesto que FB<sub>1</sub> puede inhibir la biosíntesis de esfingolípidos en hepatocitos de hígado de rata, y que la enzima ceramida sintetasa, juega un papel importante en

**Figura I.4.** Esquema simplificado de la síntesis de *novoo* esfingolípidos y los sitios de la acción de FB<sub>1</sub> (Adaptado de Stockmann-Juvala y col. 2008)



este camino metabólico. Este resultado fue confirmado en una serie de estudios que demostraron que FB<sub>1</sub>, puede elevar los niveles de esfingonina en orina y de esfingosina en suero, en ratas alimentadas con piensos contaminados con esta toxina. Los niveles de esfingonina se incrementaron en riñón, hígado e intestino delgado, en ratones a los que se les administro FB<sub>1</sub> por vía subcutánea y en ensayos *in vitro* con células epiteliales de riñón.

La inhibición de ceramida sintetasa por parte de FB<sub>1</sub>, trae aparejado el incremento de los niveles de esfingonina, que normalmente está presente en las células en concentraciones muy bajas (0,5-3 nmol / g de peso húmedo). La enzima ceramida sintetasa es también responsable de la reutilización de esfingosina, en la formación de los esfingolípidos complejos, aunque estos efectos generalmente ocurren en una etapa tardía, cuando hay muerte celular extensa y la ruta de los esfingolípidos fue interrumpida (Bezuidenhout y col., 1988; Enongene y col., 2000; Merrill y col., 1997; Merrill y col., 2001; Riley y col., 2001; Wang y col., 1991; WHO, 2000).

### **I.2.3.2. Efectos en los seres humanos - Cáncer Esofágico**

Estudios epidemiológicos en varios países de diversas regiones del mundo han revelado que la incidencia de cáncer esofágico humano y la presencia de *F. verticillioides* parecen correlacionarse. Los estudios llevados a cabo en Sudáfrica y China muestran que los niveles significativamente más altos de *F. verticillioides*, así como las concentraciones de FB<sub>1</sub> y FB<sub>2</sub>, se producen en el maíz que crece en áreas con alta incidencia de cáncer de esófago en comparación con el maíz en baja zonas de riesgo (Jaskiewicz y col., 1987; Makaula y col., 1996); también se observó en estudios con poblaciones que viven en zonas con una alta incidencia de cáncer del esófago en Irán, Italia, Kenya, Zimbabwe, Estados Unidos, y Brasil, por lo que se sospecha una asociación epidemiológica entre la presencia de cáncer y la ingesta de fumonisinas.

Aunque los niveles elevados de esfingolípidos se cree que funcionan como marcadores biológicos de la exposición FB<sub>1</sub>, los distintos estudios, no muestran una

asociación significativa entre los esfingolípidos suero y el riesgo de cáncer de esófago (Abnet y col., 2001; Chu y Li., 1994; Sydenham y col., 1990; WHO, 2002).

### **I.2.3.3. Defectos del tubo neural.**

El defecto del tubo neural (NTD), es una patología caracterizada por defectos embrionario del cerebro y la médula espinal resultado de la falla en el cierre del tubo neural. Entre 1990-1991 se produjo a lo largo de la frontera Texas-México un brote epidémico de NTD, por lo que los epidemiólogos sugirieron que podría deberse a los altos niveles de FB<sub>1</sub> observados en maíz en las cosechas de años previos en esas regiones. Missmer y col. (2006) informaron, que la exposición a FB<sub>1</sub>, calculada a partir de la relación esfingonina/ esfingosina posparto y del recuerdo de la madre de la ingesta de tortilla de maíz antes de la gestación y durante el primer trimestre, parece incrementar el riesgo de defectos del tubo neural. El consumo moderado de tortillas, en comparación con un bajo consumo de tortillas durante el primer trimestre fue significativamente asociado con un riesgo mayor de tener un embarazo afectado por defectos del tubo neural. Algo similar ocurre en ciertas regiones de China y Sudáfrica, con un consumo de maíz de alto, que presentan elevada prevalencia de defectos del tubo neural.

Por otra parte, los estudios epidemiológicos y ensayos clínicos han indicado que la deficiencia de folato puede ser un factor de riesgo para NTD; por lo tanto, se ha propuesto que la interrupción del metabolismo causado por FB<sub>1</sub> en la biosíntesis de esfingolípidos puede afectar a la captación de folato y dar lugar a un mayor riesgo de defectos del tubo neural.

#### **I.2.3.4 Leucoencefalomacia en equinos (LEM)**

Esta patología se manifiesta en caballos, burros y mulas, y se caracteriza por la licuefacción y necrosis de la materia blanca de uno o ambos hemisferios cerebrales. Clínicamente se puede observar apatía, apariencia de somnolencia con lengua sobresalida, reticencia a ir marcha atrás y ataxia. Los signos de desorden nervioso se vuelven más pronunciados a medida que pasa el tiempo, el animal ataca objetos aparentemente por la falta de la comprensión ante la falta de la visión, presenta ceguera y dificultad al caminar (“blind staggers”). Finalmente, el animal puede volverse extremadamente excitable, durante este período de delirio puede correr violentamente en objetos tales como cercas. La muerte puede producirse en medio de movimientos violentos de los miembros. El curso de la enfermedad desde el comienzo de signos clínicos puede ser extremadamente rápido (menos de 7 horas), o pueden pasar varios días hasta la muerte del animal. Este deceso fatal aparentemente es solo causado en equinos. Se la denominado enfermedad de maíz hongueado, leucoencefalitis, enfermedad por tallos de maíz, encefalomiелitis, enfermedad del forraje y meningitis cerebroespinal (Wilson y col., 1990).

Wilson y Maronport (1971) establecieron la asociación del *F. verticillioides* con el LEM, después de comprobar que este hongo era el predominante en los aislados de los alimentos de los caballos que presentaron dicha enfermedad; asociación comprobada experimental., ya que a caballos a los que se les administró directamente al estómago *F. verticillioides* MRC82 que se aisló de maíz, desarrollaron una severa toxicidad hepática y edema leve de cerebro, estudios sugieren que estos síntomas son

producidos en altos niveles de las dosis administradas, pero que a bajas dosis los síntomas serían una hepatotoxicidad moderada y severos daños cerebrales. Sin embargo, síntomas de lesión en el sistema nervioso central y en el hígado en ausencia de parámetros elevados en suero y sin ocurrencia del LEM, son observados en caballos con alimentos naturalmente contaminados con fumonisinas a niveles bajos.

Un caballo inyectado con FB<sub>1</sub> purificada siete veces durante los primeros 9 días de un experimento, desarrollaba el día 8 los síntomas clínicos, nerviosismo seguido por apatía, una postura con las extremidades muy abiertas, temblores, la ataxia, la renuencia a moverse, parálisis de la parte inferior del labio y lengua, y una incapacidad para comer o beber.

Cuando al caballo al día 10 se le practicaba la eutanasia, las principales lesiones eran: edema severo del cerebro y una temprana bilateralmente y simétrica, necrosis focal en la médula oblongada.

En un experimento posterior, el LEM era inducido por la administración oral de FB<sub>1</sub>. Dos caballos eran dosificados y desarrollaban signos de nerviosismo tal como apatía, cambios en temperamento, la falta de coordinación, la caminata en objetos, y parálisis de los labios y lengua. Característico de lesiones por LEM estuvieron presentes en los cerebros de ambos caballos, estos estudios posteriores al aislamiento de *F. verticillioides*, demostraron sin lugar a duda que las fumonisinas son las causales de los síntomas de esta enfermedad (Nelson y col., 1993; Riley y col., 1993).

### **I.2.3.5 Edema pulmonar porcino**

Kriek y col. en el año 1981, informaron que el edema pulmonar en cerdos, es causado por la ingesta de alimentos producidos con maíces infectados con *F. verticillioides*. Un reporte posterior de Harrison y col. (1990) mostraron en el sudoeste del estado de Georgia, la relación entre *F. verticillioides*, y la presencia de epidemias de esta patología que acarreó la muerte de 34 cerdos maduros. El análisis anatomopatológico mostró cambios que incluían edema pulmonar extremadamente marcado e hidrotórax masivo; las cavidades torácicas se encontraban llenas con un líquido amarillo.

Otros estudios epidemiológicos mostraron que el punto en común, era la alimentación con residuos de maíz, provenientes de la cosecha del año anterior. La muerte empezó cerca de 5 días después de la primera dosis y cesó 24 hs después de cambiar dicho alimento; verificándose la presencia de *F. verticillioides* en las muestras de alimentos, recogidas en las granjas, donde se produjo la epidemia. Estudios preliminares mostraron una concentración de FB<sub>1</sub> entre 105 y 155 µg/g en los alimentos, adicionales estudios en el cual le inyectaron a un cerdo FB<sub>1</sub> y FB<sub>2</sub>, les provocó la muerte al quinto día, este cerdo mostró edema pulmonar y lesiones similares a las observadas en los animales muertos en las granjas fumonisinas (Riley y col., 1993).

Durante 1989 se reportaron numerosos brotes de edema pulmonar en porcinos, la mayoría de los alimentos consumidos por estos animales, habían sido producidos con maíz de la cosecha de ese año, altamente contaminados con *F. verticillioides*. Los aislados de *F. verticillioides* de estas semillas produjeron altas

concentraciones de FB<sub>1</sub> (900-2350 µg/g). Estos datos indicaron que FB<sub>1</sub> era la causa probable de esta enfermedad (Nelson y col., 1993; Riley y col., 1993).

#### **I.2.4. Ocurrencia Natural**

Pitt y Hocking (1997), como fuera planteado en I.2.2, no consideraban la posible contaminación por fumonisinas en climas fríos. En general algunas micotoxinas, se encuentran por restricciones causadas por condiciones climáticas limitada su distribución geográfica. Las especies de *Fusarium* se caracterizan por ser cosmopolitas, encontrándose en regiones de climas templados y tropicales, en zonas desérticas y árticas, como así también en regiones alpinas. Debido a esta particularidad pueden colonizar una gran variedad de sustratos ya que poseen mecanismos que le permiten trasladarse rápidamente en el tiempo y en el espacio (Etcheverry, 1992).

Actualmente se ha confirmado la presencia en todo el mundo del *F. verticillioides*, por ello no es de extrañar que las fumonisinas se encuentran distribuidas por todo el mundo.

*F. verticillioides* y *F. proliferatum*, principales productores de fumonisinas, no solo se encuentran en la planta de maíz, sino también en los residuos que permanecen en suelos de campos de áreas templadas (Cotten y Munkvold, 1998; Logrieco y col., 2002).

**Tabla I.5.** Ocurrencia mundial de fumonisinas en cereales.

Producto	Detectado/total	Rango	País
Maíz	FB <sub>1</sub> : 22/110	FB <sub>1</sub> : nd-2.66 µg/g	Turquía (2006)
	FB <sub>2</sub> : 0/110	FB <sub>2</sub> : nd	
	TFBs: 30/92	TFBs: 0.3-273 µg/g	Turquía (2004)
	FB <sub>1</sub> : 10/20	FB <sub>1</sub> : 10-5960 µg/kg	Marruecos (2007)
	FB <sub>1</sub> : 19/57	FB <sub>1</sub> : 10-780 µg/kg	Egipto (2003)
	FB <sub>1</sub> : 6.99/60	FB <sub>1</sub> : 127-359 µg/kg	España (2007)
	FB <sub>2</sub> : 5.01/60	FB <sub>2</sub> : 60-153 µg/kg	
	FB <sub>1</sub> : 18/27	FB <sub>1</sub> : 48-918 mg/L	Croacia (2005)
	FB <sub>1</sub> : 80/184	FB <sub>1</sub> : 0.21-3.30 µg/g	China (2008)
	TFBs: 24/31	TFBs: nd-34700 µg/kg	Argentina (2007)
	FB <sub>1</sub> : 10/10	FB <sub>1</sub> : 0.3-1.5 µg/g	Costa de Marfil (2006)
	FB <sub>1</sub> : 49/49	FB <sub>1</sub> : 142.2-1377.6 µg/kg	Croacia (2005)
	FB <sub>2</sub> : 3/49	FB <sub>2</sub> : 68.4-3084.0 µg/kg	
	TFBs: 96/196	TFBs: 2242 µg/kg (max)	Brasil (2007)
	FB: 0/6	FB: nd	Canadá (2003)
FB: 41/42	FB: 0.012-0.84 µg/g	Argentina (2002)	
Trigo	FB <sub>1</sub> : 0/19	FB <sub>1</sub> : nd	Turquía (2006)
	FB <sub>2</sub> : 0/19	FB <sub>2</sub> : nd	
	FB <sub>1</sub> : 4/210	FB <sub>1</sub> : 1-2 µg/g	S. África (2006)
Cebada	FB: 0/10	FB: nd	Canadá (2003)
Avena	FB <sub>1</sub> : 0/1	FB <sub>1</sub> : nd	Turquía (2006)
	FB <sub>2</sub> : 0/1	FB <sub>2</sub> : nd	
	FB: 0/5	FB: nd	Canadá (2003)
Arroz	FB <sub>1</sub> : 0/31	FB <sub>1</sub> : nd	Turquía (2006)
	FB <sub>2</sub> : 0/31	FB <sub>2</sub> : nd	
	FB <sub>1</sub> : 0/10	FB <sub>1</sub> : nd	Costa de Marfil (2006)
	FB <sub>1</sub> : 2/88	FB <sub>1</sub> : 48.2-60.6 µg/kg	Corea (2005)
	FB: 1/25	FB: 10 µg/kg	Canadá (2003)
Producto	Detectado/total	Rango	País
Cereal *	FB <sub>1</sub> : 52.52/202	FB <sub>1</sub> : 0.010-2.870 µg/g	Italia (2003)
	FB <sub>2</sub> : 70.7/202	FB <sub>2</sub> : 0.010-0.790 µg/g	
Cereal **	FBs: 30.08/32	FBs: 1-1110 µg/kg	Francia (2005)

Adaptado de Yazari, S. y Omurtag, G. (2008)

\* Productos comercializados en base a cereal

\*\* Alimentos para el desayuno en base a cereal

TFBs: Fuminisinas Total

nd: no detectado

La cantidad de inóculo contaminante presente en el campo es muy difícil de determinar, ya que surge de los residuos de maíz presentes de otra cosecha, de semillas infectadas y del suelo mismo (Maiorano y col., 2009). El modo de siembra conocido como siembra directa, permite una drástica reducción de la erosión y degradación del suelo y se puede lograr un mayor contenido de agua en el suelo, pero conduce a una mayor contaminación por fumonisinas, debido a la alta cantidad de inóculo presente.

Como se puede observar en la tabla I.5., en el maíz se encuentran las mayores contaminaciones por fumonisinas, si comparamos con otros cereales. El maíz, alimentos y piensos confeccionados sobre la base de maíz, son los más contaminados y estudiados hasta el momento. También se aisló estas micotoxinas en: avena negra, pasto para forraje, sorgo, frijoles, arroz y tallos de caña de azúcar entre otras matrices (Nelson y col, 1993; Jackson y Jablonski, 2004).

Estudios de maduración del maíz, encontraron que los mayores niveles de formación de la toxina ocurren en las etapas de dentado de la mazorca. A pesar que la biosíntesis de las fumonisinas ocurre principalmente en el campo, hay reportes que informan la formación de estas toxinas durante el almacenamiento de los granos, si estos se guardan condiciones inadecuadas de temperatura y humedad (Jackson y Jablonski, 2004).

En general los factores que más afectan la producción de fumonisinas, son debido a situaciones de estrés de la planta, como por ejemplo por lesiones producidas por insectos, contenido de humedad no óptimo de los suelos, muy altas

temperaturas durante el día y deficiencia de nutrientes en los suelos (Jackson y Jablonski, 2004).

### **I.2.5. Procesos y su estabilidad frente a ellos**

Durante ciertos procesamientos de los alimentos, las fumonisinas pueden tener cambios en sus estructuras. Las toxinas pueden ser metiladas, acetiladas y además sufrir hidrólisis en presencia de HCl 6M, NaOH, KOH y Ca(OH)<sub>2</sub> para obtener los ácidos tricarboxílicos y los correspondientes productos hidrolizados (HFBx) o los derivados parcialmente hidrolizados (PHFB<sub>x</sub> a y PHFB<sub>x</sub> b) (Sydenham y col., 1995, Dombrink-Kurtzman y Dvorak, 1999).

La nixtamalización, es un tratamiento tradicional con hidróxido de calcio, para producir tortilla de harina de maíz. Este tratamiento, produce compuestos que se conocen, dependiendo de los trabajos científicos, como aminopolioles (APx), o como fuera mencionado en la frase anterior, fumonisinas parcialmente hidrolizadas (PHFB), cuando sufre la pérdida del ácido del C14 o del C-15 o fumonisinas hidrolizadas (HFB), cuando durante el procesamiento la estructura pierde ambos grupos ácidos (Poling y Plattner, 1999; Syndeham y col., 1992; Scott 1993).

En un estudio del año 2003, Abd Alla y col., encontraron que, en la preparación de pan con harina de trigo contaminada, por agregado de FB<sub>1</sub>, los niveles de contaminación de dicha toxina se redujeron entre 27,6 y 42,3% después de la cocción del pan y justificaron esta reducción a una combinación del efecto térmico y la fermentación por acción de las levaduras. Actualmente se considera que en las

condiciones normales de fermentación para la producción de pan no se produce reducción de las fumonisinas por las levaduras.

Anteriormente, Dupuy y col. (1993), manifestaron la dificultad de concluir si la reducción en la concentración de FB<sub>1</sub> presente en un alimento donde se aplica un tratamiento térmico, se debe a ese efecto térmico, o a la dificultad en el análisis, debido al bloqueo del grupo amino primario por la matriz donde se encuentran.

El horneado, fritura y extrusión del maíz a temperaturas mayores de 190°C, reduce la concentración de fumonisinas (Humpf y Voss, 2004). Sin embargo esta reducción no se sabe con certeza, como se mencionó, si es producto de la descomposición de las fumonisinas o por unión de estas a proteínas, azúcares u otros componentes presentes en la matriz. Seefelder y col. (2001) mostraron que entre el 70-90% de la FB<sub>1</sub> adicionada, se pierde cuando el maíz es sometido a extrusión.

Los aductos que se forman durante el procesamiento de materias primas con el fin de obtener productos elaborados han sido tratados de indentificar y entre estos trabajos se puede mencionar los de Howard y col. (1998) y Poling y col. (2002). Ellos aislaron durante los procesamientos térmicos, en alimentos con alto contenido de fumonisinas y azúcares reductores dos derivados diferentes de FB<sub>1</sub>: N-(carboximetil)FB<sub>1</sub> (NCMFB<sub>1</sub>) y N-(deoxi-D-fructosa-1-yl)FB<sub>1</sub> (NDFFB<sub>1</sub>). La NDFFB<sub>1</sub> y la NCMFB<sub>1</sub> son productos importantes durante la reacción de Maillard que involucra a la FB<sub>1</sub> y el aldehído del azúcar reductor. Así se forma una base de Schiff estable gracias al aporte del grupo alifático amino primario de la FB<sub>1</sub> (Murphy y col., 1996). La NDFFB<sub>1</sub> es el análogo formado por el reordenamiento de Amadori a partir de la base de Schiff glucosa-FB<sub>1</sub>, mientras que se forma NCMFB<sub>1</sub> debido a su oxidación

(Kim y col., 2003). Al grupo amino primario de la molécula de FB<sub>1</sub> se lo ha caracterizado como esencial para ejercer su toxicidad (Gelderblom y col., 1993; Norred y col., 2001). Por lo tanto, al carecer estos aductos de dicho grupo primario, presentarían una menor toxicidad. Además, la sustitución con el grupo carboximetil, debe inhibir la interacción de las fumonisinas con las ceramida sintetasa, que es la principal causa de toxicidad de estas micotoxinas (Dall' Asta y col, 2010).

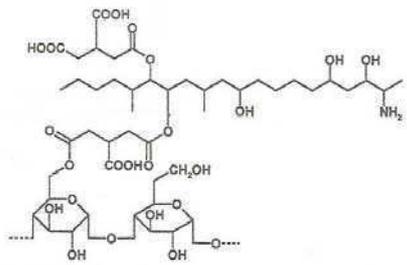
Seefelder y col. en el año 2003, incubaron FB<sub>1</sub> y HFB<sub>1</sub> con,  $\beta$ -d-glucosa y sacarosa (como modelos de mono y disacáridos), metil  $\beta$ -d-glucopiranososa (como modelo de almidón) y con N- $\alpha$ -acetil-L-lisina metil ester y BOC-L-cisteína (como modelo de proteína). FB<sub>1</sub> dio productos de conjugación con sacarosa, glucopiranososa y con las proteínas, concluyendo que tiene gran relevancia la presencia de los grupos TCA en la formación de estos compuestos de conjugación, ya que HFB<sub>1</sub> no formó ninguno de estos compuestos de adición.

También se han descrito otros compuestos, producto de la unión de las fumonisinas a la matriz del alimento incluyendo FB<sub>1</sub> a los ácidos grasos. La unión se lleva a cabo por reacción del ácido tricarbálico de la cadena lateral con los aminoácidos (especialmente lisina y cisteína) a través del grupo amino o sulfhidrilo (PBFB<sub>1</sub>); con hidratos de carbono a través del grupo oxhidrilo o eventualmente con ácidos grasos (Dall'Asta y col., 2010). En la Figura I.5 se observan algunos ejemplos de tipos de unión.

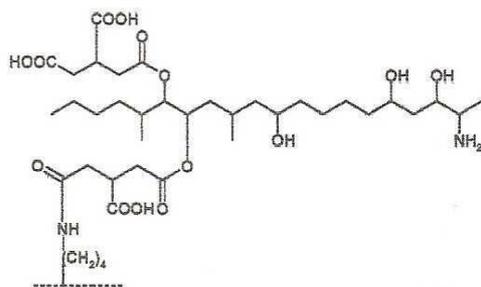
Seefelder y col. (2001, 2003) lograron preparar FB<sub>1</sub> unida a lisina o cisteína y también unida a glucosa vía el TCA. Lo que demuestra la posibilidad que esos compuestos se obtengan durante el procesamiento del maíz.

Las fumonisinas unidas a aminoácidos o a proteínas (PBFB) se pueden extraer con detergentes que solubilizan las proteínas. Las fumonisinas unidas, ya sea a proteínas, a almidón o a otros compuestos de la matriz constituyen las fumonisinas unidas totales (TBFB). Tanto PBFB como TBFB son susceptibles de ser hidrolizadas con KOH.

**Figura I.5 a.** Fumonisina B<sub>1</sub> unida a almidón; **b.** unida a proteínas (PBFB<sub>1</sub>)



a.



b.

En un estudio Shier y col. (1997) utilizando FB<sub>1</sub>, previamente marcada con tritio, agregada a una masa de maíz que fue cocinada, encontraron solo un 37% de la fumonisina con los métodos de análisis convencionales para FBs. Pero se extrajo un 46% más con la utilización de 2% de duodecil sulfato, una solución detergente

utilizada para la disolución proteica, verificando la formación de aductos entre las proteínas y las FBs. Los autores proponen que la unión se presenta previa activación de la FB<sub>1</sub> por pérdida de agua produciendo un anhidro, el cual puede luego reaccionar con grupos funcionales del almidón o las proteínas, tales como grupos tioles, amino e hidroxilo. Posteriormente Seefelder y col. (2003) determinaron los tipos de unión que se presentaban entre las fumonisinas y el almidón o las proteínas, confirmando lo afirmado anteriormente que se pueden conjugar con ellos a partir del ácido tricarbóxico.

Se encontró una baja recuperación de las fumonisinas libres durante la extracción de estas, en productos procesados de maíz. No encontrándose productos de hidrólisis en estas matrices procesadas. La presencia de color marrón hizo suponer que habían ocurrido reacciones tipo Maillard, los productos de esta reacción, no son detectados en los métodos analíticos utilizados en fumonisinas, debido al bloqueo del grupo amino, el cual se necesita en la determinación por medio de la derivatización con orto-ftaldialdehído (OPA) (Castello y col., 2001; De Girolano y col., 2001; Meister, 2001; Piñeiro y col., 1999). Para poder determinarlas se debe romper esa unión mediante una hidrólisis, pudiéndose reconocer y derivatizar la FB liberada como HFB (Murphy y col., 1996, Seefelder y col., 2001; Kim y col., 2003). Las fumonisinas unidas podrían también ser liberadas en el tracto gastrointestinal y por lo tanto es importante su análisis para determinar su biodisponibilidad y toxicidad en el humano. El N-(carboximetil)-FB<sub>1</sub>, no explica la pérdida de fumonisina durante los procesos de calentamiento, ya que la formación de este producto se produce en muy baja concentración (Seefelder y col. 2001)

Kim y col. (2003) comprobaron que la “perdida” de fumonisinas durante el proceso de extrusión de la harina de maíz, se debe a la interacción de las fumonisinas con los macro constituyentes de los alimentos, como son las proteínas y los polímeros de hidratos de carbono como es el almidón. Luego del tratamiento con SDS se obtenía más de 2,6 veces la cantidad de fumonisinas que se obtuvo por simple extracción y adjudican la pérdida de las fumonisinas durante los procesos térmicos a la unión de estas micotoxinas con las proteínas.

En el año 2003, Kim y col., nombran al efecto de no detectar las fumonisinas como formas escondidas (“hidden”).

## **I.2.6. Molienda seca y húmeda de maíz**

### **I.2.6.1 Maíz**

Las mazorcas más antiguas, fueron halladas en Méjico, en la cueva de Guila Naquitz, en Oaxaca, las mismas tienen alrededor de 6250 años.

Al encontrarse este cereal en tierras donde el clima no le era favorable, se llegó a la conclusión que los botánicos Aztecas, fueron capaces de manejar los granos y formar híbridos adecuados.

Se cree que el proceso de domesticación que lo transformó de una planta silvestre a una cultivada comenzó en la cuenca del río Balsas entre dos y tres mil años antes, y que el maíz se propagó hacia el norte y sur de América cuando aún no se cumplían mil años del inicio de su domesticación. Después del primer viaje de Cristóbal Colón, el maíz se difundió por todo el mundo. Ahora se cultiva en 134

países, y es junto con el arroz y el trigo, uno de los cereales más importantes del planeta.

Su nombre proviene de la lengua de los indios taínos de las islas del Caribe, y literalmente significa “lo que sustenta la vida”.

El paciente manejo de los grupos humanos, que generación tras generación han seleccionado y transformado las semillas, convirtieron al maíz en una planta con versátiles cualidades, por eso tiene múltiples usos en varias etapas de su desarrollo. Es fundamental como alimento para seres humanos y animales, esencial como materia prima para producir almidón, aceite, bebidas alcohólicas, edulcorantes alimenticios y desde hace poco tiempo, biocombustibles.

Existe actualmente una gran cantidad de variedades de maíz, entre los más destacados se encuentran flint o plata, dentado, duro, blando o harinoso, dulce, pisingallo (maíz reventón o maíz para pochochos) y envainado entre otros.

Argentina es un país productor agropecuario por excelencia, dentro de todo este espectro, el maíz es uno de los principales productos. Indicadores de la Secretaria de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos de la Republica Argentina (SAGPyA), muestra que en la campaña 2005/06 se sembraron un total de 3.180.000 hectáreas, representando una disminución del 6,5% (avance de la soja por medio), respecto de la campaña anterior, donde se produjeron 14.000.000 tn, estimada esta producción representa una disminución del 29,3% respecto de la campaña anterior y dentro del MERCOSUR es el 25,2% de la producción de la región (SAGPyA a).

El destino de la producción se descompone de la siguiente manera:

- 64 % mercado externo (9.300.000 ton), siendo Argentina el segundo exportador mundial de maíz, detrás de EEUU.
- 28,8% se destinó a la alimentación animal (4.200.000 ton), que previo a su utilización puede sufrir una transformación no industrial (partido o molido grueso), y posible integración en mezclas, a los fines de su mejor aprovechamiento. Dentro de este rubro se encuentran la fabricación de alimentos balanceados y el utilizado directamente en chacra.
- 7,2% (1.050.000 ton), se destinó a dos tipos de procesos: la molienda seca y la molienda húmeda (SAGPyA b).

En la campaña 2007/08 la cosecha había sido de 22,0 millones de toneladas y la Bolsa de Cereales calculó la producción de maíz 2010/11 en 20 millones de toneladas.

#### **I.2.6.2. Molienda seca**

La molienda seca tiene por objeto separar las distintas partes que componen el grano de maíz, y a partir de éstas, obtener diferentes productos. Estos, según la porción del grano de donde provienen, su granulometría y tenor graso, pueden ser agrupados en:

Del endospermo:

\* Trozos gruesos: destinados a la elaboración de copos (“corn flakes”) y cereales de desayuno. Granulometría entre 3300 y 5500 micrones. Materia grasa inferior al 0,9%.

\* Trozos medios: utilizados en la producción de alcoholes y bebidas alcohólicas y/o en la obtención de sémolas y harinas luego de un proceso previo de refinamiento. Calibre entre 2200 y 3300 micrones. Materia grasa por debajo del 1,8%.

\* Trozos finos: para la elaboración de sémolas y harinas. Calibre de 1000 a 2200 micrones. Materia grasa menor al 3,0%.

\* Sémolas: obtenidas a partir de la refinación de los trozos de endosperma citados precedentemente.

Estas se pueden subdividir en:

\* Sémola para cervecería: granulometría entre 350 y 1200 micrones. Materia grasa del 0,6 al 0,8%.

\* Sémola para expandidos: con ella se elaboran productos de copetín (chizitos). Granulometría entre 450 y 1200 micrones. Materia grasa inferior al 0,9%.

\* Sémola para polenta: granulometría entre 350 y 1100 micrones, materia grasa menor al 1,2%.

\* Sémola pre cocida: granulometría entre 350 y 1300 micrones, materia grasa inferior al 0,7%.

\* Harina común: utilizada en la elaboración de galletitas, alfajores, bizcochos, revocadores, etc. Granulometría menor a 300 micrones. Materia grasa inferior al 2,5%.

\* Harina para alimentación animal: pura, en mezclas o formando parte de balanceados.

De la cáscara:

\* Salvado: a partir del cual se elaboran diferentes productos panificables.

\* Germen: cuyo destino es la extracción de aceite comestible. Materia grasa menor al 26,0%.

Los rendimientos industriales variarán de acuerdo a la tecnología empleada y al tipo comercial de la materia prima utilizada.

Existe una marcada preferencia por parte de este sector industrial en demandar maíces del tipo comercial flint, pues en el proceso de molienda se logran rendimientos superiores a los obtenidos con maíces sedimentados y dentados.

Entre los principales factores que disminuyen los rendimientos industriales y la calidad final del producto obtenido se pueden mencionar:

\* La molienda de partidas de maíz mezcla de diferentes calidades.

\* La presencia de altos porcentajes de granos quebrados.

\* El secado a altas temperaturas, que aumentan las fracturas internas de los granos.

\* La susceptibilidad a la rotura de los granos.

\* La dureza del endosperma de los granos.

Experiencias realizadas, tanto en nuestro país como en el exterior, demuestran que los rendimientos industriales obtenidos a partir de maíces flint en la molienda seca, son superiores a los obtenidos con maíces dentados (SAGPyA c)

### **I.2.6.3. Molienda húmeda**

El proceso de molienda húmeda recibe esta denominación pues el grano de maíz, previo a su ingreso al molino propiamente dicho, es sometido a un proceso de maceración con agua sulfurada, que facilita la separación de los diferentes componentes del mismo, debido a la generación de procesos enzimáticos, que no pueden ser cortados o detenidos. Por ello los molinos funcionan en forma ininterrumpida los 365 días del año.

Los productos primarios obtenidos del proceso de molienda húmeda son los siguientes: almidón (67,0%), germen (9,0%), fibra o gluten leed (16,0%), gluten mal (8,0%)

Pocos son los productos primarios derivados de la molienda que puedan ser comercializados en forma directa, sin haber sido procesados previamente, excepto casos como el de la maicena (almidón en estado puro) y el kero (especie de miel formada por fructosa y glucosa).

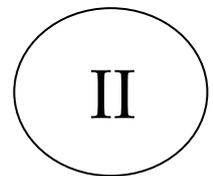
La molienda húmeda es el proceso industrial que muestra las menores exigencias respecto de la materia a procesar, resultando indiferente el tipo comercial del grano a ser molido (flint, semidentado o dentado), a pesar que como se mencionará posteriormente pueden disminuir los rendimientos de acuerdo a la materia prima. Las bajas exigencias suelen deberse a la falta de disponibilidad de materia prima.

Las empresas, sin embargo cuando se dispone de materia prima, orientan su operatoria comercial a la adquisición preferentemente de maíces limpios, que no estén dañados o rajados por el calor, con elevado contenido de almidón, aceite y proteínas, aptos para producir derivados del almidón y subproductos en la elaboración de azúcares, como la fructuosa. En el proceso industrial se presentan las siguientes restricciones.

- No se pueden mezclar en un mismo proceso distintos tipos de maíz, por manifestar diferencias de comportamiento durante la etapa de maceración.
- El tamaño de los granos debe ser lo más homogéneo posible, de lo contrario la molienda resultará ineficiente.
- No se deberían utilizar granos partidos.
- Se debe tener especial cuidado en el tratamiento poscosecha de los granos, de lo contrario se puede potenciar la presencia de aflatoxinas (las micotoxinas mas estudiadas) tanto en el grano almacenado como en los productos y co-productos resultantes del proceso de molienda, en particular en los siguientes aspectos.

1. secado excesivo o a elevadas temperaturas que provocan serios deterioros en los granos (revenido).
2. almacenamiento del grano con humedad inadecuada.
3. presencia de granos fisurados por contracción brusca.

Por la gran importancia que tiene el maíz para Argentina, la alta contaminación por fumonisinas encontrada y al hecho que al comienzo de este trabajo de investigación, no existía un estudio de cómo incide el proceso de molienda húmeda en la contaminación por estas toxinas del maíz y sus productos, se decidió encarar estos estudios incluyendo la posible formación de productos derivados de las fumonisinas.



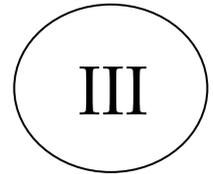
## **Objetivos**

## II. OBJETIVOS

Los objetivos generales fueron, la identificación de patulina en alimentos sólidos y semisólidos y de fumonisinas en maíz, para estudiar cómo afectan los procesos de elaboración y la molienda húmeda de maíz la contaminación de los productos, y cuando fuera necesario, analizar la aplicación de metodologías de decontaminación.

Para alcanzar estos objetivos se cumplimentaron los siguientes objetivos específicos:

- Desarrollar y validar una metodología analítica para determinar patulina en productos sólidos y semisólidos elaborados a partir de frutas como manzana y pera.
- Investigar la ocurrencia natural de patulina en productos de manzana y/o pera comercializados en Argentina
- Estudiar la posible utilización de luz pulsada, para reducir la concentración inicial de patulina en productos de manzana contaminados por esta micotoxina
- Desarrollar y validar metodologías analíticas para determinar fumonisinas en los productos de la molienda húmeda de maíz y en productos de hidrolisis o de compuestos de adición de las fumonisinas en la elaboración de chizitos.
- Analizar los procesos de molienda húmeda de maíz y de elaboración de chizitos y cómo afectan la contaminación por fumonisinas libres y totales respectivamente.



# **Materiales y Métodos**

## III. 1. PATULINA

### III.1.1. Materiales

Se utilizó acetonitrilo (J.T. Baker, grado HPLC, art. 9017-03, ACN) y acético glacial (J.T. Baker, grado A.C.S., art. 9508-33, AcOH), agua grado HPLC, obtenida del sistema de purificación de agua NANOpure Diamond (Barnstead International, modelo D1191) y etanol (Carlo Erba, grado HPLC, art. 4127012, EtOH). Ácido Clorhídrico, 36.5-38.0% (J.T. Baker, grado ACS, art. 9535-03, HCl).

Respecto de las drogas sólidas, se usó ácido cítrico monohidrato, grado para análisis (Merck, art. 1.00244.1000) y fosfato di sódico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), Carlo Erba, grado A.C.S., art. 480141 e hidróxido de sodio en lentejas, grado ACS (J.T. Baker, art. 3722, NaOH).

Se trabajó con pectinasa de *Aspergillus niger*, marca Fluka Biochemika, 1.47 U/mg, artículo N° 17389.

El nitrógeno ( $\text{N}_2$ ) extra seco, fue provisto por Oxígeno Central.

Para la etapa de limpieza de las muestras, se utilizaron las columnas de extracción en fase sólida, Multisep® 228 Aflaplat Multifunctional Columns de Romer Labs® (SPE Multisep 228).

### III.1.2. Estándares

Los estándares utilizados de 5-hidroximetilfurfural (HMF, art. W501808) y patulina (PAT, art. P1639), fueron adquiridos a Sigma-Aldrich.

Para obtener las soluciones de trabajo, se disolvieron 10 mg de patulina (la totalidad de la ampolla adquirida) en 10 ml de EtOH. A partir de esta solución concentrada se hicieron dos diluciones seriadas 1/10 para, a partir de la última dilución, obtener una concentración más precisa de las diluciones de trabajo preparadas. La concentración se calculó midiendo la absorbancia de la solución más diluida, en un espectrofotómetro de arreglo de diodos (Hewlet Packard, modelo 8453), utilizando la ley de Lambert Beer para su cálculo.

**Ley de Lambert Beer:**  $A = \epsilon \cdot c \cdot l$

donde  $A$  = Absorción a una longitud de onda dada

$\epsilon$  = absortividad específica en  $M^{-1} \cdot cm^{-1}$

$c$  = concentración molar

$l$  = longitud de la cubeta en cm.

La absortividad específica utilizada fue:  $\epsilon = 14600 \cdot M^{-1} \cdot cm^{-1}$  (Biopure Corporation) midiendo a 275 nm, utilizando EtOH como solvente.

Las soluciones preparadas, fueron fraccionadas en viales silanizados, llevadas hasta sequedad bajo una corriente de  $N_2$  a temperatura ambiente y mantenidas a  $-18^\circ C$  hasta el momento de ser utilizadas.

### **III.1.2.1. Curva de calibración**

Las curvas de calibración utilizadas, para la cuantificación de patulina en las muestras, se prepararon partiendo de las fracciones de estándares descriptos

anteriormente. Se tomaron tres viales con aproximadamente 3  $\mu\text{g}$  de muestra y se disolvieron en 1,5 g de AcOH 0,1%. Estas nuevas soluciones se diluyeron, con el fin de obtener concentraciones que se encontraran dentro del rango lineal permitido por el instrumental con el cual se trabajó. Se hicieron un total de once puntos de cada uno de los viales iniciales, la curva final quedó conformada por las diluciones que se realizaron de los tres estándares en forma independiente.

### **III.1.3. Características de las muestras**

Como la elaboración de estos productos se realizó de forma regional, se hizo una búsqueda de las mismas en distintos puntos de ventas del país (Córdoba, Entre Ríos, Buenos Aires y Ciudad Autónoma de Buenos Aires), para coleccionar una cantidad y variedad representativa que permitiera realizar el estudio propuesto. Es de remarcar que la producción de puré de manzana dentro de la Argentina está concentrada en pocas compañías, por lo tanto se analizaron diferentes lotes de producción de las mismas marcas comerciales e incluyendo, en este estudio, productos importados de países como Brasil, México, Chile y Francia, comercializados en los mismos puntos de venta.

Las muestras analizadas, para el estudio de ocurrencia natural, fueron productos sólidos y semisólidos de manzana y pera como mermelada, jaleas, dulces y puré. Se analizaron un total de cincuenta y un (51) muestras. Las muestras adquiridas se desglosaron de la siguiente manera, productos de manzana: 26 mermeladas, 7 jaleas, 4 dulces con trozos de fruta y 8 de puré; de pera sólo se

podieron conseguir 6 mermeladas. Las muestras fueron adquiridas durante los años 2006 y 2007.

En el análisis de cómo es afectada la concentración de patulina, con la aplicación de pulsos de luz, se utilizaron 10 muestras puré de manzana, recolectadas durante los años 2009 y 2010, donde se incluyó puré orgánico y alimento para bebés.

Las muestras, una vez adquiridas, fueron almacenadas a 3-4 °C hasta el momento de su análisis.

#### **III.1.4. Metodología analítica**

##### **III.1.4.1. Preparación de las muestras**

La preparación de las muestras contó de tres ítems bien definidos: liberación de la patulina de la matriz por medio de una hidrólisis enzimática, extracción con solventes y limpieza de los extractos obtenidos.

La primera etapa consiste en una incubación con pectinasa durante 16 h a temperatura ambiente y al resguardo de la luz. Se utilizó, para este paso, una solución enzimática conteniendo más de 1500 unidades gramos de la misma. Las unidades de la solución están definidas como: la cantidad de enzima que cataliza el descenso de la viscosidad de una solución 1% de pectina en un 20% en 5 min a 25°C y pH 3,4.

La solución enzimática se preparó mezclando 5 mg de pectinasa sólida por mililitro de buffer citrato pH 4,0. El buffer se preparó adicionando 55,1 ml de citrato

de sodio 0,1 M (21,014 g de ácido cítrico monohidratado + 200 ml de NaOH 1 M, completando con agua grado HPLC hasta llegar a 1000 ml) + 44,9 ml de HCl 0,1 M.

A 10 g de muestra más 8 ml de agua se le agregaron 150  $\mu$ l de esta solución de pectinasa y se dejó actuar en las condiciones descritas anteriormente.

Para la extracción con solventes, luego de la hidrólisis enzimática, se adicionaron 32 ml de ACN, se agitó durante 2 min con agitador magnético (Precytec modelo AE28). El sobrenadante se pasó a través de papel de filtro (Schleicher & Schuell 589<sup>3</sup> Blauband), con el fin de eliminar cualquier resto de sólido que quedara en suspensión que impidiera el siguiente paso de la metodología como, por ejemplo, tamponar la columna de limpieza.

La limpieza final de las muestras se realizó pasando 30 ml del extracto filtrado, a través de la columna SPE Multisep<sup>®</sup> 228. El líquido atravesó la columna a una velocidad de 1 ml/min, utilizando vacío por medio de una trampa de agua. 20 ml del extracto purificado se redujo hasta aproximadamente 2 ml en condiciones de vacío, en un evaporador rotatorio a 40 °C (Laborota 4000, Heidolph). Estos 2 ml fueron traspasados a un tubo limpiando con tres porciones de 2 ml de MeOH. Esta nueva solución fue llevada a sequedad bajo corriente de N<sub>2</sub> a temperatura ambiente, el extracto seco se resuspendió en 500  $\mu$ l de AcOH 0,1% y se mantuvo a -20 °C hasta su análisis.

#### **III.1.4.2. Cromatografía líquida**

Para el análisis y cuantificación de patulina en las muestras, se utilizó un cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC), Agilent Serie 1100 con muestreador

automático, bomba de gradientes cuaternario, termostizador de columna y detector UV con longitud de onda variable. Se utilizó una columna analítica Zorbax® SB-C18 150x4,6 mm, 5 µm, con guarda columna BDS Hypersil-C18 10x4 mm, 5 µm.

Los solventes fueron agua y ACN, utilizando el gradiente descrito en la Tabla III.1.

**Tabla III.1.** Composición del gradiente de solventes

<b>Tiempo (min)</b>	<b>% ACN</b>	<b>% agua</b>
<b>0</b>	5	95
<b>4-10</b>	2	98
<b>11-12</b>	40	60
<b>13-16</b>	5	95

Para el ajuste del gradiente de solventes se utilizó una mezcla de estándares de HMF y patulina.

La longitud de onda elegida para la detección fue 275 nm y la cuantificación se hizo por medio de la curva de calibración descrita anteriormente.

#### **III.1.4.3. Confirmación de las muestras positivas**

Las muestras positivas fueron confirmadas por medio de la adquisición de los espectros UV (200-400 nm) de los compuestos eluidos, comparando los mismos por medio de un espectro del estándar externo de patulina. Dicha confirmación se realizó en un cromatógrafo líquido de ultra performance - UPLC (ACQUITY Ultra

Performance LC™, Waters Corporation) equipado con sistema de gradientes binarios, termostizador de columna, muestreador automático y detector de arreglo de diodos (DAD) (gentileza de D'Amico Sistemas S.A., C.A.B.A. Argentina). Las condiciones analíticas tanto de fase móvil como la columna, fueron similares a las utilizadas en el HPLC Agilent.

#### **III.1.4.4. Recuperación, límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ)**

La recuperación del método analítico para la determinación de patulina se realizó en todas las matrices analizadas en aquellas muestras donde no se detectó la presencia de contaminación natural por esta toxina. Se agregó una solución de patulina en ACN de concentración conocida y se midió la cantidad agregada gravimétricamente. El agregado de estándar se realizó por la mañana, empezando con la extracción la tarde de esa misma jornada, dejando la patulina en contacto con la matriz al menos 6 horas. La recuperación se midió en tres niveles de contaminación, tal que abarcara un rango desde valores cercanos a los límites de detección, hasta valores próximos a los más altos encontrados en las muestras naturales.

Los límites de detección y cuantificación fueron estimados midiendo la altura del ruido en las muestras con contaminación negativa, dicho ruido fue determinado mediante el programa HP Chemstation, como dos veces la desviación estándar de la regresión lineal del ruido en la zona determinada. El límite de detección se determinó como tres veces la señal del ruido, en tanto el límite de cuantificación como cinco

veces la señal del ruido. Los límites calculados fueron verificados, adicionando una muestra negativa con estándar de patulina en la concentración calculada como límite.

### **III.1.5 Utilización de luz pulsada**

#### **III.1.5.1 Descripción del equipo de luz pulsada**

Se utilizó un sistema de esterilización Steripulse-XL modelo RS-3000B (Xenon Corporation, Woburn, MA, USA), compuesto por un módulo controlador RC747 y una lámpara de xenón libre de mercurio, que mide 41 cm de largo y está montada en una caja metálica, la cual contiene una ventana de cuarzo en uno de sus lados para dejar pasar la luz emitida y un sistema de enfriamiento para evitar el sobrecalentamiento de la misma durante su uso. El sistema de enfriamiento consiste en un ventilador que suministra aire filtrado a través de un conducto metálico donde es removido el aire sin permitir el paso de luz. Todo el sistema está montado en una cabina de acero inoxidable (40 cm de alto x 76,2 cm de largo y 20 cm de ancho) herméticamente cerrados, la cabina cuenta con estantes ubicados a: 5, 10 y 15 cm de la lámpara, donde se apoya la muestra a tratar (Imágenes III.1, III.2 y III.3). La lámpara emite pulsos de luz de alta energía, en un rango de longitud de onda entre 200 y 1100 nm, los pulsos son emitidos a una velocidad de 3 pulsos por segundo, siendo la energía de cada pulso de 1,27 J/cm<sup>2</sup> a 1,92 cm de la lámpara (datos provistos por el fabricante del equipamiento). Cada pulso tiene una duración de 360  $\mu$ s.

**Imagen III.1.** Sistema de esterilización Steripulse-XL modelo RS-3000B, módulo controlador RC747 y sistema de ventilación



**Imágenes III.2 y III.3.** Vista interior del gabinete con bandeja de muestras a 10 cm de la lámpara



### **III.1.5.2. Cálculo de la dosis irradiada**

La dosis irradiada sobre las muestras se calculó a 5, 10 y 15 cm de distancia de la lámpara de Xenon en tres posiciones distintas: en el centro de la lámpara, en el extremo A y en el extremo B. Las mediciones fueron tomadas por una cabeza piroeléctrico Gentec, modelo ED500 (Gentec Electro-Optics, Québec, Canada), con

una abertura cubierta de 20,3 cm<sup>2</sup>, conectado a un osciloscopio Tektronix, modelo TDS 2014 (Tektronix, Beaverton, USA); las mediciones se realizaron por triplicado.

### **III.1.5.3. Medición de la evolución de la temperatura**

Para la determinación de la evolución de la temperatura durante el tratamiento con luz pulsada, tanto en el jugo como en el puré, se utilizaron termocuplas tipo T (Cu-constantán) y un registrador de temperatura de 12 canales (Digi-Sense modelo 69202-30, Barnant Company Division, EEUU).

### **III.1.5.4. Tratamiento con luz pulsada**

Se realizaron tres experiencias para determinar la posibilidad de utilizar esta técnica como forma de reducir la contaminación inicial de patulina.

La primera prueba se realizó en una solución modelo, la solución utilizada fue el buffer McIlvaine a pH 3,5 (70,2 ml de ac. cítrico 0,1 M y 29,8 ml de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,2M), se decidió la utilización de este buffer a este pH debido a que las muestras analizadas tenían una acidez cercana a dicho valor y basándonos en estudios realizados por Drusch y col. (2007). Las pruebas se hicieron a dos concentraciones: 100 y 500 µg/l.

Se colocaron en cajas de Petri 11 ml de cada una de las soluciones y se irradió con pulsos de luz en tiempos comprendidos entre 2 y 35 segundos (2, 5, 8, 11, 14, 17, 20, 25, 30 y 35 segundos). La distancia entre las muestras y la lámpara fue de 10 cm, las pruebas se hicieron por cuadruplicado, irradiando de a dos placas por vez, colocando las placas en el centro geométrico de la lámpara, donde la dosis irradiada es mayor.

Luego se tomaron 10 ml de la solución irradiada y se extrajo la patulina con 10 ml de acetato de etilo, repitiendo esta operación tres veces, se juntaron los extractos y se llevo a sequedad bajo atmósfera de N<sub>2</sub> a temperatura ambiente, adicionando luego 300 µl de AcOH 0,1%. Dicha solución fue inyectada para su análisis y cuantificación en el cromatógrafo líquido.

La segunda prueba se realizó sobre puré de manzana contaminado naturalmente y sobre puré adicionado con 90 µg/kg de patulina. Se tomaron entre 15-16 g de puré, se colocaron en cajas de Petri formando una capa delgada y pareja y se irradió en tiempos comprendidos entre 10 y 150 segundos (10, 20, 60, 100 y 150 segundos). La distancia entre las muestras y la lámpara fue de 10 cm. Cada una de las pruebas se realizó por duplicado, colocando las placas en el centro geométrico de la lámpara.

Después del tratamiento, se tomaron 10-11 gramos de cada uno y se procedió a la extracción de patulina como se describió anteriormente (III.1.4.1. Preparación de las muestras).

El tratamiento de los jugos de manzana con luz pulsada, tercera experiencia, se realizó con tiempos de irradiación comprendidos entre 2 y 30 segundos (2, 5, 8, 11, 14, 17, 20, 25 y 30), manteniendo las relaciones geométricas respecto de la lámpara de Xenon y las condiciones de extracción descritas en la metodología utilizada en las soluciones modelos. Para este estudio se tomó un jugo de manzanas clarificado y se le adicionó un estándar de patulina, con el fin de obtener una muestra con una concentración cercana a los 150 µg/l; los ensayos se hicieron por duplicado.

## III. 2. Fumonisin

### III.2.1. Materiales

Se usó acetonitrilo (ACN) y metanol (MeOH) grado HPLC, hexano, acético glacial (AcOH) y ácido fosfórico grado A.C.S., todos los solventes utilizados fueron marca J.T. Baker y el agua utilizada fue grado HPLC, obtenida del sistema de purificación de agua NANOpure Diamond (Barnstead International, modelo D1191). O-ftaldialdehído (OPA) (marca Sigma) y 2-Mercaptoetanol calidad analítica (marca Applichem).

Hidróxido de potasio en escamas (KOH), Bisulfito de sodio Fosfato de sodio bibásico anhídrido ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ), todos grado A.C.S. y de marca J.T. Baker.

Nitrógeno ( $\text{N}_2$ ) extra seco, provisto por Oxígeno Central.

Las columnas de extracción en fase sólida (SPE) empleadas fueron, amino cuaternarias Bakerbond, marca J.T. Baker, SAX (500 mg/10ml) marca UCT (número de parte CUQAX15Z), Chromabond C18 (3ml/500mg) marca Macherey-Nagel y OASIS® HLB (3cc/60 mg) marca Waters (N° de parte WAT094226).

### III.2.2. Estándares

Los estándares utilizados fueron, fumonisin  $B_1$  de *Fusarium verticillioides* (FB1) marca Sigma (Lote 025K4020, pureza del 97.5% medido por cromatografía en capa delgada), mientras que las fumonisin  $B_2$  y  $B_3$  fueron una donación de la Dra. Mary Trucksess. A partir de dichos estándares se procedió al fraccionamiento de los mismos con el fin de obtener viales con cantidades de toxina adecuadas para poder

realizar tanto las curvas de calibración, como las pruebas de recuperación en los distintos métodos de extracción utilizados.

Para esto se resuspendió en MeOH los estándares en sus recipientes originales y se los traspasó cuantitativamente a matraces aforados para hacer las diluciones, para obtener una amplia gama de concentraciones. Las soluciones de estándares se fraccionaron en viales silanizados color ámbar.

El secado de las distintas soluciones se realizó bajo corriente de N<sub>2</sub>, a temperatura ambiente. Los extractos secos obtenidos fueron almacenados a -20°C hasta el momento de su utilización. Cabe destacar que las fumonisinas (FBx) no tienen absorción en el UV, por lo que no fue posible una verificación por medio de un espectrofotómetro para determinar la concentración exacta de las soluciones obtenidas, tal como se realizó con los estándares de PAT. Esto hizo imprescindible trabajar con pesos y no con volúmenes para minimizar los errores cometidos.

#### **III.2.2.1. Obtención de estándares de los hidrolizados de fumonisinas**

Se observó que durante el estudio del comportamiento de estas micotoxinas en la molienda húmeda de maíz, las mismas se reducen durante el proceso, esto llevó a la hipótesis de la formación de productos de degradación o formación de compuestos conjugados con la matriz, de maneras similares a las descritas en el punto I.2.5. de la introducción.

El estudio de esta hipótesis, planteo la necesidad de tener estándares de fumonisinas totalmente hidrolizadas (HFBx), como los mismos no se encuentran en el mercado, se procedió a realizar la hidrólisis de las FBx con una solución de KOH

2N durante toda la noche a temperatura ambiente y en oscuridad. Federico (2009) comprobó que estas condiciones de reacción convierten en su totalidad las FBx en HFBx

Durante la manipulación de estándares se trabajó con una máscara de protección, además de los elementos de seguridad personal (delantal, guantes y gafas) con los que se contó para el análisis de muestras y preparación de soluciones de trabajo.

Todo el material de vidrio utilizado durante los análisis, se limpió según el siguiente procedimiento: inmersión del mismo en una solución de hipoclorito de sodio, la cual se prepara diluyendo una parte de una solución comercial de hipoclorito (con una concentración entre 5 y 6%), con diez partes de agua. Después del tratamiento, el material se enjuagó abundantemente con agua corriente, luego con agua destilada y se realizó un último enjuague con agua grado HPLC, y se secó por escurrimiento. Todo material no volumétrico luego del lavado, fue puesto durante al menos 6 horas en una mufla a 550 °C.

### **III.2.3. Muestras**

Las muestras analizadas fueron el maíz y los productos obtenidos a partir de la molienda húmeda del grano. Se estudió dicho proceso primero en escala planta piloto y en una segunda etapa en escala planta industrial. Los productos obtenidos a partir de este procesamiento son: germen, gluten o gluten meal, fibra o gluten feed,

almidón y aguas de maceración. En el caso de la molienda a escala planta piloto se obtuvo una fracción adicional que son las aguas de lavado.

Para el estudio a escala planta piloto se analizaron un total de 33 muestras de maíz del híbrido tipo “flint” de la campaña 1999, contaminados naturalmente con FB<sub>1</sub>, FB<sub>2</sub> y FB<sub>3</sub>, las muestras analizadas fueron seleccionadas con el propósito de abarcar un gran rango de concentraciones de estas toxinas.

En el estudio a escala industrial se analizaron muestras de un total de 19 procesos de maíz correspondiente a la campaña 2005 provistas por una empresa que realiza molienda húmeda de maíz.

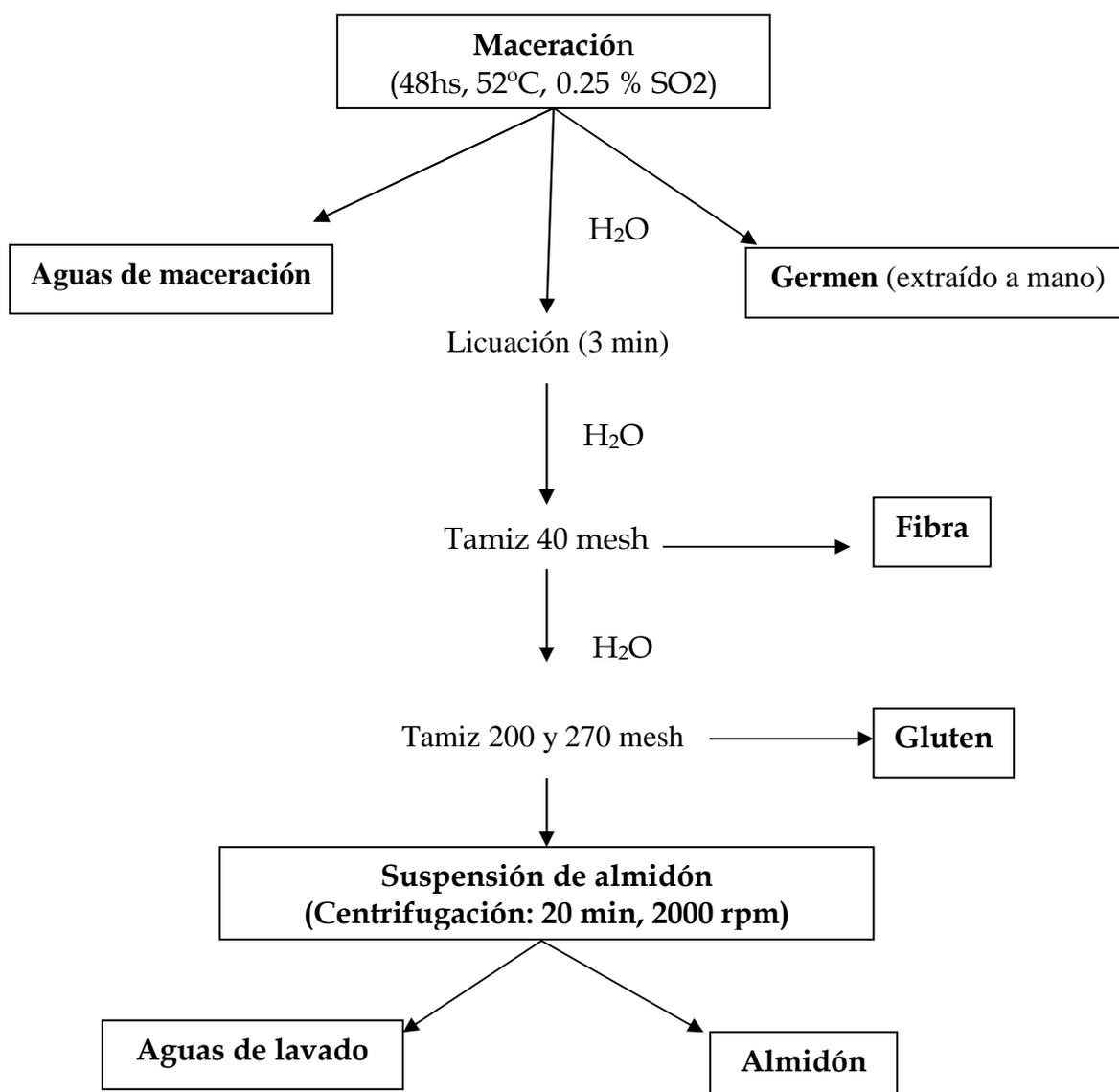
También se analizó el proceso de extrudado de la harina de maíz durante la fabricación de palos de harina de maíz “chizitos”, para esto, se tomaron seis muestras de la materia prima (harina de granulometría definida) y los productos elaborados con ellas. Se estudió la contaminación de fumonisinas libres y fumonisinas unidas en ambas matrices.

### **III.2.3.1 Molienda húmeda escala planta piloto**

La molienda húmeda a escala planta piloto se realizó de acuerdo al método descrito por Haros y Suarez (1997) con algunas modificaciones. Se pesaron las muestras de maíz (aproximadamente 50g), las mismas fueron maceradas en 250 ml de una solución de NaHSO<sub>3</sub> (0,25% SO<sub>2</sub>), durante 48 hs a 52°C. Una vez concluida la maceración, el germen fue separado en forma manual. Después de la degerminación el grano se mezcló con 100 ml de agua destilada y fue molido en una licuadora comercial durante tres minutos. La mezcla obtenida se sometió a tamizados por

distintas granulometrías para obtener las distintas fracciones. El primer tamiz 40 mesh (0.420 mm de apertura) retiene la fracción fibra. En el segundo y tercer tamiz 200 y 270 mesh (0,074 y 0,053 mm de apertura respectivamente) quedó retenido la fracción gluten. El almidón atraviesa todos los tamices al ser arrastrado en todos los pasos por el agua con el que se lava cada fracción. Esta suspensión de almidón obtenida fue centrifugada por 20 minutos en una centrifuga ROLCO modelo 3505 a 2000 rpm (1200 G), se obtuvo así la fracción almidón y al sobrenadante se lo llamó aguas de lavado.

**Figura III.1.** Molienda húmeda escala planta piloto



Las aguas de lavado tienen un volumen de aproximadamente 3000 ml, que es el total del agua utilizada para lavar todas las fracciones (figura III.1).

Todas las muestras obtenidas fueron secadas por liofilización, tanto las aguas de maceración como las aguas de lavado fueron concentradas a 70°C en una estufa de convección forzada, para reducir el volumen previo a ser liofilizadas. Una vez secas las muestras fueron almacenada a -18°C hasta el análisis de fumonisinas.

### **III.2.3.2 Molienda húmeda escala planta industrial**

El proceso de molienda húmeda a escala industrial comienza en la clasificación del maíz ya que debe tener un máximo de 22% de humedad. Luego el primer paso es limpiar los granos recibidos con un retroalimentador. En este paso se elimina el polvillo y por medio de un “zarandón” los restos de marlos, piedras, alambre.

Como segundo paso, se acondiciona la humedad de los granos llevando la humedad de valores de 22 a 15%, esto se realiza en un secadero de cinta transportadora, con aire a 120-130°C. En este proceso la temperatura máxima alcanzada por el grano es de 33°C.

Los granos acondicionados se tamizan en una zaranda de 0,42 mm eliminándose los granos partidos que pasan por este tamiz. Los granos ya limpios y con humedad óptima pasan al silo de almacenamiento, donde permanecen hasta el momento del procesamiento de los mismos.

Del silo de almacenamiento se pasa al silo pulmón. Este alimenta los tanques de maceración. La maceración lleva un mínimo de 40 hs, pudiendo llegar hasta 60 hs.

dependiendo de la clase de producto que se necesite obtener. El agua de maceración contiene 1500 ppm de SO<sub>2</sub>, un pH de 4 y una temperatura de 50 °C. La maceración se realiza como un proceso en semi contracorriente, el maíz queda fijo en los tanques mientras que el agua recorre todo el proceso, el agua limpia es la que se usa en el lavado del almidón que sale del último hidrociclón de la serie, último paso de la molienda húmeda. El agregado del SO<sub>2</sub> se realiza en la última etapa de la maceración. Esta solución de SO<sub>2</sub> es compartida por 18 tanques maceradores, recibiendo el maíz “fresco” el agua con la menor concentración de SO<sub>2</sub> (figura III.3.2). El agua de maceración que se obtiene al final de todo el proceso, contiene un 43-47% de proteínas solubles que se concentran y se agregan a la fracción fibra, aumentando así la digestibilidad y el valor nutricional de la misma.

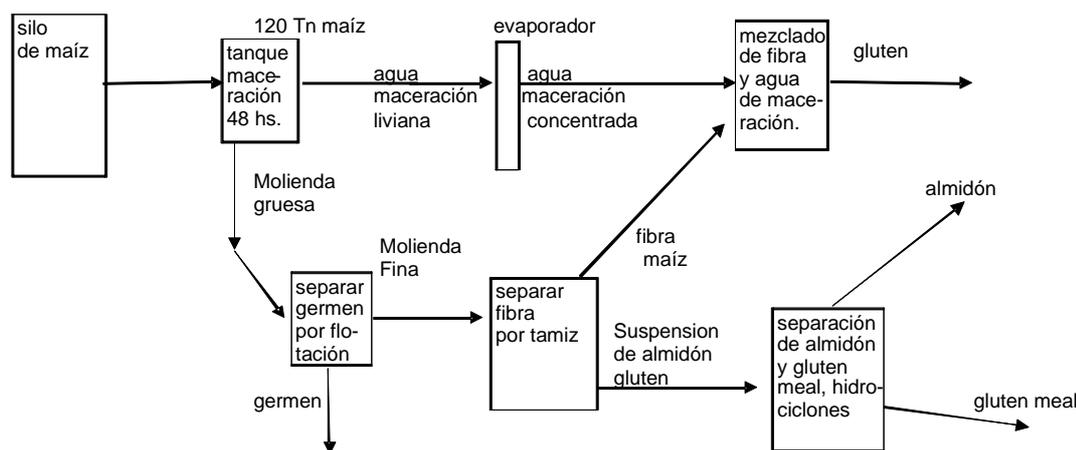
Una vez macerado, los granos de maíz sufren una primera molienda, este paso se denomina molienda gruesa, y solo se produce el desprendimiento del germen, dejando el resto del grano prácticamente intacto. El germen obtenido se separa por flotación, aprovechando la diferencia de densidad que otorga el aceite que contiene esta fracción. Una vez separado el germen se lava, extruda, seca y se ensila para su almacenamiento.

Todas las fracciones obtenidas son secadas y almacenadas, las fracciones recibidas en el laboratorio fueron almacenadas a -18°C hasta el análisis de fumonisinas.

El grano desgerminado es procesado en una segunda molienda, denominada molienda fina, este paso destruye el resto del grano. Una vez molido por completo, se procede a la separación de la fracción fibra; esta se separa por tamizado, quedando

una suspensión que es una mezcla de gluten y almidón. Estas dos fracciones se separan por medio de una serie de hidrociclones (en particular, el proceso estudiado tiene una serie de 9). El gluten más pesado se deposita en estos, resultando una suspensión de almidón, con un 0,4% de gluten al final de la serie. La suspensión a la entrada contiene un 4% de gluten. En la figura III.2 se puede observar el esquema de la molienda húmeda a escala industrial.

**Figura III.2. Molienda húmeda escala planta industrial**



### III.2.3.3 Proceso de elaboración de chizitos.

Los chizitos son fabricados a partir de harina de maíz de granulometría variada. La granulometría que presenta la materia prima es muy importante pues de esto depende la textura final del producto. La harina utilizada es uno de los productos obtenidos a partir de la molienda seca de maíz.

La harina es previamente acondicionada en una pequeña tolva, donde se produce el mezclado y ajuste de la humedad a valores aproximados de 16%. Posteriormente, a través de un tornillo sin fin, se traslada esta mezcla a otra tolva que

se encuentra en la parte superior del extrusor. A partir de allí, se regula por gravedad el paso de la harina que ha de alimentar el extrusor mediante una compuerta que se encuentra debajo de la tolva. El proceso de extrusión utilizado fue de tornillo simple, por el cual se da forma al producto forzándolo a pasar a través de una abertura de diseño específico, por corto tiempo a elevada temperatura. La temperatura se va incrementando por transformación de la energía mecánica en calor en el mismo barril de la extrusora a valores que pueden exceder los 150 °C (Harper, 1989). Este calentamiento es producto del contacto que genera la velocidad impuesta al tornillo y la harina, lo que garantiza las condiciones de fricción y cizallamiento adecuadas. Por las altas temperaturas y la humedad de la masa, se produce en el almidón un hinchamiento que provoca diferentes grados de gelatinización del mismo. Una boquilla colocada al final del extrusor, define las formas características del producto deseado.

El agua presente dentro del extrusor, por las altas presiones existentes, se encuentra, a pesar de las altas temperaturas, en estado líquido. En el momento en que el producto abandona el extrusor la caída abrupta de presión provoca la expansión de la masa y la inmediata evaporación del agua contenida en la misma. Luego que los palos de harina de maíz salen del extrusor, se les da la longitud deseada gracias a una cuchilla de corte ubicada en el extremo del mismo.

La humedad a la salida del extrusor es de 6 a 8% de humedad. Se continua secando el producto por corriente de aire caliente cercana a los 190 °C, hasta una humedad de aproximadamente 1 a 1,5%. Luego se procede a la saborización

recubriendo, mediante aspersión, con una suspensión de aceite, sal y aromatizante. Finalmente es envasado.

En la figura III.3 se puede observar las partes involucradas en el proceso de elaboración.

**Figura III.3.** Línea de elaboración de palos de maíz



### **III.2.4. Determinación y análisis.**

#### **III.2.4.1. Extracción y limpieza de fumonisinas libres.**

##### **III.2.4.1.1. Muestras de maíz y harina de maíz.**

Las muestras de maíz fueron analizadas para determinar la presencia de FB<sub>1</sub>, FB<sub>2</sub> y FB<sub>3</sub>, de acuerdo al método de Sydenham y col. (1992). Se pesaron 25 gramos de muestra y se las agitó en una licuadora Osterizer® (Cycle blend 10 pulse matic) durante dos minutos con 50 ml de una solución acuosa de metanol (25:75). La muestra es filtrada por papel Whattman N° 4.

Una vez obtenido el filtrado, las soluciones se centrifugaron durante 10 minutos a 2200 rpm en una centrífuga Rolco® de mesa. La solución centrifugada se

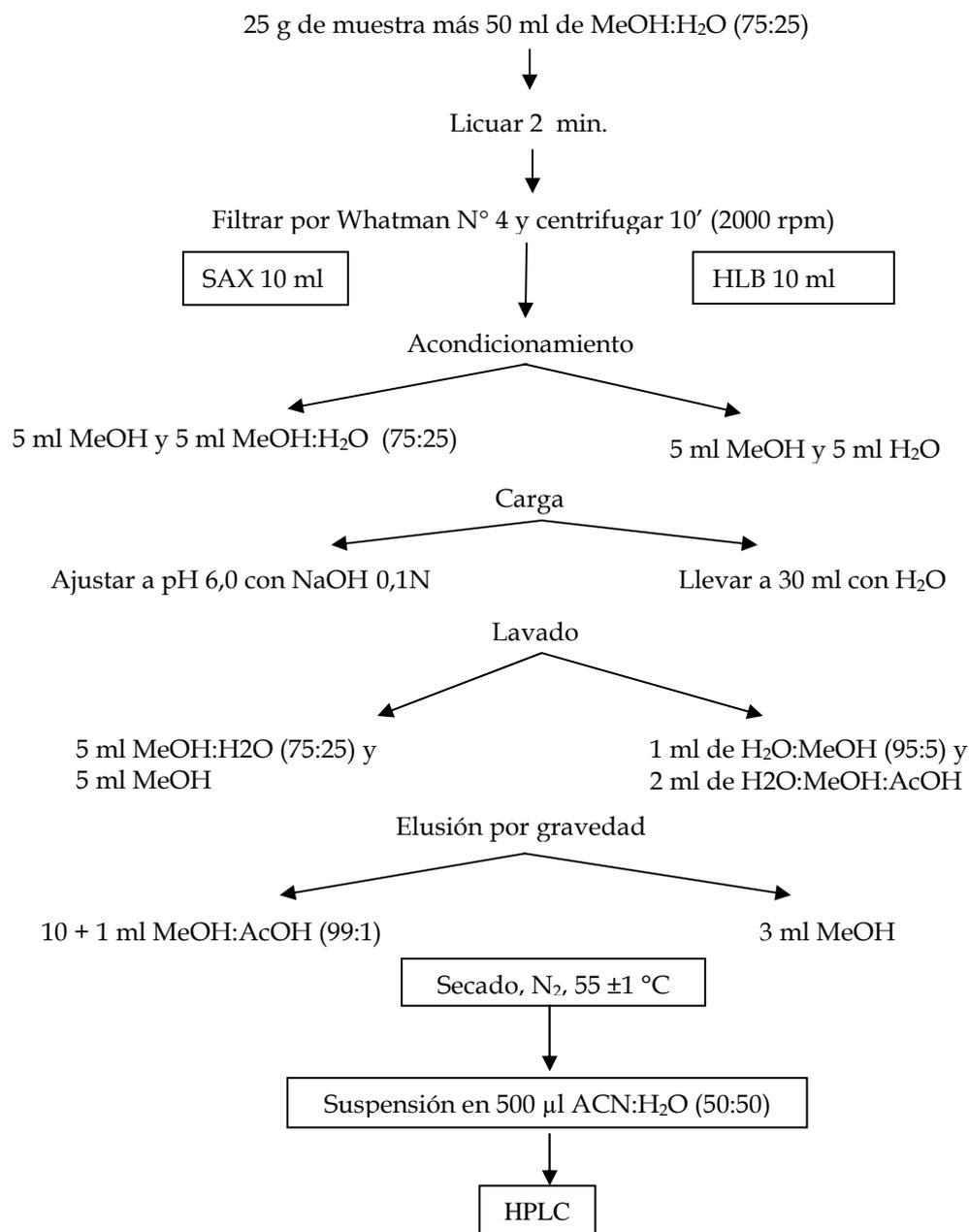
dividió en dos porciones de 10 ml. Una de las fracciones se destino para el análisis de FBx y la otra para la determinación de HFBx.

Para el análisis de FBx, se procedió a la limpieza del extracto por medio de columnas SAX. Las columnas fueron acondicionadas pasando 5 ml de metanol, seguidos de 5 ml de metanol:agua (75:25, v/v). A continuación del acondicionamiento se pasan (cargan) 10 ml del extracto previamente acondicionados a pH 6,0 con NaOH 0,1 N. Al concluir el pasaje de la muestra, la columna se lava con 5 ml de metanol: agua (75:25, v/v) y 5 ml de metanol con el fin de eliminar interferencias. Las FBx se eluyen de la columna de limpieza pasando por gravedad 10 + 1 ml metanol:ácido acético (99:1, v/v).

Estos 11 ml obtenidos fueron llevados a sequedad con corriente de N<sub>2</sub> a 55 ±1 °C. El extracto seco se resuspendió en 500 µl de ACN:H<sub>2</sub>O (50:50, v/v, todas las relaciones de solventes se expresan tanto : o /entre solventes como v/v aunque no se indique), y esta solución final es la que se utilizó para el análisis de estas toxinas por medio del HPLC.

Para la determinación de HFBx, el extracto con las micotoxinas se limpia por medio del uso de columnas OASIS® HLB. Estas columnas previamente fueron acondicionadas eluyendo un volumen de MeOH y uno de agua. Previo a la carga de la solución de extracción en la columna de limpieza, la misma se lleva a 30 ml con agua y se centrifuga 15 minutos a 8000 rpm a 10°C en ultracentrifuga Sorvall Instrument Modelo RC5C, rotor SS-34 (Dupont Company, Newtown), la columna se lava con 1 ml de H<sub>2</sub>O:MeOH (95:5) y 2 ml de H<sub>2</sub>O:MeOH:AcOH (94:5:1).

**Figura III.4.** Extracción de fumonisinas libres



La elusión de los hidrolizados de fumonisinas se realiza pasando 3 ml de MeOH por gravedad por la columna. Esta solución se seca en corriente de N<sub>2</sub> a 55 ±1°C. Se suspende el extracto en 500 µl de ACN: H<sub>2</sub>O (50:50), y esta solución final es

la que se utilizó para el análisis de estas toxinas por medio del HPLC. La figura III.4, esquematiza la extracción y purificación de FBx y HFBx.

#### **III.2.4.1.2. Fracciones de la molienda húmeda de maíz.**

Para la determinación de fumonisinas, las distintas fracciones obtenidas de la molienda húmeda de maíz, fueron procesadas de forma diferencial dependiendo de la humedad que contenían cada una de estas fracciones.

En el caso de las fracciones secas (gluten, fibra, almidón y germen), la extracción se realizó de igual manera a la descrita en el maíz. Para las fracciones húmedas (aguas de maceración en el caso de la molienda en escala industrial), se agregó solamente metanol con el fin de mantener la relación tres a uno con el agua. Luego de esta variación en los solventes, la extracción continuó de la misma manera descrita anteriormente.

#### **III.2.4.1.3. Chizitos**

Las muestras de chizitos fueron analizadas para determinar la presencia de FBx y HFBx, de acuerdo al método desarrollado por Federico (2009). Se pesaron 25 gramos de muestra y se las agitó en una licuadora Osterizer® (Cycle blend 10 pulse matic) durante dos minutos con 75 ml de una solución MeOH: ACN: H<sub>2</sub>O (25:25:50). La muestra se filtra por papel Whattman N° 4. Esta extracción se realiza por duplicado y se juntan los extractos una vez filtrados.

A partir de este paso, la secuencia de limpieza y acondicionamiento es similar a la descrita en el punto III.2.4.1.1, con el único cambio donde los 10 ml destinados al análisis de HFBx, se llevan a 20 ml con agua.

### **III.2.4.2. Extracción y limpieza de fumonisinas totales.**

#### **III.2.4.2.1. Muestras de harina de maíz.**

Para el análisis de fumonisinas totales en maíz, se trató la matriz en un medio alcalino fuerte. Previo al paso de hidrólisis, se procedió a gelatinizar el almidón contenido en la matriz para evitar la formación de un gel que impida la hidrólisis y la posterior extracción de las fumonisinas hidrolizadas.

Se pesan 7 gramos de muestra con precisión de la décima de miligramo y se agregan 20 ml de agua, se homogeniza en Ultraturrax modelo T25 (IKA-Labortechnik) a 9500 r.p.m., durante 10 minutos, luego la mezcla se calienta durante una hora a 60 °C, con agitación continua en baño Memmert modelo WB 14, con agitador Memmert modelo SV 1422.

Transcurrida una hora, se coloca la mezcla de harina de maíz y agua en el Ultraturrax en las condiciones descritas anteriormente y se agregan 20 ml de KOH 4N con el homogenizador funcionando. Una vez agregado el total del álcali, se sigue homogenizando hasta cumplir los 10 minutos. Terminada la agitación, se coloca nuevamente en baño de agua en las mismas condiciones que se realizó la gelatinización.

Terminada la hidrólisis se toman 20 ml de la solución y se procede a la extracción de las HFBx. Esto se realiza agregando 20 ml de AcEt y agitando durante 30 minutos a 340 rpm en un agitador orbital Shaker Pro modelo 6004 (Vicking). La extracción continua sonicando la mezcla durante 15 minutos en baño ultrasónico Branson 2510E-MT (Branson Ultrasonic Corporation) y luego centrifugando durante 10 minutos a máxima velocidad en una centrífuga Rolco® de mesa (2200 rpm). Se extrae el sobrenadante y se repite la extracción una segunda vez, en esta oportunidad se utilizan 15 ml de AcEt.

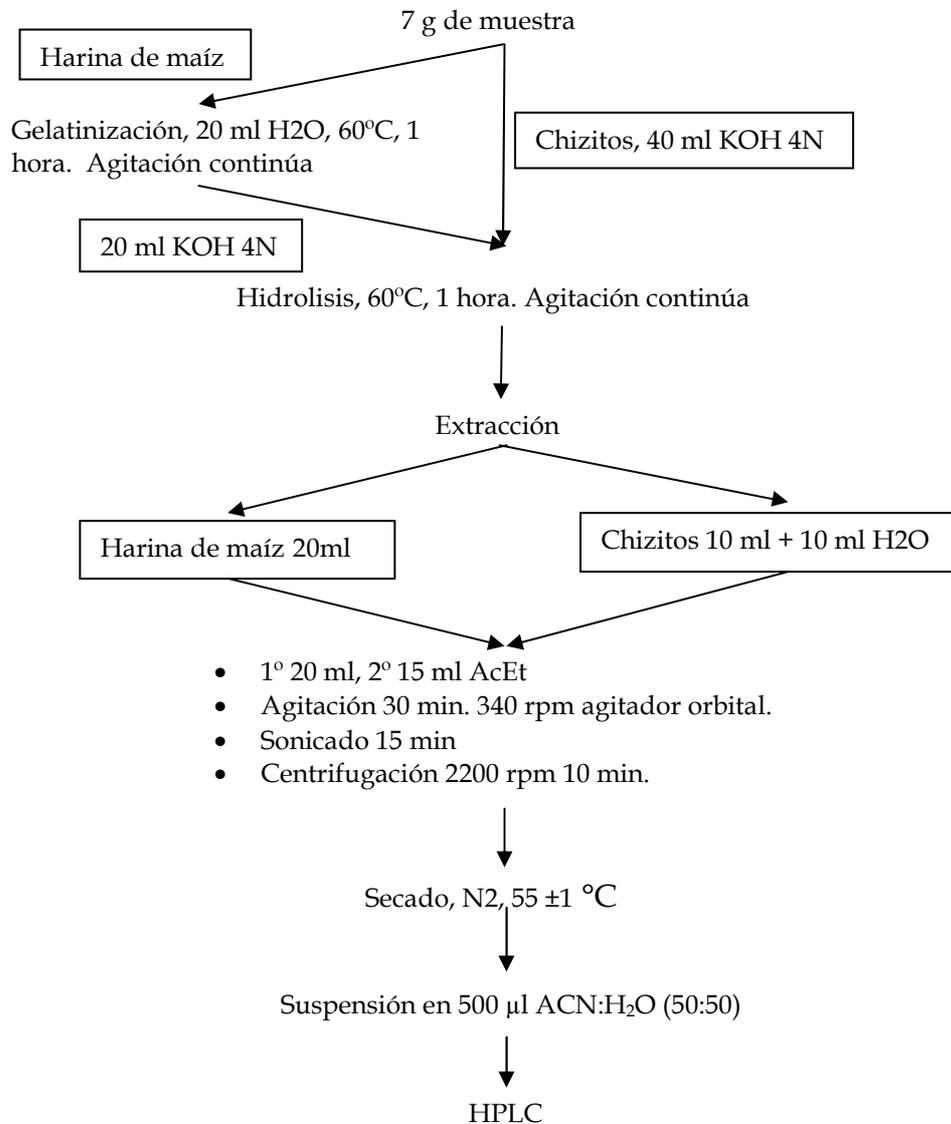
Las extracciones se colectan juntas y se llevan a sequedad bajo corriente de N<sub>2</sub> a 55 ±1 °C. El extracto seco se suspenden en 500 µl de ACN:H<sub>2</sub>O (50:50) para el posterior análisis por HPLC.

#### **III.2.4.2.2. Chizitos.**

El análisis de fumonisinas totales en chizitos, se realizó de manera similar al descrito en maíz (III.2.4.2.1). En el caso de los palos de harina de maíz, no fue necesario realizar el paso de gelatinización previo a la hidrólisis, la misma se realizó con 40 ml de KOH 4N en las mismas condiciones de temperatura, tiempo y agitación antes descrita.

La extracción, se realizó tomando 10 ml de la solución, se agregaron 10 ml de agua y se procedió a realizar la extracción en forma equivalente a lo descrito para la harina de maíz (figura III.5).

**Figura III.5.** Extracción de fumonisinas unidas



### III.2.4.3. Cromatografía líquida

Para el análisis y cuantificación tanto de FBx como de HFBx se utilizó un HPLC, Agilent Serie 1100 con muestreador automático, bomba de gradiente cuaternario, termostatizador de columna y detector de fluorescencia (FLD). La columna analítica usada fue Thermo BDS Hypersil-C18 250x4,6 mm, 5 µm, con guarda columna BDS Hypersil-C18 10x4 mm, 5 µm.

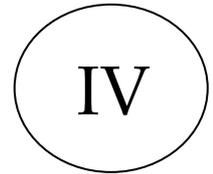
El método cromatográfico analítico, se basa en la metodología oficial AOAC 995.15, utilizando derivatización pre-columna "on-line" con o-ftaldialdehído y 2-mercaptoetanol como agente reductor, midiendo la fluorescencia utilizando como  $\lambda$  de excitación 334 nm y  $\lambda$  de emisión 450 nm. Las corridas se realizaron de forma isocrática y el solvente fue la mezcla de MeOH/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,1M) (73/27 v/v) pH 3,30, ajustado con ácido fosfórico

#### **III.2.4.4. Recuperación, LOD y LOQ, de las metodologías aplicadas.**

La recuperación del método analítico para la determinación de FBx y HFBx, se realizó en todas las matrices analizadas, en aquellas muestras donde no se detectó la presencia de contaminación natural por esta toxina. Se agregó una solución de concentración conocida de FBx y HFBx en ACN, la cantidad agregada fue media gravimétricamente. La recuperación se midió en tres niveles de contaminación, tal que abarcara un rango, desde valores cercanos a los límites de detección, hasta valores próximos a los más altos encontrados en las muestras naturales. En el caso particular del maíz, la recuperación de la metodología desarrollada se realizó sobre una muestra FAPAS.

Los límites de detección y cuantificación, fueron estimados midiendo la altura del ruido, en las muestras en las zonas del cromatograma cercanas (un minuto antes o después) a los picos de interés, siempre y cuando esta zona no presente picos, en ese caso se busca una zona donde no se encuentren picos para realizar estas mediciones, dicho ruido fue determinado mediante el programa HP Chemstation, como dos veces la desviación estándar de la regresión lineal del ruido en la zona

determinada. El límite de detección se determinó como tres veces la señal del ruido, en tanto el límite de cuantificación como cinco veces la señal del ruido.



## **Resultados y Discusión**

## **IV.1. PATULINA**

### **IV.1.1. Metodología analítica**

La búsqueda bibliográfica sobre metodología analítica para cuantificar patulina, en productos como mermelada, no arrojó información aplicable a este tipo de productos con alto contenido de azúcares. Por lo tanto, se procedió a desarrollar y validar una metodología para la cuantificación de patulina en estos productos.

#### **IV.1.1.1. Comportamiento de la columna de extracción en fase sólida**

La publicación de Li y col (2007), donde desarrolló una metodología para determinar patulina en jugos de manzana, se eligió como base inicial para el desarrollo de la metodología analítica para la determinación de patulina en las distintas matrices. En primer lugar, se procedió a verificar el funcionamiento de las columnas SPE Multisep 228.

Para establecer la pérdida de patulina que se podría producir por la utilización de esta columna de limpieza se pesaron aproximadamente 4 g de mermelada, a los cuales se les agregó los solventes de extracción. Luego de adicionar 4 ml de agua y 21 ml de ACN se fortificó (“espiqueo”) con volúmenes medidos de un estándar de patulina de 2,58 µg/ml. Se agitó durante un minuto y se filtraron los extractos por papel de filtro y se pasaron 6 ml por la columna SPE Multisep 228; 4 ml se secaron con N<sub>2</sub> a temperatura ambiente y se resuspendió el extracto en 500 µl de AcOH 0,1%.

**Tabla IV.1.** Recuperación de patulina al utilizar la columna SPE Multisep 228 (n=2)

Recuperaciones primera prueba		
Nivel (µg/kg)	% Recuperación	%Coeficiente de variación
56,5	94,8	2,4
31,9	101,8	3,8
9,8	126	48

Los resultados de esta experiencia, mostraron buenas recuperaciones de patulina con esta columna (tabla IV.1), lo cual indicó que ésta podía ser utilizada para la limpieza de los extractos de los varios productos a analizar aunque, en el nivel más bajo probado (9,8 µg/kg), con la metodología aún no puesta a punto, se obtuvo un valor del coeficiente de variación de 48%. Durante esta prueba se observó, que a los fines prácticos, se debe agregar en primer lugar el agua y tratar de disolver la mayor cantidad de muestra antes de agregar el ACN. Si se agrega primero el ACN no se logra disolución de la mermelada.

#### **IV.1.1.2. Volumen de resuspensión de los extractos**

Estas pruebas de recuperación se realizaron agregando el estándar a la mermelada sólida (aproximadamente 5 g), entre el “espiqueo” y la extracción se deja reposar la matriz con el estándar agregado al menos 6 horas, luego se agregaron 4 ml de agua y 21 ml de ACN, en ese orden, por lo mencionado en el punto anterior.

Se filtró y se pasó 10 ml del extracto por la columna SPE Mycosep 228, se tomaron 6 ml que se llevaron a sequedad con nitrógeno a temperatura ambiente, se

resuspendió el extracto en 200  $\mu$ l y 300  $\mu$ l de AcOH 0.1%, para su posterior análisis por HPLC.

**Tabla IV.2.** Recuperación de acuerdo al volumen de resuspensión

Nivel de mermelada ( $\mu$ g/kg)	% Recuperación	Resuspensión ( $\mu$ l)
100,0	140,9	200 (n=2)
51,2	146,7	
25,4	195,8	
73,3	104,4	300 (n=3)
38,7	123,5	
18,3	101,4	

Se observó que al resuspender en 300  $\mu$ l, los valores de recuperación fueron más adecuados para lo esperado de una técnica analítica, los coeficientes de variación para este volumen de resuspensión fueron de: 4,7, 14,4 y 13,5% para los niveles de contaminación de 73,3, 38,7 y 18,3  $\mu$ g/kg, respectivamente.

#### IV.1.1.3. Volumen de solventes de extracción y masa de muestra

Con el fin de obtener valores de LOD y LOQ, los mas bajos posibles, se decidió trabajar con mayor cantidad de muestra, llevando los 4-5 g de las pruebas descriptas hasta 10 g de muestra. Este aumento de masa implicó un aumento del volumen del solvente de extracción. Se agregaron distintos volúmenes de agua 6, 8 y 10 ml. El volumen de 8 ml de agua llega a cubrir bien la muestra. Esta prueba de aumentar la masa inicial y agregar la menor cantidad de agua, tal que siga haciendo

posible desde el punto de vista práctico la extracción, se hizo buscando la menor cantidad de solvente para realizar la extracción, con el propósito de mantener bajos los límites de detección y cuantificación. Por ello, se le agregó sólo 8 ml de H<sub>2</sub>O y 32 ml de ACN, con lo cual se disminuyó la relación ACN/agua de 5,25 a 4,00. La mayor masa de muestra necesitó de un nuevo ajuste del volumen de resuspensión de los extractos. Se realizó un estudio similar al del punto IV1.1.2, fijándose ahora el volumen en 500 µl de AcOH 0,1%.

#### **IV.1.1.4. Utilización de una digestión enzimática**

Con el aumento de la masa de muestra se obtuvo una recuperación de la patulina agregada del orden de 80 a 95%. Para mejorar el rendimiento de la extracción, se probó el agregado de un paso previo a la extracción, una hidrólisis enzimática con pectinasa. Boonzaaijer y col. (2005), probaron que la concentración de enzima no debe ser menor a 1500 unidades/g incubando con la enzima durante toda una noche, a temperatura ambiente y a resguardo de la luz.

Se tomaron los 10 g de muestra por triplicado para cada nivel de contaminación, se agregaron los 8 ml de agua y 150 µl de la solución de pectinasa (descrita en III.1. Patulina), dejando actuar la enzima durante toda la noche. Luego se agregaron 32 ml de ACN para cortar la hidrólisis y empezar con la extracción.

Después de homogeneizar en un agitador magnético (Precytec modelo AE28) durante dos minutos, se dejó decantar la muestra, luego se filtró por papel y 25 ml del extracto filtrado se pasaron por la columna SPE Mycosep 228. Del extracto limpio se tomaron 20 ml que fueron llevados hasta casi 2 ml, en vacío a 40°C en un

evaporador rotatorio (Laborota 4000, Heidolph), el extracto reducido se traspasó a un tubo de ensayo y se llevo a sequedad bajo atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente. El residuo seco fue resuspendido en 500 µl de AcOH 0,1% y se analizó por HPLC. En la Tabla IV.3 se pueden observar los valores medios de recuperación en todas las matrices para tres niveles de contaminación.

**Tabla IV.3.** Cuarta prueba de recuperación

Producto	Nivel de cont. (µg/kg de producto)	Recuperación (n=3)		
		% Promedio	Desv. Est.	% CV
<i>Mermelada de manzana y pera. Jalea de manzana</i>	18	101	13,7	13,7
	30	99	6,0	6,1
	60	99	4,6	4,6
<i>Puré de manzana</i>	10	75	3,9	5,2
	50	73	6,1	8,4
	140	105	4,4	4,2

Desv. Est. Desviación estándar, %CV: % coeficiente de variación

Esta metodología se comparó con la extracción con acetato de etilo, ya que es la más comúnmente usada en la bibliografía. La extracción con AcEt se realizó agregando a 10 g de una mermelada de manzana sin contaminación natural por patulina, tres porciones de 20 ml de solvente orgánico en cada repetición. Se mezclaron con un agitador magnético (Precytec modelo AE28) durante dos minutos, se juntaron los extractos orgánicos y se secaron bajo atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente. Los residuos secos se resuspendieron en 500 µl de AcOH 0,1% y luego se analizaron por HPLC.

También se comparó con el agregado del paso enzimático y extracción con AcEt, para esto se agregaron 8 ml de agua y 150 µl de la solución de enzima descrita anteriormente, para luego extraer con AcEt, según se describió más arriba. Se pueden observar en la Tabla IV.4 los valores medios de tres repeticiones.

**Tabla IV.4.** Comparación de las distintas extracciones (n=3)

		<b>% Recuperación</b>	<b>% CV</b>
<i>Extracción Acetato de Etilo</i>	Sin pectinasa	80,4	7,8
	Con pectinasa	117,3	
<i>Extracción agua/ACN y SPE</i>	Sin pectinasa	95,1	3,9
	Con pectinasa	103,6	

%CV: % coeficiente de variación (prueba realizada en un nivel de contaminación de 31,6 µg/kg).

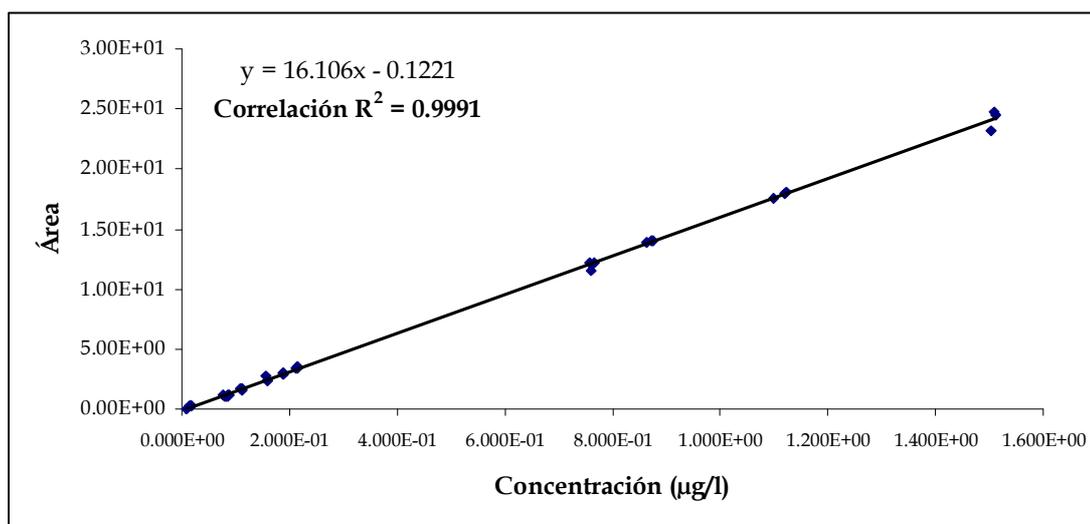
Al comparar ambos procedimientos se observó que al utilizar la mezcla agua/ACN, la recuperación fue un 18% mayor que cuando se utiliza AcEt. En ambas pruebas se pudo observar que la utilización de un paso previo con hidrólisis enzimática mejora la recuperación un 9% en la mezcla de solventes y un 45% cuando se utiliza sólo AcEt.

#### **IV.1.1.5. Curva de calibración**

La linealidad del método de cuantificación se analizó con once niveles de estándares en el rango de 2,5-240 µg/L. Las soluciones fueron preparadas por diluciones sucesivas en ácido acético 0,1%.

La curva de calibración fue determinada por triplicado usando diluciones independientes. En el gráfico IV.1 se observa la curva de calibración utilizada para cuantificar el contenido de patulina en las muestras analizadas.

**Gráfico IV.1.** Curva de calibración de patulina



El coeficiente de correlación lineal de la curva de calibración fue igual a 0,9991.

#### **IV.1.1.6. Límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ)**

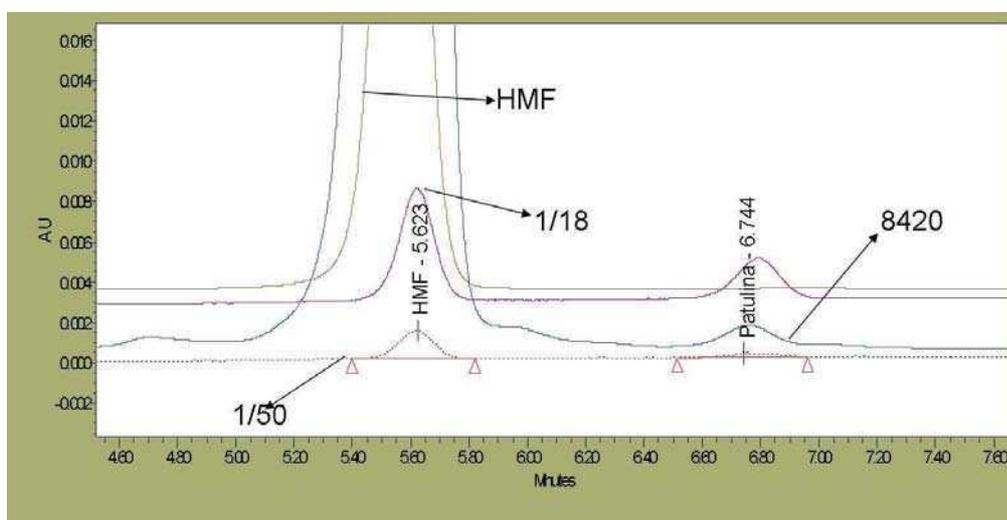
Los LOD determinados fueron de 2,8 µg/kg para mermelada, jalea y dulce de manzana y pera y 3,8 µg/kg para puré de manzana y los LOQ calculados fueron 6,3 µg/kg para puré de manzana y 4,7 µg/kg para el resto de los productos analizados. Estas estimaciones se realizaron calculando el ruido como fuera descrito en el punto III.1.4.4. de Materiales y Métodos.

#### **IV.1.1.7. Cromatografía y confirmación de muestras positivas**

Es de observar que en la bibliografía se remarca el problema que causa el HMF en la determinación de patulina, por el hecho de encontrarse muy próximo en cuanto al tiempo de retención y debido a que siempre se encuentra en muy altas cantidades respecto de la patulina. En la Figura IV.1 se muestran cromatogramas superpuestos de una mezcla de estándares de HMF y patulina a dos concentraciones diferentes (línea violeta y negro de puntos), estándar de HMF solo (línea marrón) y el cromatograma de una muestra naturalmente contaminada 8420 (línea azul). Se puede observar, la óptima resolución entre los picos correspondientes a los dos analitos.

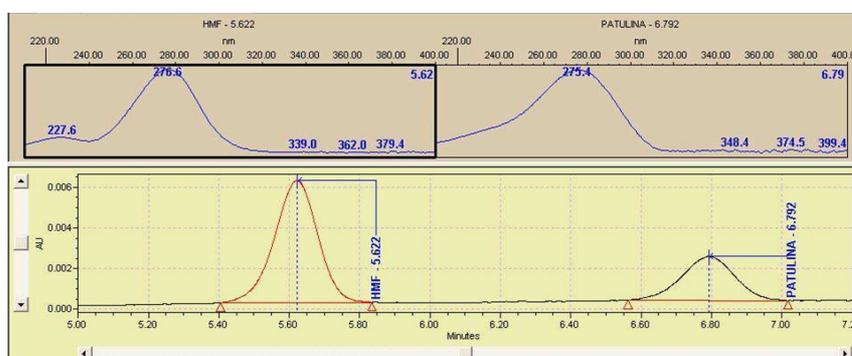
En la Figura IV.2 se encuentra el cromatograma de estándares y sus respectivos espectros UV-Visible. Los espectros de los estándares se compararon con el espectro del pico que sale en la muestra en el mismo tiempo de retención que el estándar de la micotoxina analizada, un ejemplo de ello es la muestra 8420 de puré de manzana lo que se observa en la Figura IV.3.

Figura IV.1. Cromatograma de muestra contaminada y estándares



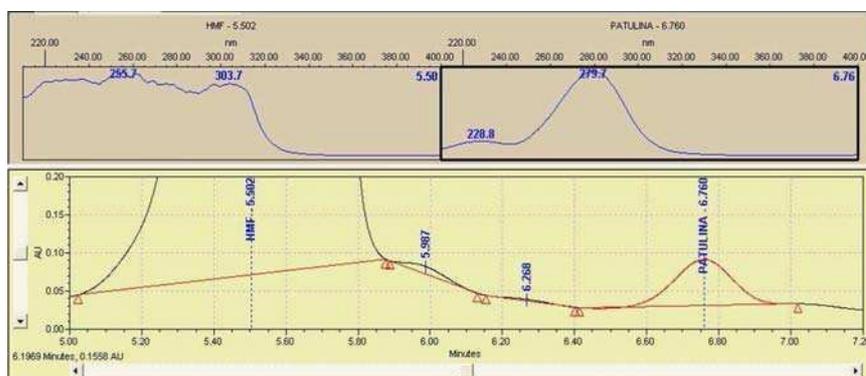
8420: muestra naturalmente contaminada (línea azul); HMF: estándar de HMF (línea marrón)  
1/18 y 1/50: Mezcla de estándares de patulina y HMF (líneas bordo y negro de puntos)

Figura IV.2. Estándar de patulina y HMF



Superior: espectro UV de HMF y PAT  
Inferior: cromatograma de mezcla de HMF y PAT

**Figura IV.3.** Muestra naturalmente contaminada



Superior: espectro UV

Inferior: cromatograma de muestra naturalmente contaminada

Al comparar los espectros de ambos picos se observa que coinciden, con lo cual se puede asegurar que el pico analizado y cuantificado en las muestras corresponde a la micotoxina buscada.

#### **IV.1.1.8. Comparación de la metodología utilizada con la presente en la bibliografía**

En esta sección se compara la metodología desarrollada y validada respecto de algunos trabajos donde se plantearon métodos para determinar patulina en distintos productos de manzana.

En las tablas IV.5 a IV.8 se pueden observar los valores de recuperación de la metodología desarrollada por Boonzaaijer y col. (2005); Iha y Sabino (2006); Li y col. (2007); Valle-Algarra y col. (2009).

**Tabla IV.5.** Metodología de Boonzaaijer y col. (2005)

	Nivel ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	% Recuperación	% RSD
<i>Jugo de manzana</i>	25,4	87	11 (n = 5)
	47,1	112	3 (n = 5)
	94,3	99	6 (n = 6)
	942,9	83	6 (n = 6)
<i>Manzana</i>	25,4	63	17 (n = 5)
	47,1	71	13 (n = 5)
	94,3	80	13 (n = 6)
	942,9	80	6 (n = 6)

**Tabla IV.6.** Metodología en jugo de manzanas de Iha y Sabino (2006)

Nivel ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	% Recuperación (n=6)	% CV
215	81,1	6,0
39	81,7	6,0
7	91,7	7,7
<b>LOD:</b> 3 $\mu\text{g}/\text{l}$ ; <b>LOQ:</b> 7 $\mu\text{g}/\text{l}$		

**Tabla IV.7.** Metodología en jugo de manzanas de Li y col. (2007)

Nivel ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	% Recuperación	% RSD
62,5	92,28	8,37
31,5	88,13	6,24
10	86,19	5,15
<b>LOD:</b> 8 $\mu\text{g}/\text{l}$ ; <b>LOQ:</b> 23 $\mu\text{g}/\text{l}$		

Se puede observar que la metodología desarrollada y puesta a punto en esta tesis, que se esquematiza en la Figura IV.4 tiene, en comparación con aquellas publicaciones donde trabajaron con productos sólidos de manzana (Boonzaaijer y

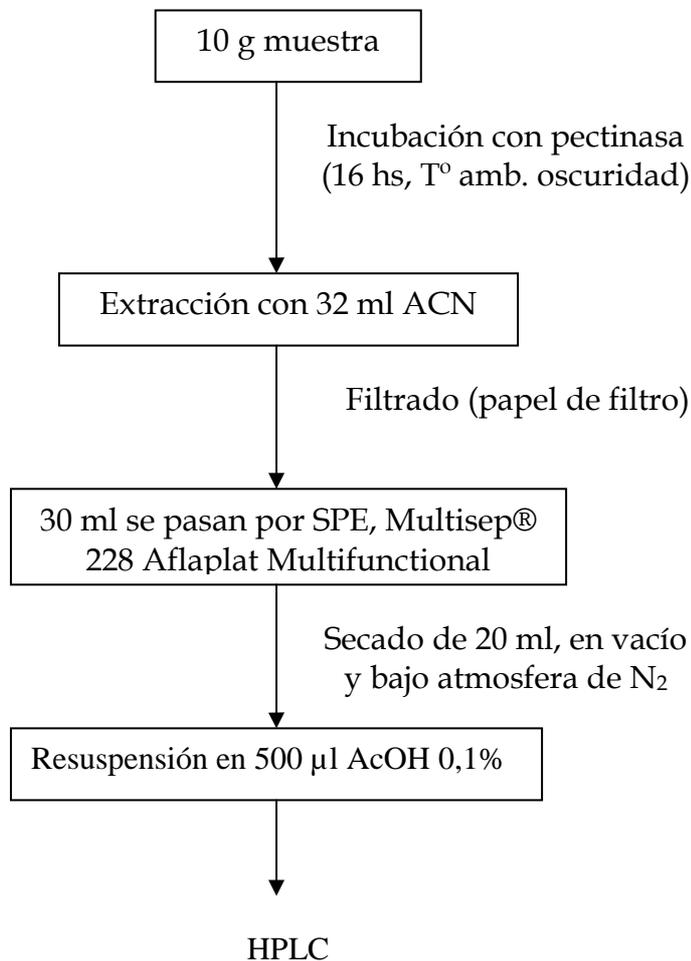
col. 2005, en manzanas y Valle-Algarra y col. 2009, puré de manzana), valores de recuperación en el caso de Valle-Algarra y col. (2009), un 15% mayor comparado con los valores medios de recuperación para el puré, en el caso del trabajo de Boonzaaijer y col. (2005) al comparar la recuperación del puré con el obtenido por estos autores, un 15 % mayor y en el resto de los productos, se obtiene con esta metodología una recuperación casi 30 % más alta. Mirando los valores de error de la metodología, se puede observar que el método propuesto tiene una variación porcentual similar a los trabajos de los autores mencionados.

**Tabla IV.8.** Metodología de Valle-Algarra y col. (2009)

Nivel (µg/kg)	% Recuperación (n=3)	% RSD
<b>Metodología 1:</b> LLE–NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , LOD: 2,0 µg/kg		
20	71,6	6,8
50	73,6	5,6
100	82,9	3,1
1000	77,0	1,7
<b>Metodología 2:</b> LLE–NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> –sílica, LOD: 2,1 µg/kg		
20	62,4	9,3
50	63,9	5,8
100	67,8	4,0
1000	69,2	4,9
<b>Metodología 3:</b> LLE–NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> –C18, LOD: 1,3 µg/kg		
20	65,4	8,2
50	62,3	6,4
100	55,1	6,2
1000	52,3	8,0
<b>Metodología 4:</b> LLE–NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> –C18, LOD: 1,4 µg/kg		
20	70,1	8,7
50	74,3	6,2
100	71,6	8,9
1000	69,3	5,7

Metodologías 1, 2 y 3: jugo de manzana, metodología 4: puré de manzana

**Figura IV.4.** Esquema de extracción y *clean-up* de patulina desarrollado



En la Tabla IV.9 se han incluido los criterios publicados en el Diario Oficial de la Unión Europea (EU, 2006) para metodologías analíticas, para las distintas micotoxinas, donde establecen rangos para el valor de recuperación y los valores de error en la metodología desarrollada, según el contenido de ellas en los distintos alimentos.

**Tabla IV.9.** Criterios de funcionamiento para la patulina, según UE (2006)

<b>Contenido <math>\mu\text{g}/\text{kg}</math> Patulina</b>	<b>RSD<sub>r</sub> %</b>	<b>RSD<sub>R</sub> %</b>	<b>% de recuperación</b>
< 20	$\leq 30$	$\leq 40$	de 50 a 120
20-50	$\leq 20$	$\leq 30$	de 70 a 105
> 50	$\leq 15$	$\leq 25$	de 75 a 105

RSD<sub>r</sub>: Desvío estándar porcentual de repetibilidad

RSD<sub>R</sub>: Desvío estándar porcentual de reproducibilidad

Podemos observar al analizar la Tabla IV.9 que la metodología desarrollada, cumple con los rangos de recuperación y varianza propuestos en las normas fijadas por la Unión Europea.

En el año 2003, la “Commission Regulation-EU” introdujo cambios en sus normas desglosando el nivel máximo permitido para los distintos productos. Hasta ese momento sólo se encontraba legislada la cantidad máxima en jugos de manzana, regulando para alimentos destinado a bebés un máximo permitido de 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  para patulina (límite más estricto para todo alimento producido en base a manzana). Debido a que los alimentos en base a manzana, destinados al consumo de infantes, están compuestos mayormente con puré, la metodología puesta a punto en este trabajo, con los límites de detección y cuantificación logrados para este producto (3,8 y 6,3  $\mu\text{g}/\text{kg}$  respectivamente), permiten contar con un método adecuado para detectar valores cercanos al máximo establecido por la norma en los alimentos destinados al consumo de infantes.

#### IV.1.2. Ocurrencia natural de patulina

En la Tabla IV.10 se observa el resumen de los valores de contaminación natural obtenidos en los productos estudiados (en el anexo, se pueden observar los datos de los análisis completos).

**Tabla IV.10.** Ocurrencia natural de patulina en productos sólidos y semisólidos de manzana y pera comercializados en Argentina

Productos		N° de posit./ Total	Rango de muestras positivas (µg/kg)	Promedio muestras positivas (µg/kg)	Medias de contaminación (µg/kg)		
					ND = 0 (1)	ND = LOD (1)	ND = LOD/2 (2)
<i>Manzana</i>	<i>Mermelada</i>	6/26	17-39	27,0	6,2	8,4	7,4
	<i>Jalea</i>	0/7	-	-	0	2,8	1,4
	<i>Dulce</i>	0/4	-	-	0	2,8	1,4
	<i>Puré</i>	4/8	22-221	123,0	61,5	63,2	62,3
<i>Pera</i>	<i>Mermelada</i>	1/6	25	25	4,2	4,8	4,6
<b>Total</b>		11/51	17-221	61,7	13,3	15,4	14,4

(1) GEMS/Food-Euro (1995); (2) Task 3.2.8 (2002), ND = no detectado.

Se puede observar una incidencia del 20% (11/51) de muestras positivas, respecto del total de muestras analizadas. Desglosando por productos, se observa que si bien la incidencia de muestras positivas es baja, el promedio de contaminación, al tomar sólo las muestras positivas, supera o iguala los valores máximos permitidos por la "Commission Regulation-EU" (2001) para productos sólidos o semisólidos (25 µg/kg). El puré de manzana tiene un promedio de contaminación de 123,0 µg/kg, teniendo un máximo de 221 µg/kg. Este producto, a su vez, tiene una alta incidencia de contaminación (50%) sobre las muestras

analizadas. Si bien todos los productos analizados son consumidos por la población argentina y tienen que ser considerados, para un estudio de exposición de esta micotoxina, los productos que presentaron mayor contaminación fueron productos provenientes de México y Brasil.

Para un posible estudio de exposición a esta toxina, se calcularon los promedios de contaminación sobre el total de las muestras. Se hizo el estudio tomando tres criterios, para las muestras donde no se detectó contaminación, se consideró  $ND=0$ ;  $ND=LOD$  o  $ND= \frac{1}{2} LOD$ , los dos primeros criterios se tomaron del GEMS/Food-Euro del año 1995 y el último del trabajo en colaboración de científicos de la Unión Europea (Scoop, 2002).

Al utilizar o tomar estos criterios, tenemos un promedio de contaminación de todos los productos menor a los límites establecidos por la UE, salvo el puré de manzana donde este estudio muestra medias de contaminación superiores, incluso a los valores permitidos para jugo de manzana ( $50 \mu\text{g}/\text{kg}$ ).

Este fue el primer trabajo realizado en Argentina que incluyó el desarrollo de una metodología para la determinación de patulina en productos sólidos y semisólidos de manzana y pera, y el estudio de ocurrencia natural de esta toxina en productos comercializados en el país.

Según el estudio más exhaustivo encontrado, realizado por un comité de científicos de la UE del año 2002, resumido en el "Reports on tasks for scientific cooperation Task 3.2.8" (Tabla I.1.4.2. Contaminación de distintos productos) muestra para el caso del puré de manzana: 7/97 positivas sobre el total de muestras y un máximo de  $86 \mu\text{g}/\text{kg}$  (Francia), 2,5 veces menor que el valor máximo encontrado

en Argentina. Al compararlo con un estudio publicado en el año 2010 por Barreira y col. (Tabla I.1.4.2) sobre la ocurrencia de patulina en productos de manzana comercializados en Portugal entre los años 2007-2009, se observó que el puré de manzana comercializado en Argentina presentó una contaminación donde el máximo encontrado es aproximadamente 39 veces más alto que el encontrado por este trabajo.

O sea, la ocurrencia de patulina y la concentración de ésta encontrada en los productos comercializados en Argentina, al ser comparados con estudios realizados en otros países, mostraron que en el puré de manzana la contaminación es mucho más alta, al igual que la frecuencia de muestras positivas.

#### **IV.1.3. Decontaminación de patulina por tratamiento con luz pulsada**

Tal como indican Fernández-Cruz y col. (2010), la elección de frutas que no presenten “pudrición marrón” disminuye pero no elimina por completo la contaminación por patulina en productos elaborados con manzana. Es necesario entonces el desarrollo de metodologías que tiendan a disminuir la incidencia y los niveles de contaminación en los alimentos producidos con manzanas.

Con esta premisa se realizaron pruebas para estudiar la posible aplicación de luz pulsada, con el fin de bajar la contaminación de patulina inicial. Primero se probó en soluciones modelo con distintas concentraciones de esta micotoxina, para luego pasar a realizar el análisis sobre el puré de manzana, ya que este fue el producto que presentó mayores niveles de contaminación. La búsqueda de productos naturalmente contaminados se realizó dos años después del estudio de ocurrencia

descripto anteriormente. En esta nueva adquisición de productos de manzana, se logró hallar sólo una muestra naturalmente contaminada y debido a que la homogenización en la adición de patulina no resulta confiable, se decidió probar con un jugo de manzana clarificado, al cual se le agregó una concentración conocida de patulina. Luego se procedió al tratamiento con luz pulsada, tal cual como se hizo con la solución modelo.

#### IV.1.3.1. Dosis en la cabina de luz pulsada

En la Tabla IV.11 se colocaron los valores medios de la dosis medida para un pulso de luz, dicha medición se realizó por triplicado. La medición de la dosis se verificó respecto de la posición geométrica de la lámpara (centro y extremos) y de la distancia existente en los estantes donde son colocadas las muestras a tratar (5, 10 y 15 cm).

**Tabla IV.11.** Dosis por pulso en la cabina de luz pulsada respecto de la posición geométrica y la distancia a la lámpara (n=3)

Posición respecto de la lámpara de Xenón	Distancia del estante respecto de la lámpara					
	5cm J/cm <sup>2</sup>		10cm J/cm <sup>2</sup>		15cm J/cm <sup>2</sup>	
	Media	%CV	Media	%CV	Media	%CV
Parte central	0.737	0.369	0.398	2.459	0.256	-----**
Extremo A	0.420	0.646	0.192	3.986	0.144	1.358
Extremo B	0.419	-----**	0.226	-----**	0.166	-----**

%CV: % coeficiente de variación; \*\* no se pudo calcular debido a que la variación de las mediciones fue menor que la precisión del instrumental utilizado.

Se puede observar que la dosis no es homogénea, al ser medida en distintas posiciones geométricas respecto de la lámpara, encontrándose la mayor potencia en

la parte central de la misma, aproximadamente el doble de la dosis medida en los extremos. También se ve que la variación del pulso en las repeticiones medidas presenta menos del 4 % de coeficiente de variación.

#### IV.1.3.2. Reducción de la contaminación inicial de patulina en soluciones modelos

Los resultados de las pruebas realizadas en solución buffer McIlvaine a pH 3,5 se pueden ver en las tablas IV.12 y 13. La dosis de luz pulsada en los distintos tiempos fue calculada multiplicando la intensidad de cada pulso (tres pulsos por segundo) por el tiempo de exposición, la suposición que la lámpara mantiene la intensidad del pulso con el tiempo, se toma debido a la muy baja variación que se obtuvo cuando se midió la dosis de un pulso.

**Tabla IV.12.** Valores medios del porcentaje residual de la patulina (n=4). 500 µg/l

Tiempo (segundos)	Dosis luz pulsada (J/cm <sup>2</sup> )	Contaminación residual % Valor Medio	Desviación Estándar	%CV
2	2,388	102	8	8
5	5,970	92	3	4
8	9,552	80	5	6
11	13,134	71	8	11
14	16,716	56	15	27
17	20,298	41	18	44
20	23,880	30	6	22
30	35,820	15	5	39

%CV: % coeficiente de variación

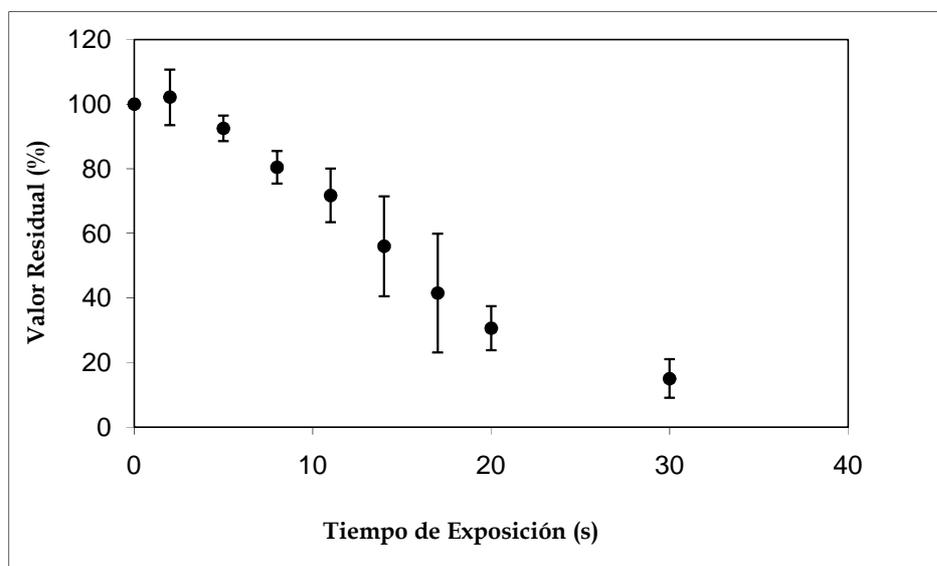
**Tabla IV.13.** Valores medios del porcentaje residual de la patulina (n=4) 100 µg/l

Tiempo (segundos)	Dosis luz pulsada (J/cm <sup>2</sup> )	Contaminación residual % Valor Medio	Desviación Estándar	%CV
2	2,388	87	18	20
8	9,552	83	13	15
11	13,134	75	14	19
14	16,716	69	10	15
17	20,298	50	11	22
20	23,880	35	4	12
25	29,850	18	8	48
30	35,820	6	0.5	8
35	41,790	7	0.6	9

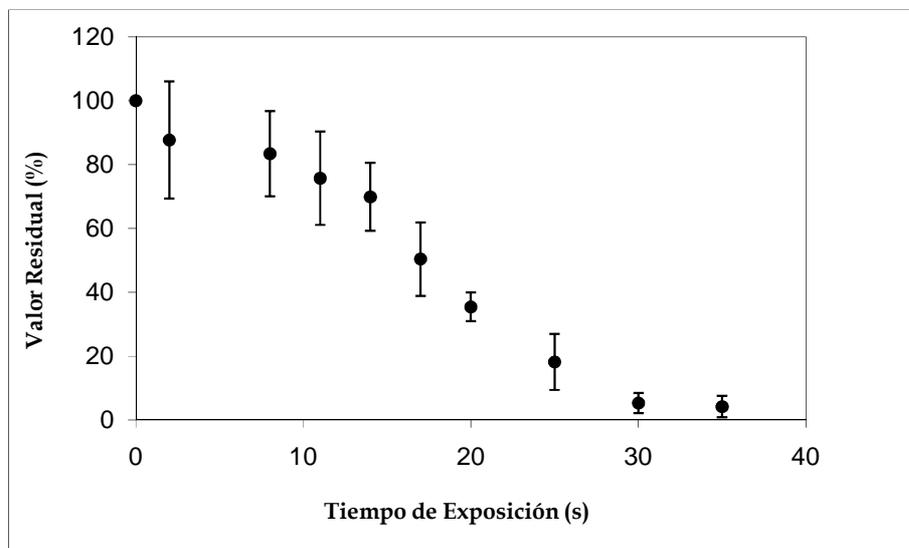
%CV: % coeficiente de variación

En los gráficos IV.2 y IV.3 se puede observar la relación entre la disminución de la concentración de patulina con el tiempo de exposición a los pulsos luz.

**Gráfico IV.2.** Tratamiento con luz pulsada, 500 µg/l, valores medios (n=4)

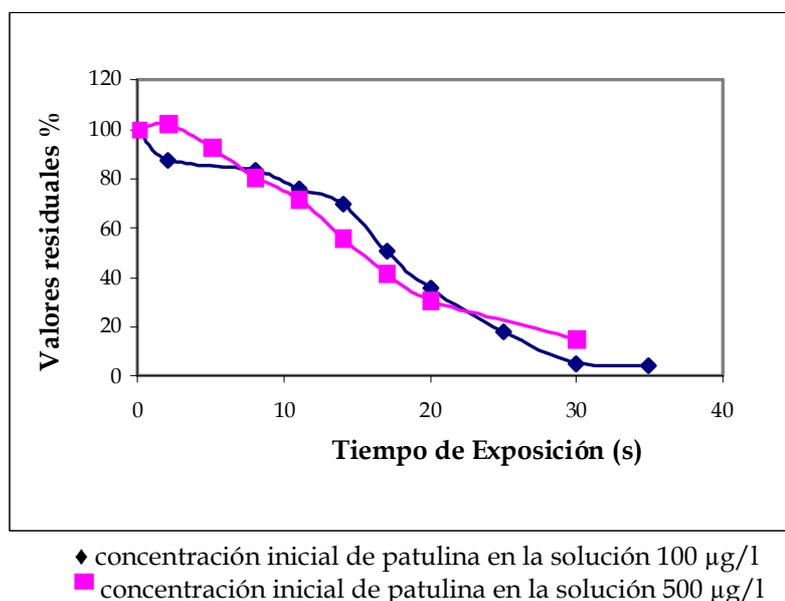


**Gráfico IV.3.** Tratamiento con luz pulsada, 100 µg/l, valores medios (n=4)



Estas curvas de valor residual porcentual de patulina respecto del tiempo cero de tratamiento, corresponden a los valores medios de los cuadruplicados realizados. En el Gráfico siguiente (IV.4) se superpusieron las curvas de degradación de patulina para las dos concentraciones estudiadas.

**Gráfico IV.4.** Superposición de las curvas de degradación de patulina



Se puede observar que las curvas tienen un comportamiento en solución similar, dando a suponer que la cinética de degradación, al ser irradiada con luz pulsada, no depende de la concentración inicial de patulina.

#### **IV.1.3.3. Reducción de la contaminación de patulina en puré de manzana contaminado naturalmente**

Luego de comprobarse la eficacia de la utilización de luz pulsada para decontaminar una solución con patulina, se pasó a probar la utilización de esta técnica en productos naturalmente contaminados.

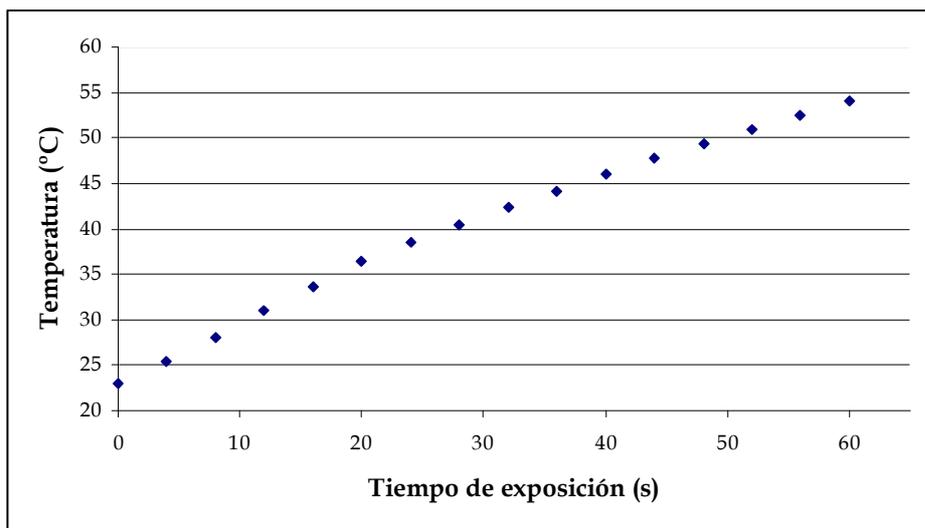
Para esto se analizaron 10 muestras recolectadas en 2009 y 2010 del producto que mayor incidencia y contaminación por patulina cuando se estudió la ocurrencia natural de esta micotoxina, o sea en puré de manzana.

Sólo se encontró una muestra contaminada en el período que se realizó la colecta de muestras. Es de destacar entonces que en estos años la población se encontraba menos expuesta a patulina que durante los años donde se realizó el estudio de ocurrencia (2006-2007). La prueba se hizo entonces en un puré de manzana cuya contaminación fue de 29  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .

Se irradió este producto 10, 20, 60, 100 y 150 segundos, analizando la contaminación residual a cada dosis. La contaminación se redujo un 49% con 10 segundos de exposición a la luz pulsada (14  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , dosis 11.940 J/cm<sup>2</sup>). Para el resto de los tiempos probados no se detectó contaminación por la metodología analítica utilizada en la medición de patulina.

En el Gráfico IV.5 se puede observar la evolución de la temperatura con la irradiación en puré.

**Gráfico IV.5.** Evolución de la temperatura con el tiempo de exposición en puré de manzana



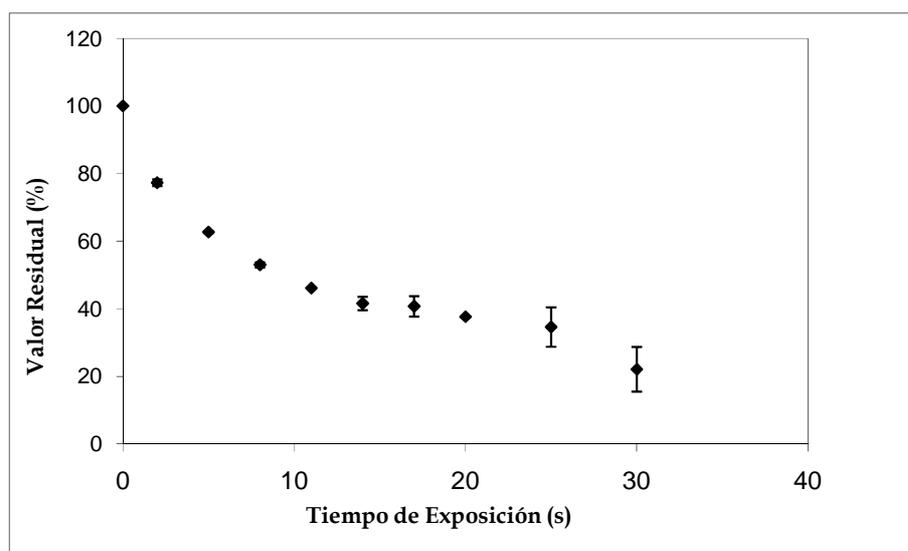
Durante los diez segundos de tratamiento, período en el cual la patulina se redujo aproximadamente en un 50%, la temperatura del puré de manzana se elevó de 23 °C a 27 °C, por lo tanto se puede descartar una degradación térmica significativa de esta micotoxina.

#### **IV.1.3.4. Reducción de la contaminación de patulina en jugo de manzana clarificado**

Al no encontrarse más muestras contaminadas, entonces se decidió realizar pruebas de irradiación sobre un jugo de manzana clarificado, al cual se le agregó patulina, para obtener una concentración de 129 µg/l de la toxina. Se irradiaron las

muestras en los tiempos: 2, 5, 8, 11, 14, 17, 20, 25 y 30 segundos obteniendo la curva de degradación de patulina que se muestra en el Gráfico IV.6.

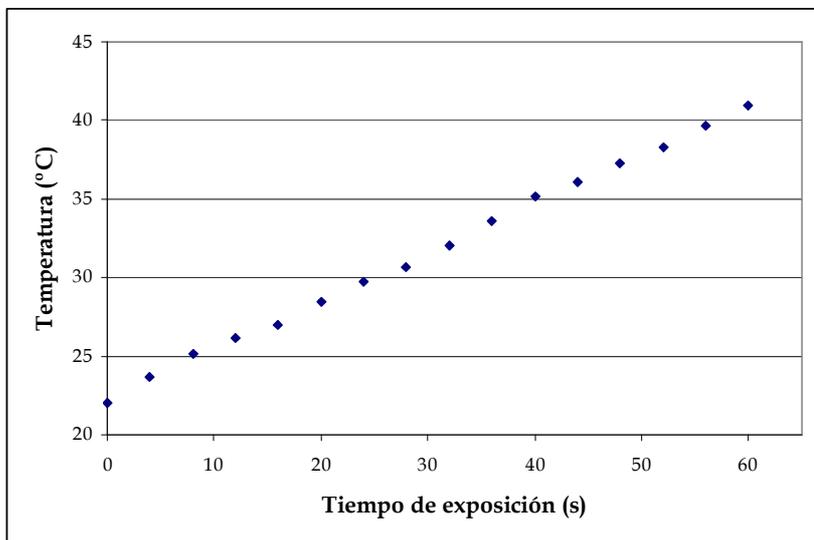
**Gráfico IV.6.** Reducción de patulina en jugo adicionado en una concentración de 129  $\mu\text{g}/\text{l}$



Se puede ver que la curva de degradación en el jugo presenta diferencias respecto a las obtenidas en las soluciones modelo. No se observa un tiempo lag en el jugo en los tiempos cortos de irradiación y, a su vez, presenta una pendiente más pronunciada al principio del tratamiento llegando a un valor residual de contaminación de un 40% en el jugo en aproximadamente 10 segundos. Se observó un tiempo de tratamiento de casi el doble, para llegar al mismo nivel de reducción en las pruebas con la solución modelo. Luego de este tiempo el valor residual se redujo más lentamente.

En el Gráfico IV.7 se puede ver la evolución de la temperatura a medida que aumenta la exposición del jugo de manzana a los pulsos de luz.

**Gráfico IV.7.** Evolución de la temperatura con el tiempo de exposición en jugo clarificado de manzana



Tal como ocurre en el puré, la evolución de la temperatura hace presumir que la degradación de patulina no se produce por degradación térmica, como ya fuera mencionado en la revisión bibliográfica (I.1.6. Procesos y su estabilidad frente a ellos) sobre el efecto de la temperatura sobre patulina. Se puede deducir que durante los 30 segundos de tratamiento donde la temperatura varía de 22°C hasta 31°C, la reducción por efecto de la temperatura es despreciable.

#### **IV.1.4. Discusión**

En el marco de esta tesis doctoral, se desarrolló una metodología analítica para la determinación de patulina, en productos sólidos y semisólidos de manzana y pera. Dicho método se encuentra dentro de los parámetros planteados en la reglamentación de la UE (2006) para metodologías analíticas donde se determinan

micotoxinas en alimentos. Se obtuvieron LOD y LOQ que hacen a esta técnica óptima para el análisis de ocurrencia de patulina en productos destinados al consumo de infantes, donde la legislación impone límites muy estrictos.

Se realizó el primer relevamiento en el país, estudiando la ocurrencia natural de patulina en productos sólidos y semisólidos comercializados en Argentina. Se obtuvo una baja incidencia de muestras positivas, pero las muestras donde la contaminación por patulina fue detectada y cuantificada presentaron, en su mayoría, concentraciones que exceden los límites impuestos en las distintas reglamentaciones, respecto a la concentración máxima permitida.

De todos los productos analizados, el puré de manzana presentó la mayor incidencia y los valores más altos de contaminación por esta micotoxina, esto se puede deber a que este producto de manzana presenta el menor procesamiento de todos los productos analizados. El puré en su preparación básicamente lleva una limpieza de la fruta, pelado y cocción, dicho paso no dura más de 20 minutos. Mientras que la cocción para la fabricación de mermelada se realiza hasta que la fruta se convierta en pulpa (precocción), luego de esto se agrega el azúcar y se realiza un segundo paso de cocción, este segundo proceso, conlleva el agregado de pectinas, ácido cítrico, el resto de azúcar y conservantes (benzoato de sodio y/o sorbato de potasio, solos o en conjunto). Esta última cocción se realiza hasta llegar a la consistencia deseada, la cual se determina por la cantidad de sólidos solubles por lectura (°Brix) a 20°C: mínimo 64%, máximo 68%. Todo esto implica que durante la elaboración de mermelada, el tiempo de procesamiento de la fruta es superior al empleado en la elaboración de puré.

Como paso posterior se probó la utilización de luz pulsada en un tratamiento de descontaminación en puré de manzana. Estas pruebas en dicho producto se deben no sólo a que éste presentó el mayor grado de contaminación, sino que el puré de manzana es el componente principal de alimentos destinados al consumo de niños que, debido a su fisiología, dieta restrictiva y el gran consumo relativo respecto de su peso corporal, se transforma en la población más vulnerable al consumo de patulina por ingesta de puré de manzana.

Se observó la degradación de la patulina al ser irradiada con la luz emitida por la lámpara de xenón, en soluciones modelo, en puré y en jugo de manzana clarificado.

En el puré estudiado, a los 10 segundos de tratamiento, la contaminación inicial de patulina se redujo a la mitad (49%). La degradación de patulina, en el caso del jugo de manzana, se produjo inicialmente más rápidamente que en la solución modelo. En las soluciones modelo la velocidad de degradación no fue dependiente de la concentración inicial de patulina.

Tal como se expuso en la introducción, diversos autores (Jackson y Dombrink-Kurtzman, 2006; Drusch y col., 2007; Kawashima y col., 2002; Scott y Somers, 1968; Stinson y col., 1978) concluyen que la patulina tiene cierta resistencia a la temperatura cuando se encuentra en un medio ácido. En todas las experiencias de tratamiento con luz pulsada, la patulina se encuentra en un medio con pH ácido, y el aumento de temperatura en ningún caso superó dentro de los tiempos probados los 35 °C, tal como se mencionó anteriormente es de suponer que este aumento no influye en la reducción de la contaminación de la micotoxina estudiada.

McKenzie y col. (1997) mostraron que una concentración de 10% p/p de ozono, luego de 15 segundos, elimina por completo la patulina en una solución que contenía 32  $\mu\text{M}$  de ésta. El manual del equipo informa que la cantidad de ozono generada por la descarga de la lámpara es superior a 0,08 ppm (una concentración muy pequeña comparada con la del experimento de McKenzie y col., 1997) pero, como se hizo notar en la descripción, el equipo cuenta con un ventilador que remueve el ozono que pueda generarse, por lo tanto, habría que evaluar la concentración de ozono generada y la capacidad del ventilador de remover el mismo. O sea, si quedara luego de la ventilación ozono residual, éste podría intervenir en la degradación de patulina. En estudios posteriores, cuando se cuente con un equipo para la medición en aire del ozono, se podría evaluar si el mismo interviene en el proceso de descontaminación de esta micotoxina cuando se aplica un tratamiento de luz pulsada.

También queda para futuros estudios el análisis de si este proceso de degradación no conlleva la formación de nuevos productos tóxicos, como así también la posible pérdida nutricional y características organolépticas del producto tratado.

## **IV.2. Fumonisinias**

### **IV.2.1. Metodología analítica**

#### **IV.2.1.1. Fumonisinias libres**

##### **IV.2.1.1.1 Fumonisinias**

Para el análisis de FB<sub>1</sub>, FB<sub>2</sub> y FB<sub>3</sub>, en las distintas matrices en estudio (maíz, fracciones de la molienda húmeda y chizitos), se procedió a ajustar el método AOAC N° 995.15 (2005) que es utilizado para harina de maíz.

Dicha metodología, extrae las fumonisinias a partir del maíz molido, con 25 ml de una mezcla de MeOH/H<sub>2</sub>O (75/25, v/v), utilizando una licuadora para la agitación. Con el fin de eliminar posibles interferencias presentes en el extracto, se utilizan columnas de extracción en fase sólida (SPE) de intercambio aniónico (SAX).

Para el análisis en las demás matrices, se tuvo que ajustar dicha metodología, para ello se dividieron las fracciones obtenidas a partir de la molienda húmeda de maíz en dos, esta separación se realizó en base a la cantidad de agua presente en cada matriz.

La fracciones con mayor cantidad de agua, que fueron las aguas de maceración y la suspensión de almidón, con el fin de mantener la relación solvente orgánico/agua, se agregó solamente metanol, utilizando el agua que contenía la fracción para mantener dicha relación. Se tomaron 50 gramos de la matriz y se agregaron 75 ml de MeOH.

Para las fracciones sólidas obtenidas a partir de la molienda húmeda, se realizó la extracción tal como está descrito en el método AOAC nombrado.

Las columnas de extracción en fase sólida utilizadas tienen un pH óptimo de trabajo y un valor distinto de este valor de pH, provoca una reducción en la recuperación de los analitos de interés. En esta parte del trabajo de investigación, se utilizaron las columnas amino cuaternaria Bakerbond (marca J.T. Baker). Se realizaron pruebas de pH, para cada una de las fracciones obtenidas a partir de la molienda húmeda de maíz, en la tabla 2.1, a modo de ejemplo se puede ver como varia la recuperación de FB<sub>1</sub> y FB<sub>2</sub> respecto al pH con el que se acondicionó la solución de extracción, previo al pasaje por la columna de limpieza para gluten meal, aguas de maceración, fibra húmeda, germen, fibra seca, maíz y gluten feed.

**Tabla IV.14.** Ajuste del pH del extracto para distintas matrices

Fracción	pH	FB1 µg/kg	FB2 µg/kg
Gluten meal	5,0	1834	1842
	5,5	1940	3508
	<b>5,8</b>	<b>2256</b>	<b>3760</b>
	6,0	2078	3706
	6,5	1596	2896
Aguas de maceración	5,0	127	ND
	5,5	488	ND
	5,8	848	178
	6,0	988	214
	<b>6,5</b>	<b>1508</b>	<b>258</b>
Fibra húmeda	5,0	348	ND
	5,5	1542	380
	<b>5,8</b>	<b>1744</b>	<b>548</b>
	6,0	1676	556
	6,5	1715	522
Germen	5,0	ND	ND
	<b>5,5</b>	<b>175,8</b>	ND
	5,8	102,6	ND
	6,0	90	ND
	6,5	95,02	ND

Fracción	pH	FB1 $\mu\text{g}/\text{kg}$	FB2 $\mu\text{g}/\text{kg}$
Fibra seca	5,0	145,2	ND
	5,5	318	144
	5,8	564	178,3
	6,0	628,6	189,4
	<b>6,5</b>	<b>1483,2</b>	<b>331,8</b>
Maíz	5,0	150	ND
	5,5	1890	712
	<b>5,8</b>	<b>3564</b>	<b>1352</b>
	6,0	3228	1322
	6,5	3068	1258
Gluten Feed	5,0	896	1328
	<b>5,5</b>	<b>920</b>	<b>1544</b>
	5,8	856	1478
	6,0	890	1454
	6,5	856	1418

Por ello cada una de las fracciones, se ajustó en un valor de pH distinto, maíz, gluten meal y fibra húmeda a 5,8; aguas de maceración y fibra seca a 6,5 y germen y gluten feed a 5,5.

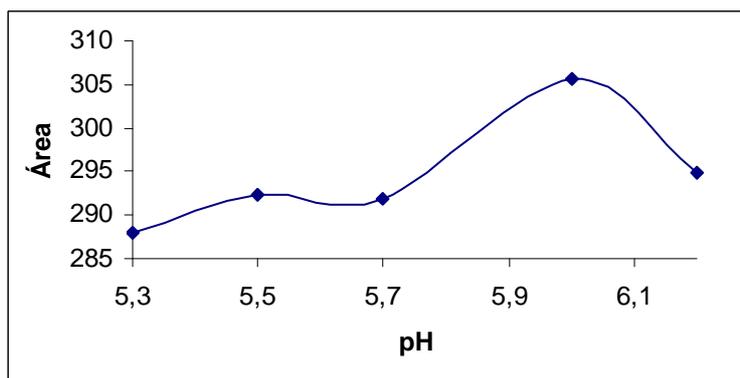
Una vez pasada la mezcla de extracción por la columna de limpieza SPE, las fumonisinas son eluidas de la columna con 10 ml de una mezcla de MeOH/AcOH (99/1, v/v), este solvente de carácter ácido provoca un cambio de pH, lo cual hace que las toxinas unidas a la fase estacionaria se liberen.

El extracto limpio, es secado a  $55 \pm 1$  °C bajo corriente de nitrógeno hasta sequedad, y luego es resuspendido en 500  $\mu\text{l}$  de ACN/H<sub>2</sub>O (50/50, v/v) para su análisis por HPLC.

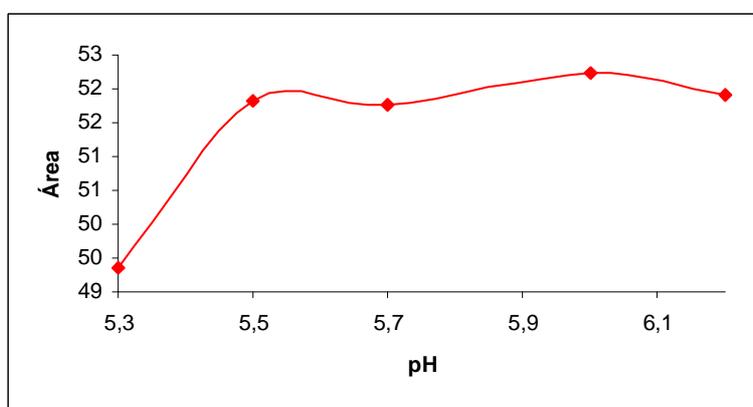
Durante el estudio del proceso de extrusión para la producción de chizitos, y para determinar cómo este proceso afecta la contaminación por fumonisinas, se utilizaron columnas amino cuaternario marca UCT. Se ajustó nuevamente el pH de las soluciones para trabajar con estas nuevas columnas, en este caso tanto para el

maíz como para los chizitos, el pH adecuado fue de 6,0, según se puede ver en los gráficos IV.8a, IV.8b y IV.8c.

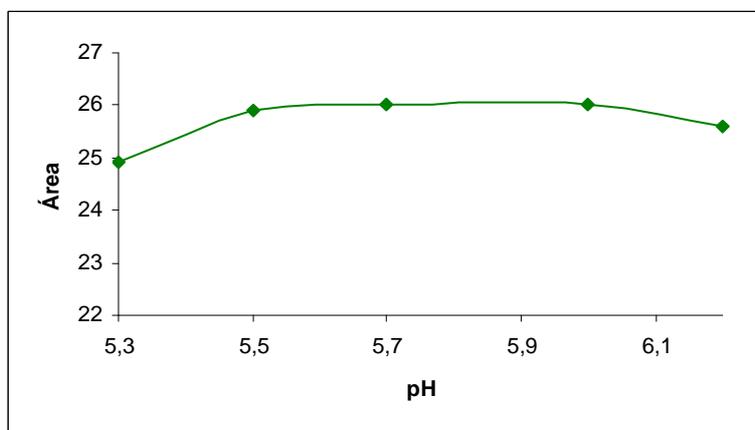
**Gráfico IV.8a.** Efecto del pH en la extracción de FB<sub>1</sub>



**Gráfico IV.8b.** Efecto del pH en la extracción de FB<sub>2</sub>



**Gráfico IV.8c.** Efecto del pH en la extracción de FB<sub>3</sub>



Adaptado de Federico, 2009. Tesis de maestría

En el caso de los chizitos, se extrajeron las fumonisinas de este producto con una mezcla de solventes MeOH/ACN/H<sub>2</sub>O (25/25/50, v/v/v) realizando dos extracciones consecutivas. La puesta a punto del pH y de los solventes de extracción, se realizó en el trabajo de maestría de Federico (2009).

#### **IV.2.1.1.2 Fumonisinas totalmente hidrolizadas**

Para el análisis de las fumonisinas hidrolizadas (HFBx), fue necesario resolver los puntos críticos de las metodologías a desarrollar. Estos puntos críticos fueron:

- Columna de extracción en fase sólida (SPE) (determinar que columna era la más adecuada y encontrar las condiciones óptimas para esa columna).
- Solventes de extracción y ajuste de pH de los mismos.

Las columnas probadas para la limpieza del extracto fueron, Chromabond C18, 3ml/500mg Macherey-Nagel y OASIS® HLB, 3cc/60 mg Waters.

Las primeras pruebas, se hicieron pensando en la extracción de las fumonisinas hidrolizadas libres en el mismo paso en que se realiza la determinación de FBx, por esta razón se adicionaron estándares de HFB<sub>1</sub>, HFB<sub>2</sub> y HFB<sub>3</sub> a una mezcla ternaria de solventes MeOH/ACN/H<sub>2</sub>O (25/25/50, v/v/v), ya que esta mezcla es la que se utiliza para la extracción de FBx en chizitos.

En la tabla IV.15, se muestran los resultados de recuperación para las dos columnas probadas, los valores de recuperación se calculan comparando las áreas del analito en cada mezcla de solventes, contra una dilución de una concentración similar al de la solución con que se adicionó la matriz en estudio.

Para este estudio, se analizó la concentración de cada una de las porciones obtenidas en todo el proceso de limpieza, carga (pasaje del solvente con el analito por la columna SPE), lavados y elución. Se puede observar, que en estas condiciones la columna OASIS® HLB no retiene los analitos en cuestión y la poca cantidad que es retenida por la columna eluye en los pasos de lavado.

En cuanto a la columna Chromabond C18, se puede observar, que se necesitan aproximadamente 8 ml de solvente de elución para extraer por completo las toxinas de la columna de limpieza.

**Tabla IV.15.** Recuperación de los hidrolizados de fumonisina en las SPE probadas.

		Recuperación %		
		HFB <sub>1</sub>	HFB <sub>2</sub>	HFB <sub>3</sub>
OASIS® HLB, 3cc/60 mg Waters				
Carga	5 ml de extracto de MeOH/ACN/H <sub>2</sub> O (25/25/50, v/v/v)	93,5	82,0	55,0
Lavado	2 ml MeOH/H <sub>2</sub> O (5/95, v/v)	4,5	5,2	4,5
	2 ml MeOH/H <sub>2</sub> O (20/80, v/v)	3,6	14,7	19,0
	2 ml MeOH/H <sub>2</sub> O (50/50, v/v)	0,0	2,5	13,2
	2 ml MeOH/H <sub>2</sub> O (67/33, v/v)	0,0	0,0	2,0
Elución	1 ml MeOH/H <sub>2</sub> O (75/25, v/v)	0,0	0,0	0,0
	2 ml MeOH/AcOH 8% (75/25, v/v)	0,0	0,0	21,3
Total recuperado		101,6	104,4	115,0
Chromabond C18, 3ml/500mg Macherey-Nagel				
Carga	5 ml de extracto de MeOH/ACN/H <sub>2</sub> O (25/25/50, v/v/v)	0,0	0,0	0,0
Lavado	2 ml H <sub>2</sub> O	0,0	0,0	0,0
	2 ml MeOH/H <sub>2</sub> O (5/95, v/v)	0,0	0,0	0,0
	2 ml MeOH/H <sub>2</sub> O (25/75, v/v)	0,0	0,0	0,0
Elución	2 ml MeOH	18,0	2,3	44,8
	2 ml MeOH	25,2	0,0	0,0
	2 ml MeOH	26,3	17,0	21,3
	1,5 ml MeOH/AcOH 8% (75/25, v/v)	24,8	75,8	56,1
Total recuperado		94,3	95,1	122,2

La segunda prueba con las columna OASIS® HLB, basada en la metodología utilizada por la Dra. Motta en su tesis doctoral (2005), luego de la hidrólisis en medio alcalino fuerte, se extraen las HFB<sub>x</sub> con MeOH/EDTA 0,01M (30/70, v/v). Autores como Hartl y Humpf (1999), ajustan el pH a 3,5 la solución de extracción antes de cargarla en la SPE.

Se adicionó HFB<sub>1</sub> a una solución de MeOH/EDTA 0,01M (30/70, v/v) y se hicieron pruebas según los esquemas de Hartl y Humpf (1999), Motta (2005) y Pagliuca y col (2005).

En la tabla IV.16, se muestran los resultados de aplicar los esquemas de los autores citados.

**Tabla IV.16.** Recuperación de los hidrolizados de fumonisina en las SPE OASIS® HLB.

			Recuperación %				
			HFB <sub>1</sub>	HFB <sub>2</sub>	HFB <sub>3</sub>		
Método 1	lav 1	MeOH/H <sub>2</sub> O (5/95, v/v) 1 ml	ND	ND	ND	pH 3	
	lav 2	MeOH/H <sub>2</sub> O/AcOH (5/94/1, v/v/v) 1 ml	ND	ND	ND		
	Eluc 1	MeOH 2 ml	88,13	88,42	93,74		
		Eluc 2	MeOH 2 ml	ND	ND	ND	pH5,0
		Eluc 3	MeOH 2 ml	ND	ND	ND	
		lav 1	MeOH/H <sub>2</sub> O (5/95, v/v) 1 ml	ND	ND	ND	
		lav 2	MeOH/H <sub>2</sub> O/AcOH (5/94/1, v/v/v) 1 ml	ND	ND	ND	
		Eluc 1	MeOH 2 ml	107,77	87,79	113,68	
		Eluc 2	MeOH 2 ml	ND	ND	ND	
	Eluc 3	MeOH 2 ml	ND	ND	ND		
Método 2	lav 1	MeOH/H <sub>2</sub> O (25/75, v/v) 2 ml	ND	ND	ND	pH 3	
	lav 2	MeOH/H <sub>2</sub> O (1/1, v/v) 1 ml	102,79	ND	ND		
	Eluc 1	MeOH/AcOH (95/5, v/v) 2 ml	8,75	71,37	107,05		
		Eluc 2	MeOH/AcOH (95/5, v/v) 2 ml	ND	ND	ND	pH5,0
		Eluc 3	MeOH/AcOH (95/5, v/v) 2 ml	ND	ND	ND	
		lav 1	MeOH/H <sub>2</sub> O (25/75, v/v) 2 ml	ND	ND	ND	
		lav 2	MeOH/H <sub>2</sub> O (1/1, v/v) 1 ml	42,06	ND	ND	
		Eluc 1	MeOH/AcOH (95/5, v/v) 2 ml	60,47	35,58	103,64	
		Eluc 2	MeOH/AcOH (95/5, v/v) 2 ml	ND	ND	ND	
	Eluc 3	MeOH/AcOH (95/5, v/v) 2 ml	ND	ND	ND		
Método 3	lav 1	MeOH/H <sub>2</sub> O (20/80, v/v) 3 ml	2,73	ND	ND	pH 3	
	lav 2	MeOH/H <sub>2</sub> O (50/50, v/v) 3 ml	107,33	ND	85,34		
	lav 3	MeOH/H <sub>2</sub> O (67/33, v/v) 3 ml	ND	35,32	12,84		
	Eluc 1	MeOH/H <sub>2</sub> O (75/25, v/v) 1 ml + MeOH/H <sub>2</sub> O (8% AcOH) (75/2, v/v) 2 ml	3,49	ND	ND		
	Eluc 2	MeOH/H <sub>2</sub> O (8% AcOH) (75/2, v/v) 2 ml	3,23	ND	ND		
	Eluc 3	MeOH/H <sub>2</sub> O (8% AcOH) (75/2, v/v) 2 ml	ND	ND	ND		
		lav 1	MeOH/H <sub>2</sub> O (20/80, v/v) 3 ml	ND	ND	ND	pH5,0
		lav 2	MeOH/H <sub>2</sub> O (50/50, v/v) 3 ml	86,47	ND	ND	
		lav 3	MeOH/H <sub>2</sub> O (67/33, v/v) 3 ml	16,90	26,53	107,17	
		Eluc 1	MeOH/H <sub>2</sub> O (75/25, v/v) 1 ml + MeOH/H <sub>2</sub> O (8% AcOH) (75/2, v/v) 2 ml	ND	ND	ND	
		Eluc 2	MeOH/H <sub>2</sub> O (8% AcOH) (75/2, v/v) 2 ml	ND	ND	ND	
		Eluc 3	MeOH/H <sub>2</sub> O (8% AcOH) (75/2, v/v) 2 ml	ND	ND	ND	

Método 1. Pagliuca y col (2005). Método 2. Hartl y Humpf (1999). Método 3. Motta (2005)  
Lav: Lavado; Eluc: Elución

Se observa que no es necesario un ajuste en el valor del pH, ya que con el valor natural de pH (5,0) de la mezcla MeOH/EDTA 0.01M (30/70, v/v), se obtienen mejores recuperaciones que llevando el mismo a un valor de pH=3,0.

De los métodos ensayados, el diseñado por Pagliuca y col. (2005) presenta los mayores rendimientos, no se pierden toxinas en las etapas de lavado y en la primera extracción se obtiene el total de los analitos cargados. Se puede concluir, luego del ensayo de estas tres metodologías, que una concentración de solvente orgánico superior al 25% en las etapas de lavado provoca una pérdida de recuperación de los hidrolizados de fumonisina, pues estos empiezan a eluir de la columna.

Con esta conclusión, se continuó con la idea inicial, realizar una sola extracción y de esta repartir el extracto, destinando una fracción para el análisis de FBx utilizando columnas SAX amino cuaternario y otra para el análisis de HFBx utilizando OASIS® HLB en el paso de limpieza.

La extracción en maíz y harina de maíz se realiza con 50 ml de MeOH/H<sub>2</sub>O (75/25, v/v). Se toman 10 ml para el estudio de HFBx de esta solución y se le agregan 20 ml de agua con el fin de diluir el solvente orgánico hasta un 25%, para permitir que los hidrolizados de fumonisinas interaccionen con el relleno y queden retenidos en la columna de limpieza. En el caso de los chizitos, la extracción se realiza con la mezcla MeOH/ACN/H<sub>2</sub>O (25/25/50, v/v/v), y a los 10 ml destinados al análisis de las fumonisinas hidrolizadas se le agregó 10 ml de agua, con el mismo fin mencionado anteriormente.

#### **IV.2.1.2. Fumonisinias unidas**

Para el análisis de las fumonisinias unidas, se analizaron las variables tiempo de hidrólisis, solventes de extracción, tiempo de extracción y de sonicado de la mezcla.

A continuación se muestra el orden de los pasos realizados.

- Extracción de los estándares adicionados de la solución chizito-KOH.  
Prueba con una mezcla de solventes basados en la tesis de la Dra Motta.  
Extracción con solventes orgánicos inmiscibles con el agua.  
Ajuste del pH y viscosidad de la mezcla chizito-KOH 4N.
- Optimización del tiempo de agitación y de sonicado en la extracción, con el mejor solvente elegido según los resultados obtenidos en el punto anterior.
- Ajuste del tiempo de hidrólisis.

##### **IV.2.1.2.1. Fumonisinias unidas en chizitos**

Para todas las pruebas de ajuste de la metodología, los valores de recuperación obtenidos en cada paso se calcularon por adición de los estándares correspondientes.

Se comenzó el desarrollo de la metodología, probando en principio con los chizitos un tiempo de hidrólisis de 24 hs a 60°C con KOH 4N y extracción con MeOH/EDTA 0.01M (30/70, v/v), basándonos para esto en lo realizado por la Dra. Motta en su tesis doctoral (2005). En estos primeros pasos solo se evaluó la recuperación de HFB<sub>1</sub>.

Al término de la hidrólisis, una fracción del hidrolizado se extrae con la mezcla de MeOH/EDTA 0.01M (30/70, v/v), en un agitador orbital a 340 r.p.m. durante 30 minutos.

La primera dificultad encontrada, fue la separación de la fase de extracción luego de la agitación. Se probaron distintas velocidades de centrifugación y se varió la relación hidrolizado/solvente de extracción (tabla IV.17). Con una centrifugación a 18000 r.p.m., se logró una separación óptima de las dos fases líquidas.

**Tabla IV.17. Variación de la relación hidrolizado/solvente de extracción.**

<b>Agitación 340 rpm 30 minutos, centrifugación 15 min a 18000 rpm</b>		
<b>Hidrolizado (ml)</b>	<b>MeOH/EDTA 0.01M (30/70, v/v) ml</b>	<b>% recuperación</b>
10	30	3,2
5	20	5,6

10 ml del extracto se pasan por la columna HLB

Se repitió la prueba utilizando acetato de etilo (AcEt) como solvente de extracción y se realizaron dos procesos distintos:

- a) extracción de 15 ml del hidrolizado con 15 ml de AcEt. Se tomaron 10 ml, y se secaron con N<sub>2</sub> a 37 °C. El extracto seco se disolvió en 10 de MeOH/EDTA 0.01M (30/70, v/v) y el mismo se limpió pasándolo por la columna HLB para su análisis por HPLC.
- b) extracción de 15 ml del hidrolizado con 15 ml de AcEt, se secaron 10 ml y se analizó por HPLC.

Se puede observar (Tabla IV.18) que si bien las recuperaciones son bajas (aproximadamente 10%), en ambas pruebas se obtienen valores similares, esto indica,

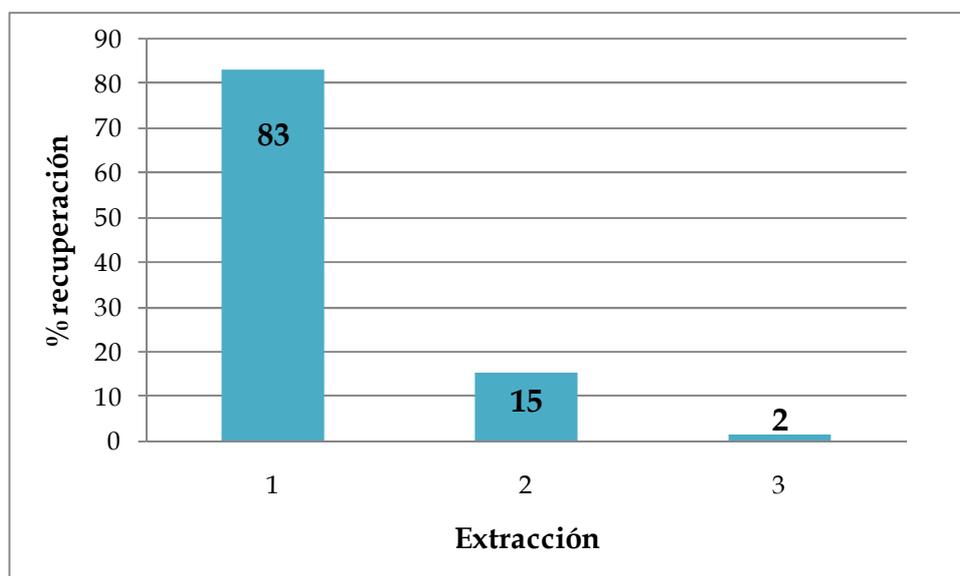
que la pérdida, no se debe a la utilización de las columnas HLB como paso de limpieza.

**Tabla IV.18. Extracción con Acetato de etilo.**

Método	Nº de extracción	% recuperación HFB <sub>1</sub>
a)	Primera	8,2
	Segunda	1,5
	Tercera	0,2
b)	Primera	8,2
	Segunda	1,1
	Tercera	0,2

El otro resultado obtenido de esta prueba, es que con la segunda extracción, se recupera un 15 % del total obtenido (gráfico IV.9).

**Gráfico IV.9. Recuperación de HFB<sub>1</sub> en extracciones sucesivas.**



Los porcentajes están expresados suponiendo un 100% en el total de las tres extracciones.

Además la extracción con AcEt, recupera un 40% más que la mezcla MeOH/EDTA 0.01M (30/70, v/v), la utilización de AcEt como solvente de extracción no necesita centrifugar a 18000 r.p.m. para poder obtener una buena separación de fases.

Dada la baja recuperación obtenida en las pruebas realizadas, se procedió a probar distintos solventes orgánicos con el fin de lograr recuperaciones mayores en el estudio de las HFBx. Para estas pruebas se homogeneizó chizitos molidos con KOH 4N en una relación 1:1 durante 10 minutos, al fin de este paso se separaron porciones de 15 ml y se agregó HFB<sub>1</sub> a cada una de las porciones, se agitaron y se procedió a la extracción con 15 ml de los siguientes solventes: AcEt, acetonitrilo, hexano y mezclas de hexano/AcEt, las extracciones se hicieron por duplicado (Tabla IV.19).

**Tabla IV.19.** Extracción con distintos solventes orgánicos

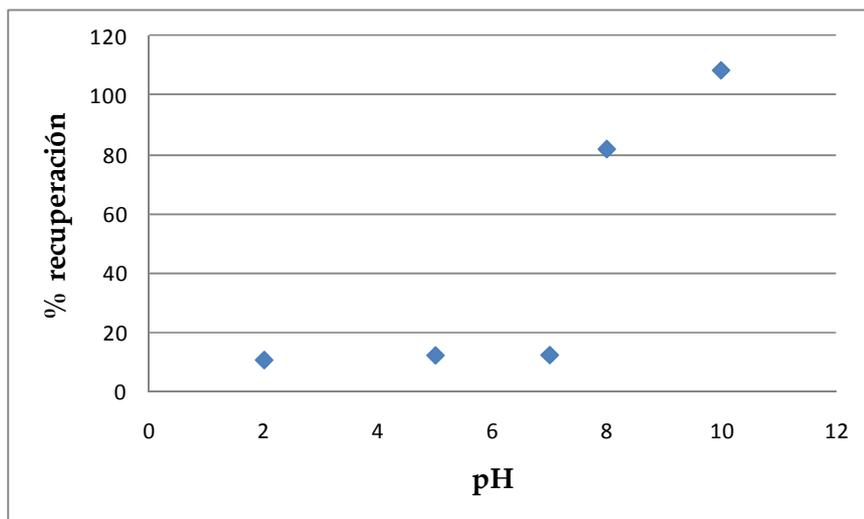
Solvente de extracción	%recuperación HFB <sub>1</sub>
Acetonitrilo	13,6
Hexano	ND
Acetato de Etilo	38,7
Hexano/ AcEt 1+1	21,6
Hexano/ AcEt 1+2	35,5
Hexano/ AcEt 2+1	10,6

ND: no detectado

Las recuperaciones de HFB<sub>1</sub>, utilizando estos sistemas de solventes para la extracción, eran aún bajas, por esta razón se probó si esto podía deberse al pH alcalino de la solución. Para esto se adicionó agua con HFB<sub>1</sub> y luego se ajustó el pH

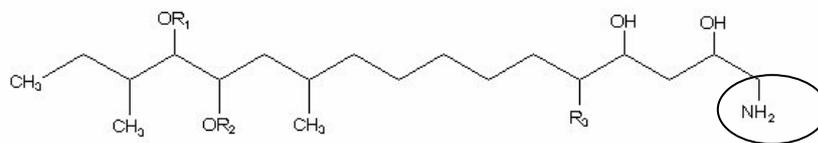
en el rango de 2 a 10, para luego proceder a la extracción con AcEt, en el Gráfico IV.10 se puede ver los resultados de este análisis.

**Gráfico IV.10. Ajuste del pH en la extracción**



O sea que a pH ácidos la recuperación era baja e iba aumentando a medida que el valor del mismo en la solución de la cual se extraen los analitos aumenta. Esto se puede deber al grupo amino terminal (Figura IV.5) que tiene en su estructura el HFB<sub>1</sub>, a pH ácido se encuentra en forma de amino cuaternario, lo cual confiere a toda la estructura un carácter hidrofílico y a medida que aumenta el pH este grupo en medio alcalino se encuentra como amina sin ninguna carga, probablemente el HFB<sub>1</sub> podría tener más afinidad por el solvente orgánico.

**Figura IV.5.** Estructura HFB<sub>1</sub>



R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>=H; R<sub>3</sub>= OH

Se procedió a determinar la recuperación, de una muestra de chizitos homogenizados con KOH 4N adicionado con HFB<sub>1</sub>. 20 ml de esta solución, se llevó a pH 10 agregando 12 ml de HCl 6N, esta nueva mezcla, se extrajo dos veces con 30 ml de AcEt. A la extracción en este caso, se le sumo un nuevo paso, después de la agitación, la solución fue sonicada por 10 minutos, de esta prueba se obtuvo una recuperación del 64,8 %.

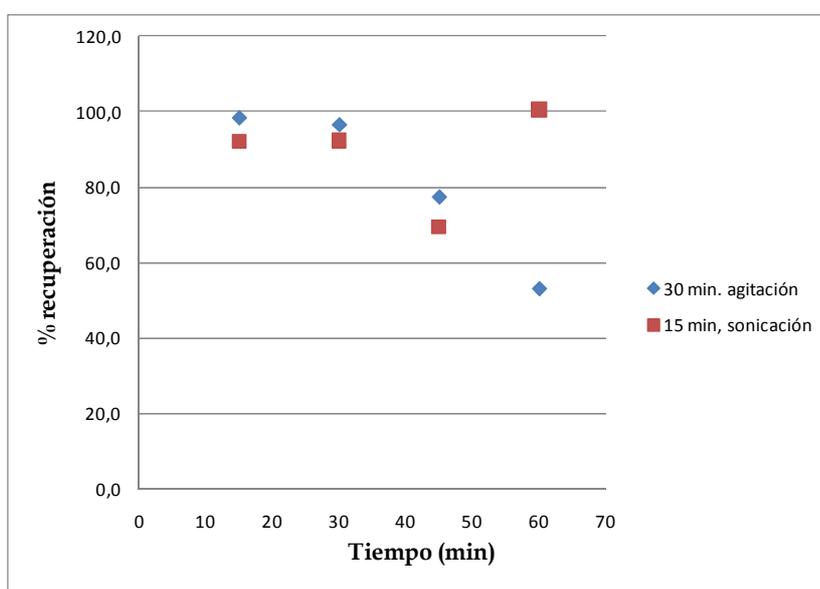
Con el fin de mejorar la recuperación, se hicieron pruebas de tiempo de agitación y minutos de sonicado. Esto se probó en las mismas condiciones descriptas en el párrafo anterior, homogenización de una masa de chizito con KOH, ajuste de pH con HCl 6N y en este caso el estándar de HFB<sub>1</sub> fue adicionado después del ajuste del pH, ya que se vio que este paso eleva muy bruscamente la temperatura de la solución, pudiendo esto provocar la destrucción de los analitos estudiados. Los resultados de esta prueba se pueden ver en la tabla IV.20.

**Tabla IV.20.** Ajuste del tiempo de agitación y sonicado durante la extracción.

t de sonicado (min)	t de agitación (min)	% recuperación
15	30	98,5
30	30	96,6
45	30	77,5
60	30	53,2
15	15	92,2
15	30	92,3
15	45	69,5
15	60	100,6

Se puede observar de la tabla que a medida que aumenta el tiempo de sonicado disminuye el valor de recuperación (Gráfico IV.11). Esto puede deberse a que el efecto de sonicar trae aparejado un calentamiento de la solución y este calentamiento puede ser la causa de la disminución en los valores de recuperación o que el proceso de sonicado destruya a la HFB<sub>1</sub>. A partir de este punto se decidió que 30 min de agitación y 15 min de sonicado, son suficientes para obtener recuperaciones mayores a 90%.

**Gráfico IV.11.** Recuperación según los tiempos de agitación y sonicado.

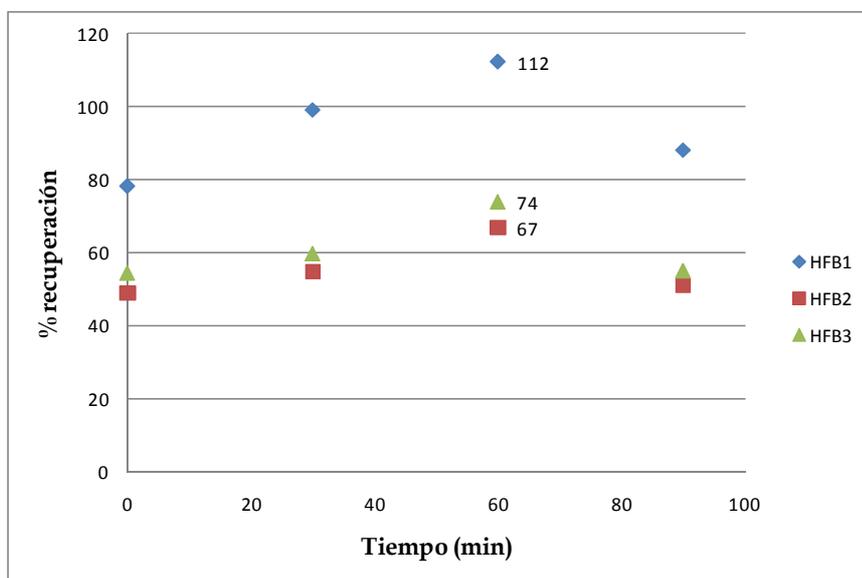


Como se mencionó anteriormente, se observó un violento incremento de la temperatura, durante el ajuste del pH del hidrolizado con HCl 6N previo a la extracción. La siguiente prueba, se realizó para comprobar, si la recuperación se incrementaba debido al ajuste de pH o por efecto de dilución del hidrolizado con un solvente acuoso, ya que la mezcla homogénea de chizito-KOH 4N presenta características viscosas, y estas propiedades pueden interferir en la recuperación. Para comprobar esto, a una fracción del homogenato chizito-KOH 4N, se le agregó el estándar de HFB<sub>1</sub> y luego se diluyó al medio con agua. De esta nueva solución se hizo la extracción, resultando en una recuperación de 107,2 %. Con esto comprobamos que el agregado de HCl 6N para ajuste del pH no mejoraba los valores de recuperación por un efecto de pH, sino por efecto de disminuir la viscosidad de la solución de hidrólisis. La adición de agua en vez de ácido concentrado, evita el brusco aumento de temperatura de la muestra, la cual podría conllevar a una destrucción de las micotoxinas.

Como último paso, quedaba por definir los tiempos óptimos de hidrólisis, para esto se hidrolizaron muestras con y sin adición de estándares, en este caso se adiciono el chizito con HFB<sub>1</sub>, HFB<sub>2</sub> y HFB<sub>3</sub>.

Los tiempos probados fueron desde 0 hasta 90 minutos en lapsos de 30, el t=0 se considera como el momento donde la muestra termina de homogeneizarse con el álcali. La misma se realizó en un baño de agua con agitación continua a 60 °C (Gráfico IV.12).

**Gráfico IV.12** Ajuste del tiempo de hidrolisis.



Se seleccionó el tiempo de 60 minutos para las hidrolisis con KOH 4 N ya que se obtenían las mayores concentraciones de las tres toxinas.

El análisis de los cromatogramas de esta prueba, no muestran diferencias en cuanto a los interferentes que puedan tener los analitos de interés, al utilizar columnas de limpieza o por extraer con AcEt, por lo tanto a partir de aquí solo se realizó la extracción con AcEt, evitando el gasto innecesario de las columnas de limpieza.

#### **IV.2.1.2.2. Fumonisinias unidas en maíz**

Una vez puesta a punto la metodología de extracción de las fumonisinas unidas en los chizitos, se paso a probar dicha técnica en harina de maíz.

Al intentar realizar la recuperación con los tiempos de agitación, sonicado, temperatura de hidrólisis y concentración del álcali, igual a lo realizado con los

chizitos molidos, se encontró con la dificultad de la gelatinización del almidón en el medio alcalino fuerte, lo cual formaba un gel que impedía la hidrólisis completa de la matriz.

Debido a este inconveniente, se pensó en hidrolizar el almidón, como paso previo a la hidrólisis alcalina necesaria para la extracción de fumonisinas.

La solución de amilasa, se preparaba en buffer fosfato pH 6,9. Se probaron distintas concentraciones de amilasa (0,70, 1,25 y 1,7 % p/v), tiempos y temperatura de hidrólisis (1,2 y 3 horas a 35°C y 24 hs a 30°C). Con todas estas pruebas, no se logro evitar la formación posterior del gel durante la hidrólisis alcalina. No se calcularon las recuperaciones, ya que se consideró, que la formación de dicho gel, no permitiría una recuperación eficiente de los hidrolizados de las distintas fumonisinas.

Por los resultados negativos de estas pruebas de hidrólisis enzimática del almidón, se decidió probar una etapa previa, donde se pre gelatiniza el almidón, antes de someterlo a la hidrólisis con amilasa.

La prueba realizada tuvo los siguientes pasos:

- Homogenización de la muestra con agua 10 minutos con el ultraturrax a 9500 r.p.m. La relación masa/agua fue de 1/5 p/v.
- Se calentó en baño de agua a 60°C durante una hora, con agitación continua.
- Se agregó 0,5 g de amilasa y calentó a 35°C durante una hora, con agitación continua.

- Se adiciona la solución de KOH 4N, tal que la relación masa/volumen quedara en 1/20 p/v. Se homogenizó 10 minutos en el ultraturrax a 9500 r.p.m.
- Se calentó en baño de agua a 60°C durante una hora, con agitación continua.

Luego de todos estos pasos, se procedió a la extracción con AcEt manteniendo la relación solvente acuoso/solvente orgánico 1/1 (v/v). La misma se realizó en las mismas condiciones de tiempo de agitación y sonicado, que el óptimo encontrado para el chizito (30 min de agitación y 15 min de sonicado).

Los resultados de esta prueba se muestran en la tabla IV.21.

**Tabla IV.21.** Recuperación de HFBx en maíz, pre gelatinizado e hidrolizando en almidón.

	Recuperación %		
	HFB <sub>1</sub>	HFB <sub>2</sub>	HFB <sub>3</sub>
<b>1era extracción</b>	48,6	67,3	69,5
<b>2da extracción</b>	13,2	ND	ND
<b>Total</b>	61,8	67,3	69,5

Con el fin de simplificar la metodología, se decidió probar si se podía omitir el paso de la hidrolisis enzimática, o sea comprobar si la pre gelatinización del almidón es suficiente para evitar la formación del gel, que impide la total hidrólisis de la harina de maíz en medio alcalino.

En este caso luego del paso de pre gelatinización, se colocó la mezcla maíz-agua en el ultraturrax, se comienza la agitación y el agregado del KOH 4N se realiza con el homogeneizador funcionando.

Las recuperaciones de esta prueba fueron HFB<sub>1</sub> 70 %, HFB<sub>2</sub> 81% y para HFB<sub>3</sub> 66%. Estos valores de recuperación son similares a los obtenidos incluyendo en la técnica el paso de hidrolisis enzimática del almidón. Debido a esto, se decidió eliminar este paso en las futuras determinaciones.

#### IV.2.1.3. Recuperación en las distintas matrices.

##### IV.2.1.3.1. Recuperación de fumonisinas libres.

Se midió la recuperación en todas las matrices estudiadas.

Para el caso de maíz durante el estudio de la molienda húmeda de maíz, con las columnas amino cuaternarias Bakerbond, se analizó la recuperación en una muestra FAPAS. El análisis se realizó por cuadruplicado (tabla IV.22) obteniendo un valor medio de recuperación de 81 % y 121 % para FB<sub>1</sub> y FB<sub>2</sub> respectivamente.

**Tabla IV.22.** Recuperación de FB<sub>1</sub> y FB<sub>2</sub> en una muestra FAPAS

Micotoxina	Repetición	Valor buscado (µg/kg)	Recuperación (µg/kg)	Recuperación %
FB <sub>1</sub>	1	650	505	77,7
	2		527	81,1
	3		469	72,2
	4		628	96,6
FB <sub>2</sub>	1	230	324	140,9
	2		322	140,0
	3		275	119,6
	4		197	85,7

En el estudio de la recuperación de las fumonisinas en las fracciones obtenidas a partir de la molienda húmeda de maíz, se adicionaron (espiquearon) todas las muestras por triplicado en dos niveles de contaminación (tabla IV.23).

Se puede observar, que salvo en el caso del almidón donde las recuperaciones obtenidas fueron menores al 20% para ambas toxinas en los niveles probados, el resto de las fracciones obtuvieron recuperaciones superiores al 60%. La baja recuperación obtenida en el almidón puede deberse a la unión de las fumonisinas con los grupos carbonilos que se encuentran en la estructura del almidón. Diversos autores resaltan la dificultad analítica que exhiben este tipo de matrices debido a estas uniones, lo cual provoca que la metodología normalmente utilizada para la extracción de fumonisinas tenga una baja recuperación de estas micotoxinas (Castello y col., 2001; De Girolamo y col., 2001; Meister y col., 2001; Piñeiro y col., 1999).

**Tabla IV.23.** Recuperación en las fracciones obtenidas de la molienda húmeda de maíz

Matriz	Micotoxina	Nivel $\mu\text{g}/\text{kg}$ .	Recuperación Media % (n=3)
Aguas de maceración	FB <sub>1</sub>	1200	70
		2400	72
	FB <sub>2</sub>	1300	86
		2700	86
Gluten Meal	FB <sub>1</sub>	548	65
		1004	70
	FB <sub>2</sub>	530	97
		1061	96
Gluten Feed	FB <sub>1</sub>	1800	96
		2700	113
	FB <sub>2</sub>	1230	116
		2250	130

Matriz	Micotoxina	Nivel $\mu\text{g}/\text{kg}$ .	Recuperación Media % (n=3)
Germen	FB <sub>1</sub>	1250	71
		2500	88
	FB <sub>2</sub>	1300	67
		2600	94
Almidón	FB <sub>1</sub>	1400	9
		2800	19
	FB <sub>2</sub>	1330	8
		2650	12

Con las columnas amino cuaternarias marca UCT, se realizó la prueba de eluir los analitos de la columna, pasando 1 ml extra de MeOH/AcOH (99/1, v/v). Esta prueba se realizó con el fin de aumentar la recuperación, los resultados se pueden ver en la tabla IV.24.

**Tabla IV.24.** Efecto del volumen de extracción en la recuperación

ml de extracción	Recuperación %		
	FB <sub>1</sub>	FB <sub>2</sub>	FB <sub>3</sub>
10	88,2	72,1	72,7
11	110,4	72,1	72,7

Adaptado de Federico, 2009. Tesis de maestría

Se puede observar en la tabla IV.24, el aumento significativo en los valores de recuperación para FB<sub>1</sub>, con el pasaje adicional del mililitro del solvente de extracción.

Las recuperaciones de las fumonisinas hidrolizadas libres en chizito y maíz se pueden observar en la tabla IV.25.

**Tabla IV.25.** Recuperación de fumonisinas hidrolizadas libres en maíz y chizitos

Matriz	Nivel de contaminación (µg/kg) <sup>a</sup>	Recuperación media % (n=3)		
		HFB <sub>1</sub>	HFB <sub>2</sub>	HFB <sub>3</sub>
Maíz	2400	57,5	80,9	63,2
	900	90,3	40,5	60,3
	450	81,2	39,5	68,2
Chizito	2400	86,1	117,4	136,9
	900	75,6	141,3	138,4
	450	87,3	139,5	124,9

<sup>a</sup> los niveles de contaminación expresados, corresponden a la sumatoria de las tres toxinas

Los resultados mostrados en la tabla IV.25, exhiben que los valores de recuperación obtenidos para HFB<sub>1</sub> y HFB<sub>3</sub> están dentro de los valores aceptables para una metodología analítica. En el caso de HFB<sub>2</sub>, es llamativa la baja recuperación obtenidas en maíz en los niveles 900 y 450 µg/kg, quedando la mejora de esta recuperación y/o una explicación posible de estos valores para futuras investigaciones.

#### **IV.2.1.3.2. Recuperación de fumonisinas unidas.**

Una vez puesto a punto el método de hidrólisis y extracción de las fumonisinas unidas, se procedió a cuantificar las recuperaciones obtenidas con dicha metodología. Para esto se adicionó con fumonisinas hidrolizadas las matrices a estudiar, harina de maíz y chizitos por triplicado en tres valores de contaminación (tabla IV.26).

**Tabla IV.26.** Recuperación de fumonisinas unidas en chizitos y harina de maíz.

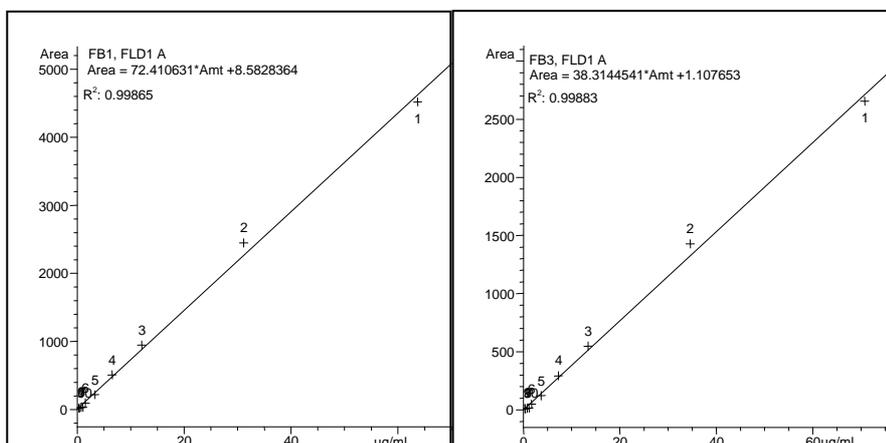
Nivel ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) <sup>a</sup>	Recuperación % Chizitos			Recuperación % Harina de maíz		
	HFB <sub>1</sub>	HFB <sub>2</sub>	HFB <sub>3</sub>	HFB <sub>1</sub>	HFB <sub>2</sub>	HFB <sub>3</sub>
3470	78,1	132,0	150,9	69,2	107,2	76,9
2188	60,2	113,7	126,3	94,3	135,4	77,9
1041	71,1	120,7	136,7	73,2	97,2	74,0

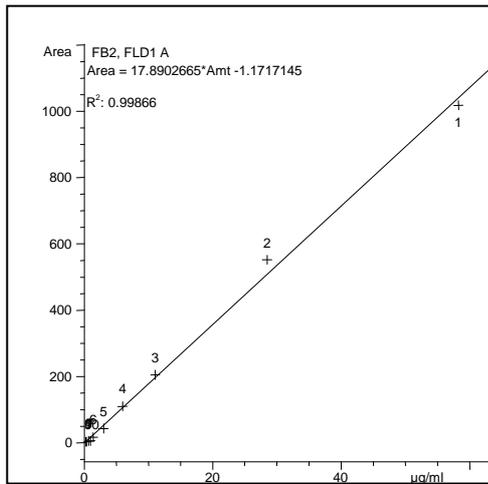
<sup>a</sup> los niveles de contaminación expresados, corresponden a la sumatoria de las tres toxinas

#### IV.2.1.4. Curvas de calibración y límites de detección y cuantificación.

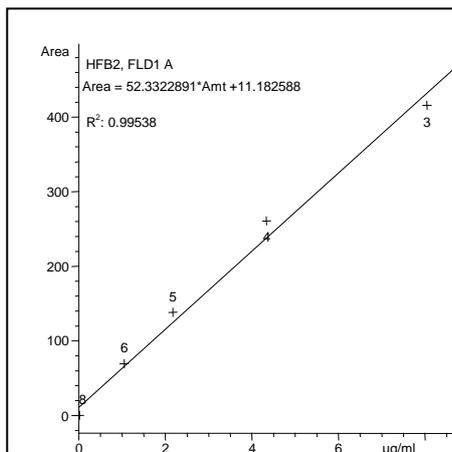
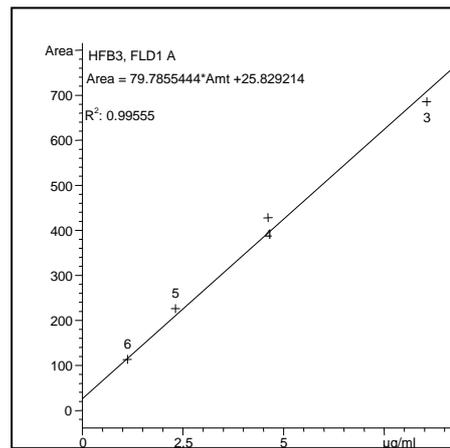
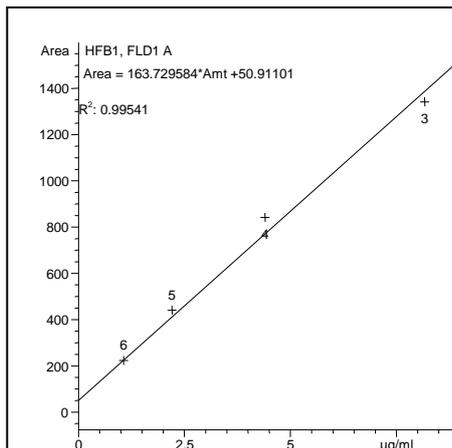
Los gráficos IV.13 y IV.14, muestran las curvas de calibración de FBx y HFBx

**Gráfico IV.13.** Curvas de calibración de FB<sub>1</sub>, FB<sub>2</sub> y FB<sub>3</sub>





**Gráfico IV.14.** Curvas de calibración de HFB<sub>1</sub>, HFB<sub>2</sub> y HFB<sub>3</sub>



Los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) calculados para FBx en el maíz y productos de la molienda húmeda de maíz fueron para LOD= FB<sub>1</sub> 10 µg/kg; FB<sub>2</sub> 6 µg/kg y para LOQ= FB<sub>1</sub> 18 µg/kg; FB<sub>2</sub> 30 µg/kg.

En el caso de los chizitos los LOD y LOQ fueron 4,4 y 7,3 µg/kg para FB<sub>1</sub>, 2,3 y 3,8 µg/kg para FB<sub>2</sub> y 1,7 y 2,9 µg/kg para FB<sub>3</sub>, respectivamente.

Los hidrolizados incluyen a las fumonisinas unidas, ya que el proceso de extracción en medio alcalino fuerte provoca la liberación de las micotoxinas unidas, pero también la pérdida de los grupos tricarbálicos de las FBx libres. Los límites de detección y cuantificación fueron para HFB<sub>1</sub> 0,6 y 0,9 µg/kg, para HFB<sub>2</sub> 11,8 y 19,6 µg/kg y para HFB<sub>3</sub> 7,2 y 11,9 µg/kg, respectivamente. Estos LOD y LOQ son para harina de maíz y los chizitos.

#### **IV.2.2. Ocurrencia natural - Distribución/Reducción en el proceso de molienda húmeda del maíz.**

Se determinaron las concentraciones de fumonisinas en 33 muestras de maíz provenientes de la campaña 1999 y los productos obtenidos de estas a partir de la molienda húmeda en escala planta piloto. En las tablas IV.27 y IV.28 se observan los estadísticos de la contaminación encontrada en el maíz y las fracciones.

**Tabla IV.27** Contaminación de maíz por fumonisinas.

	<b>FB<sub>1</sub> (µg/kg)</b>	<b>FB<sub>2</sub> (µg/kg)</b>	<b>FB<sub>3</sub> (µg/kg)</b>	<b>Totales (µg/kg)</b>
Media	4750	2294	547	7592
Mediana	2998	1330	327	4592
Mínimo	437	150	30	648
Máximo	12879	6742	1511	21133

**Tabla IV.28** Contaminación de las fracciones obtenidas de la molienda húmeda de maíz, escala planta piloto.

	Almidón (µg/kg)				Gluten (µg/kg)			
	FB <sub>1</sub>	FB <sub>2</sub>	FB <sub>3</sub>	Totales	FB <sub>1</sub>	FB <sub>2</sub>	FB <sub>3</sub>	Totales
Media	3	0	0	3	1	1	0	2
Mediana	0	0	0	0	0	0	0	0
Mínimo	0	0	0	0	0	0	0	0
Máximo	93	3	0	96	14	13	2	22
	Germen (µg/kg)				Fibra (µg/kg)			
	FB <sub>1</sub>	FB <sub>2</sub>	FB <sub>3</sub>	Totales	FB <sub>1</sub>	FB <sub>2</sub>	FB <sub>3</sub>	Totales
Media	333	191	20	545	70	16	1	88
Mediana	5	2	0	11	0	0	0	0
Mínimo	0	0	0	0	0	0	0	0
Máximo	1361	123	5234	890	155	21	1053	4639
	Aguas de maceración (µg/kg)				Aguas de lavado (µg/kg)			
	FB <sub>1</sub>	FB <sub>2</sub>	FB <sub>3</sub>	Totales	FB <sub>1</sub>	FB <sub>2</sub>	FB <sub>3</sub>	Totales
Media	279	40	7	327	75	19	2	74
Mediana	8	0	0	10	2	0	0	1
Mínimo	0	0	0	0	0	0	0	0
Máximo	4047	520	102	4354	804	249	50	804

A partir del proceso de molienda húmeda a escala planta piloto se obtuvieron distintos sub productos, y los rendimientos de cada fracción se sintetizan en la tabla IV.29.

**Tabla IV.29.** Rendimiento de la molienda húmeda escala planta piloto

Fracción	Rendimiento en gramos*	Rendimiento%*
Germen	3,40	11,15
Fibra	2,92	9,55
Gluten	2,91	9,60
Almidón	18,61	60,89
Aguas de lavado	0,34	1,10
Aguas de maceración	2,35	7,71
Maíz entero	32,88	100

\* Valor promedio de tres procesos

Con los valores de rendimiento y la contaminación de cada fracción se realizó un balance de masa, con el fin de estudiar cómo afecta el proceso de molienda la contaminación por fumonisinas. En la tabla IV.30 se puede observar el resultado del balance realizado.

**Tabla IV. 30.** Balance de masa de las micotoxinas

Fracción	Concentración* (µg/kg)			µg de toxina**			
	FB <sub>1</sub>	FB <sub>2</sub>	FB <sub>3</sub>	FB <sub>1</sub>	FB <sub>2</sub>	FB <sub>3</sub>	FB totales
Germen	333	191	20	1,13	0,65	0,07	1,85
Fibra	70	16	1	0,20	0,05	0,01	0,26
Gluten	1	1	0	0,01	0,00	0,00	0,01
Almidón	3	0	0	0,06	0,01	0,00	0,06
Aguas de lavado	75	19	2	0,03	0,01	0,00	0,03
Aguas de maceración	279	40	7	0,66	0,10	0,02	0,77
Total				2,08	0,81	0,10	2,98
Maíz	4750	2294	547	156,21	75,43	18,002	249,64
Reducción %				99	99	99	99

\* Valores medios de contaminación

\*\* µg de toxina en los gramos totales de cada producto

En la tabla IV. 30, se puede observar que el proceso de molienda húmeda a escala planta piloto, provoca una reducción del 99 %, de las toxinas FB<sub>1</sub>, FB<sub>2</sub> y FB<sub>3</sub> que se encontraban originalmente en el maíz.

Concluido el estudio en planta piloto, se procedió a analizar el proceso de molienda húmeda de maíz a escala industrial, con granos provenientes de las cosechas 2004-2005. En esta parte de la investigación se analizaron 19 procesos. En las siguientes tablas se observan los resultados de la contaminación encontrada en el maíz (IV.31) y en las fracciones obtenidas a partir de la molienda húmeda (IV.32).

**Tabla IV.31.** Contaminación del maíz por fumonisinas a la entrada de la molienda.

	<b>FB<sub>1</sub> (µg/kg)</b>	<b>FB<sub>2</sub> (µg/kg)</b>	<b>FB Total (µg/kg)</b>
Mediana*	6139	2170	8309
Media*	6409	2489	8899
Máximo*	14286	6199	20486
Mínimo*	1548	385	1933

\* Valores tomados de 19 ciclos

**Tabla IV.32** Contaminación de las fracciones obtenidas de la molienda húmeda de maíz, escala planta industrial.

	Germen ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )			Gluten meal ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )		
	FB <sub>1</sub>	FB <sub>2</sub>	FB total	FB <sub>1</sub>	FB <sub>2</sub>	FB total
Mediana	1211	1127	2339	2062	3042	5105
Media	1302	1648	2950	1884	2898	4783
Máximo	2585	4611	7196	3520	5298	8818
Mínimo	335	352	687	0	0	0
	Gluten feed ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )			Fibra Húmeda sin agua de maceración ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )		
	FB <sub>1</sub>	FB <sub>2</sub>	FB total	FB <sub>1</sub>	FB <sub>2</sub>	FB total
Mediana	1020	224	1244	386	443	829
Media	911	264	1175	429	586	1015
Máximo	2648	869	3517	1091	2088	3179
Mínimo	0	0	0	0	0	0
	Fibra Húmeda más agua de maceración ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )			Suspensión de almidón 16 hs ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )		
	FB <sub>1</sub>	FB <sub>2</sub>	FB total	FB <sub>1</sub>	FB <sub>2</sub>	FB total
Mediana	1399	341	1740	0	0	0
Media	1642	379	2022	24	12	35
Máximo	3591	660	4251	205	198	404
Mínimo	181	175	356	0	0	0
	Agua de Maceración ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )					
	FB <sub>1</sub>	FB <sub>2</sub>	FB total			
Mediana	492	158	651			
Media	570	123	693			
Máximo	2079	347	2426			
Mínimo	0	0	0			

Valores tomados de 19 ciclos

Los rendimientos de cada fracción fueron obtenidos de la planta y se encuentran descritos en la tabla IV.33.

**Tabla IV.33.** Rendimiento de la molienda húmeda industrial.

Muestra	Peso (Tn)	Rendimiento %
Maíz	121	100
Almidón	84-85	69-70
Germen	8-8,5	6,5-7
Gluten Meal	6	4,5-5
Fibra + Solubles	18	14-15

En las tabla IV.34 se muestran los resultados del estudio al realizar el balance de masa, hecho de manera similar al practicado en la molienda húmeda de maíz a escala planta piloto.

**Tabla IV. 34.** Balance de masa de las micotoxinas, molienda húmeda escala industrial

Muestra	Concentración (µg/kg)*		µg de toxina**		
	FB <sub>1</sub>	FB <sub>2</sub>	FB <sub>1</sub>	FB <sub>2</sub>	FB Totales
Maíz	6139	2170	742867400	262570000	1005437400
Almidón	0	0	0	0	0
Germen	1211	1127	9994463	9299400	19293863
Gluten Meal	2062	3042	12374400	18254400	30628800
Fibra + Solubles	1399	341	25178400	6135300	31313700
Total (suma de las fracciones)			47547263	33689100	81236363
Reducción %			94	87	92

\* Valores medios de contaminación

\*\* µg de toxina en las toneladas totales de cada producto

Como se puede observar, los balances de masa realizados con los resultados de ambas escalas del proceso de molienda húmeda de maíz, arrojan resultados similares, la disminución de las fumonisinas B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub> durante el proceso.

### IV.2.3. Fumonisinias hidrolizadas y fumonisinias unidas en la elaboración de chizitos.

Resultados similares al del proceso de molienda húmeda, reducción de la contaminación inicial de fumonisinias después de la molienda, se obtuvieron en el proceso de extrusión durante la fabricación de chizitos a partir de harina de maíz (Federico, 2009, tabla IV.35).

**Tabla IV.35.** Reducción de la contaminación de fumonisinias durante la extrusión de la harina de maíz.

Matriz	FB <sub>1</sub> (µg/kg)	FB <sub>2</sub> (µg/kg)	FB <sub>3</sub> (µg/kg)
Harina de maíz	525	152	53
Chizitos	243	77	24
Reducción %	<b>53,8</b>	<b>49,2</b>	<b>54,6</b>

Valores medios de cuatro procesos

Adaptado de Federico 2009

Con los resultados de estos dos procesos, molienda húmeda y extrusión, y a la amplia bibliografía donde se destaca que las micotoxinas originales pueden formar análogos de fumonisinias durante el proceso de elaboración de alimentos, hidrolizarse en parte de su estructura y /o adición a la matriz donde se encuentran (ver capítulo I), se procedió al estudio, de las fumonisinias unidas e hidrolizadas. El objetivo es identificar si el descenso de las fumonisinias durante los procesos estudiados, es la conversión de las mismas en alguno de sus análogos.

Se empezó con el análisis del proceso de fabricación de chizitos, para esto se estudiaron ambas matrices, harina de maíz y chizitos, se analizó la presencia de fumonisinas totales o sea FBx+HFBx+fumonisinias unidas.

En la tabla IV.36 se muestran los resultados de este estudio.

**Tabla IV.36.** Fumonisinias totales

Proceso	Harina de maíz (µg/kg)			Chizitos (µg/kg)		
	FB <sub>1</sub>	FB <sub>3</sub>	FB <sub>2</sub>	FB <sub>1</sub>	FB <sub>3</sub>	FB <sub>2</sub>
1	217	59	102	46	ND	2
2	50	48	61	77	ND	27
3	47	16	27	57	ND	12
4	328	57	143	213	38	96
5	59	3	22	76	26	83
6	40	7	20	95	27	53

Se expresan como FBx, a pesar que son cuantificadas como HFBx.

De la tabla IV.36, se puede ver, que la concentración de fumonisinas totales, es mayor en la harina de maíz que en el chizito producido con esta en la mayoría de los procesos estudiados.

### IV.3. Discusión

Tal como se hizo con la patulina, durante esta tesis doctoral se desarrollo y se puse a punto metodologías analíticas para determinar fumonisinas y sus productos de hidrolisis, en dos procesos industriales que son aplicados sobre los granos de maíz.

La metodología, se desarrollo sobre matrices distintas, obteniendo en todas ellas buenas recuperaciones y bajos límites de detección y cuantificación,

exceptuando el almidón, donde las recuperaciones, fueron menores al 20% para las toxinas probadas en los niveles analizados.

Ambos procesos presentan resultados que inducen un comportamiento similar de las fumonisinas, en el caso de la molienda húmeda en ambas escalas, planta piloto e industrial, se observó una reducción del 87 al 99% en las fumonisinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> y B<sub>3</sub>.

Como se acaba de nombrar la reducción de la contaminación por fumonisinas se reduce de forma abrupta, pero tenemos que la fracción mayoritaria del maíz, el almidón (aproximadamente 70% del total del grano de maíz), presenta recuperaciones cercanas al 10%.

Si se corrige la contaminación determinada para cada fracción, de acuerdo a las recuperaciones obtenidas, el nuevo balance de masa calculado con las concentraciones corregidas, se muestra para la molienda húmeda escala planta industrial en la Tabla IV.37.

**Tabla IV.37.** Balance de masa de las micotoxinas corrigiendo la contaminación por la recuperación de cada fracción

Muestra	Conc. µg/kg *		Rec %**		Conc. µg/kg corregida por rendimiento		µg de toxina ***		
	FB <sub>1</sub>	FB <sub>2</sub>	FB <sub>1</sub>	FB <sub>2</sub>	FB <sub>1</sub>	FB <sub>2</sub>	FB <sub>1</sub>	FB <sub>2</sub>	FB Totales
Maíz	6409	2489	82	122	7825	2048	946873016	247773756	1194646772
Almidón	24	12	14	10	171	120	14485714	10200000	24685714
Germen	1302	1648	80	81	1638	2047	13511321	16889441	30400762
Gluten Meal	1884	2998	68	97	2791	3107	16746667	18640415	35387081
Fibra + Solubles	1642	379	115	123	1434	308	25813100	5546341	31359442
Total (suma de las fracciones)							70556802	51276197	121832999
Reducción %							93	79	90

\* Mediana de los valores de contaminación

\*\* Promedio de los valores de recuperación obtenidos en cada fracción

\*\*\* µg de toxina en las toneladas totales de cada producto

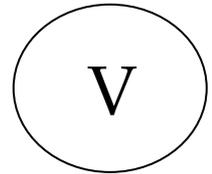
Aun corrigiendo por la recuperación, la reducción de las fumonisinas, durante el proceso de molienda húmeda de maíz en el proceso a escala planta industrial es de 93 % para FB<sub>1</sub>, 79% para FB<sub>2</sub> y 90% para FB<sub>3</sub>. Lo cual nos indicaría que por más que se mejore la metodología de extracción de fumonisinas del almidón de maíz, este proceso provoca una reducción importante de estas micotoxinas.

Cuando a la harina de maíz se la somete a un proceso de extrudado, donde sufre altas presiones y temperatura, las fumonisinas encontradas en la harina que se transformara en chizitos, sufren una reducción cercana al 50%. Seefelder y col. (2001) mostraron resultados similares ya que encontraron que entre el 70-90% de la FB<sub>1</sub> adicionada, se pierde cuando el maíz es sometido a extrusión.

Humpf y Voss (2004), comprobaron que el horneado, fritura y extrusión del maíz a temperaturas mayores de 190°C, reduce la concentración de fumonisinas. Sin embargo no pudieron concluir, si esta reducción es producto de la descomposición de las fumonisinas o por efecto de la unión de estas a proteínas, azúcares u otros componentes presentes en la matriz, lo cual hace que los métodos tradicionales de extracción, no sean adecuados para la determinación de estos compuestos.

Con estos antecedentes bibliográficos, fue que se decidió el análisis de las fumonisinas totales, hidrolizando la matriz sin la previa extracción de las fumonisinas libres. El objetivo fue comprobar a que fenómeno se puede deber la reducción encontrada en los estudios realizados en este trabajo doctoral. El análisis de fumonisinas totales en el proceso de extrusión, arrojó que en las muestras analizadas, existe una mayor concentración de fumonisinas totales (29%) en la harina

de maíz que la encontrada en los chizitos. Es de suponer, de acuerdo a estos resultados, que existe una reducción de las fumonisinas presentes originalmente en el maíz, no pudiendo justificar este descenso en la contaminación, por la formación de productos de hidrólisis o unión de las fumonisinas a la matriz.



## **Conclusiones**

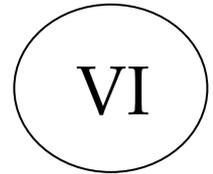
## V. CONCLUSIONES

- Se desarrolló una metodología analítica para la determinación de patulina, en productos sólidos y semisólidos de manzana y pera, que cumple los parámetros planteados en la reglamentación de la UE (2006) para metodologías analíticas donde se determinan micotoxinas en alimentos. Los bajos límites de detección y cuantificación, logrados hacen posible la utilización de esta metodología en alimentos para bebé, donde los límites impuestos son más estrictos.
- Se realizó el primer relevamiento en el país, sobre la ocurrencia natural de patulina en productos sólidos y semisólidos comercializados en Argentina.
- El puré de manzana, fue el producto que presentó mayor cantidad de muestras contaminadas y valores más altos de contaminación.
- En el periodo de recolección de muestras para el ensayo de decontaminación utilizando luz pulsada, solo se encontró un puré de manzana o producto elaborado con puré naturalmente contaminado, lo cual muestra la variación en la contaminación que puede ocurrir a través de los años.
- El tratamiento con luz pulsada, redujo la contaminación inicial en la solución modelo, como así también en el jugo de manzana clarificado contaminado artificialmente y en una muestra de puré de manzana contaminada naturalmente.
- Se realizó en el país el primer estudio de ocurrencia de fumonisinas en productos obtenidos a partir de la molienda húmeda de maíz.

- La aplicación de la molienda húmeda al maíz, tanto en escala piloto o industrial, provocan un descenso en la contaminación por fumonisinas.
- Las fracciones con mayor concentración de fumonisinas en escala piloto son el germen y las aguas de maceración. En la planta son el gluten meal, germen, gluten feed, las fracciones que contienen fibra y las aguas de maceración.
- El estudio de la formación de productos de hidrólisis o productos de adición, no justifica la reducción de aproximadamente el 50% de la contaminación por fumonisinas durante el extrudado de harina de maíz.

Gustavo J. Funes

Silvia Resnik



## **Bibliografía**

## VI. BIBLIOGRAFIA

- Abd Alla El-Sayed, A., Aly Soher, E. y Sahab, A. (2003). "Occurrence of certain mycotoxins in corn and corn-based products and thermostability of fumonisin B<sub>1</sub> during processing" *Food / Nahrung*, 47(4): 222-225.
- Abnet, C., Borkowf, C., Qiao, Y., Albert, P., Wang, E., Merrill, A., Mark, S., Dong, Z., Taylor, P. y Dawsey, S. (2001) "Sphingolipids as biomarkers of fumonisin exposure and risk of esophageal squamous cell carcinoma in China" *Cancer Causes Control*, 12: 821-828.
- Acar, J., Gökmen, V. y Taydas, E. (1998). "The effects of processing technology on the patulin content of juice during commercial apple juice concentrate production" *European Food Research and Technology*, 207(4): 328-331.
- Alves, I., Oliveira, N., Laires, A., Rodriguez, A. y Rueff, J. (2000). "Induction of micronuclei and chromosomal aberrations by the mycotoxin patulin in mammalian cells: role of ascorbic acid as a modulator of patulin clastogenicity" *Mutagenesis*, 15(3): 229-234.
- Andersen, B., Smedsgaard, J. y Frisvad, J. (2004). "*Penicillium expansum*: Consistent production of patulin, chaetoglobosins, and other secondary metabolites in culture y their natural occurrence in fruit products" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(8): 2421-2428.
- Andersen, B., y Frisvad, J. (2004). "Natural occurrence of fungi and fungal metabolites in moldy tomatoes" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(25): 7507-7513.
- AOAC (2000). "Fumonisin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, and B<sub>3</sub> in Corn. Liquid Chromatographic Method". AOAC International. Official Methods of Analysis of AOAC International, 17<sup>th</sup> ed. Method 995.15. The Association, Gaithersburg, MD.
- Arafat, W., Kern, D. y Dirheimer, G. (1985). "Inhibition of aminoacyl-tRNA synthetases by the mycotoxin patulin" *Chemico-Biological Interactions*, 56(2-3): 333-349.
- Baert, K., De Meulenaer, B., Kamala, A., Kasase, C., y Devlieghere, F. (2006). "Occurrence of patulin in organic, conventional, and handcrafted apple juices marketed in Belgium" *Journal of Food Protection*, 69(6): 1371-1378.
- Baert, K., Meulenaer, B., Kasase, C., Huyghebaert, A., Ooghe, W. y Devlieghere, F. (2007). "Free and bound patulin in cloudy apple juice" *Food Chemistry*, 100(3): 1278-1282.

- Barreira, M., Alvito, P. y Almeida, C. (2010). "Occurrence of patulin in apple-based-foods in Portugal" *Food Chemistry*, 121(3): 653–658.
- Bartók, T., Szécsi, Á., Szekeres, A., Mesterházy, Á. y Bartók, M. (2006). "Detection of new fumonisin mycotoxins and fumonisin-like compounds by reversed-phase high-performance liquid chromatography/electrospray ionization ion trap mass spectrometry" *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 20(16), 2447-2462.
- Bartók, T., Tollgyesi, L., Mesterhazy, A., Bartók, M. y Szecsi, Á. (2010a). "Identification of the first fumonisin mycotoxins with three acyl groups by ESI-ITMS and ESI-TOFMS following RP-HPLC separation: Palmitoyl, linoleoyl and oleoyl EFB<sub>1</sub> fumonisin isomers from a solid culture of *Fusarium verticillioides*" *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, 27(12), 1714-1723.
- Bartok, T., Tolgyesi, L., Szekeres, A., Varga, M., Bartha, R., Szecsi, A., Bartok, M. y Mesterhazy, A. (2010b). "Detection and characterization of twenty-eight isomers of fumonisin B<sub>(1)</sub> (FB<sub>(1)</sub>) mycotoxin in a solid rice culture infected with *Fusarium verticillioides* by reversed-phase high-performance liquid chromatography/electrospray ionization time-of-flight and ion trap mass spectrometry" *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 24(1), 35-42.
- Becci, P., Hess, F., Johnson, W., Gallo, M., Babish, J., Dailey, R. y Parent, R. (1981) "Long-term carcinogenicity and toxicity studies of patulin in the rat" *Journal of Applied Toxicology*, 1(5): 256–261.
- Bennett, J. W., y Klinch, M. (2003). "Mycotoxins" *Clinical microbiology reviews*, 16(3): 497-516.
- Beretta, B., Gaiaschi, A., Galli, C. y Restani, P. (2000). "Patulin in apple-based foods: Occurrence y safety evaluation" *Food Additives and Contaminants*, 17(5): 399-406.
- Bezuidenhout, S., Gelderblom, W., Gorst-Allman, C., Marthinus Horak, R., Marasas, W., Spiteller, G. y Vlegaar, R. (1988). "Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*" *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications; Issue 11*: 743–745.
- Bintsis T., Litopoulou-Tzanetaki E., Davies, R. y Robinson, R. (2000). "The antimicrobial effects of long-wave ultra-violet light and furocoumarins on some microorganisms that occur in cheese brines" *Food Microbiology*, 17(6): 687-695.

- Boonzaaijer, G., Bobeldijk, I., y van Osenbruggen, W. (2005). "Analysis of patulin in dutch food, an evaluation of a SPE based method" *Food Control*, 16(7): 587-591.
- Brackett, R. y Marth, E. (1979). "Ascorbic acid and ascorbate cause disappearance of patulin from buffer solutions and apple juice" *Journal of Food Protection*, 42: 864-866.
- Braunberg, R., Gantt, O. y Friedman, L. (1982). "Toxicological evaluation of compounds found in food using rat renal explants" *Food and Chemical Toxicology*, 20(5): 541-546.
- Bullerman, L. (1996). "Occurrence of *Fusarium* and fumonisins on food grains and in foods" *Fumonisins in food Volumen 392. Capitulo 3, 27-38*. Editores: Jackson, L., Bullerman, L. y DeVries, J.
- Butz P. y Tauscher B. (2002). "Emerging technologies: chemical aspects" *Food Research International*, 35 (2-3): 279-284.
- Camguilhem, R., Escoula, L., y Henry, M. (1976). "Toxines de *Byssochlamys nivea* Westling. I. Etude preliminaire de la toxicité chez le mouton". "*Byssochlamys nivea* toxins. I. Preliminary study of the toxicity for sheep" *Annales de Recherches Veterinaires*, 7: 177-183.
- Castelo, M., Jackson, L., Hanna, M., Reynolds, B. y Bullerman, L. (2001). "Loss of fumonisin B1 in extruded and baked corn-based foods with sugars" *Journal of Food Science*, 66: 416-421.
- Chu, F. y Li, G. (1994). "Simultaneous occurrence of fumonisin B<sub>1</sub> and other mycotoxins in moldy corn collected from the People's Republic of China in regions with high incidences of esophageal cancer" *Applied Environmental Microbiology*, 60(3): 847-852.
- Ciegler, A., Beckwith, A. y Jackson, L. (1976). "Teratogenicity of patulin and patulin adducts formed with cysteine" *Applied And Environmental Microbiology*, 31(5): 664-667.
- C.E. (2009). [http://europa.eu/pol/food/index\\_es.htm](http://europa.eu/pol/food/index_es.htm)
- C.E. (2003). <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri>
- C.E. (2003). <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2003:203:0001:0003:EN:PDF>
- C.E. (2006). Diario Oficial de la Unión Europea L70/30 9.3.2006. ANEXO II. "Criterios aplicables a la preparación de las muestras y los métodos de análisis para el control oficial del contenido de micotoxinas en los productos alimenticios"

<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:070:0012:0034:ES:PDF>.

- Cooray, R., Kiessling, K. y Lindahl-Kiessling, K. (1982). "The effects of patulin and patulin-cysteine mixtures on DNA synthesis and frequency of sister-chromatid exchanges in human lymphocytes" *Food and Chemical Toxicology*, 20(6): 893-898.
- Cotten, T. y Munkvold, G. (1998). "Survival of *Fusarium moniliforme*, *F. proliferatum*, and *F. subglutinans* in maize stalk residue" *Phytopathology* 88(6): 550-555.
- D'Arcy Hart P. (1999). "A change in scientific approach: from alternation to randomised allocation in clinical trials in the 1940's" *British Medical Journal*, 319: 572-73.
- Dailey, R., Blaschka, A., y Brouwer, E. (1977a). "Absorption, distribution, and excretion of <sup>14</sup>C-patulin by rats" *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 3(3): 479-489.
- Dailey, R., Brouwer, E., Blaschka, A., Reynaldo, E., Green, S., Monlux, W. y Ruggles, D. (1977b). Intermediate-duration toxicity study of patulin in rats. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 2(3): 713-725.
- Dall'Asta, C., Galaverna, G., Dossena, A., Sforza, S. y Marchelli, R. (2010). "Masked mycotoxins and mycotoxins derivatives in food: the hidden menace" *Mycotoxins in Food, Feed and Bioweapons*. Capitulo 22, páginas 385-397. Editores Rai M. y Varma, A.
- De Girolamo, A, Solfrizzo, M, von Holst, C y Visconti, A. (2001). "Comparison of different extraction and clean-up procedures for the determination of fumonisins in maize and maize-based food products" *Food Additives and Contaminants*, 18(1): 59-67.
- de Sylos, C. y Rodríguez-Amaya, D. (1999). "Incidence of patulin in fruits and fruit juices marketed in Campinas, Brazil" *Food Additives and Contaminants*, 16(2): 71-74.
- Devaraj, H., Radha Shanmugasundaram, K. y Shanmugasundaram, E. (1982). "Neurotoxic effect of patulin" *Indian Journal of Experimental Biology*, 20(3): 230-231.
- Devaraj, H., Radha Shanmugasundaram, K. y Shanmugasundaram, E. (1986). "Role of patulin as a diabetogenic lactone" *Indian Journal of Experimental Biology*, 24(7): 458-459.
- Dickens, F. y Jones, H. (1961). "Carcinogenic activity of a series of reactive lactones and related substances" *British Journal of Cancer*, 15(1): 85-100.
- Dombrink-Kurtzman, M. y Dvorak, T. (1999). "Fumonisin content in masa and tortillas from Mexico" *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47, 622-627.
- Dong, Q., Manns, D., Feng, G., Yue, T., Churey, J., y Worobo, R. (2010). "Reduction of patulin in apple cider by UV radiation" *Journal of Food Protection*, 73(1): 69-74.

- Drusch, S. y Ragab, W. (2003). "Mycotoxins in fruits, fruit juices, and dried fruits" *Journal of Food Protection*, 66(8): 1514-1527.
- Drusch, S., Kopka, S. y Kaeding, J. (2007). "Stability of patulin in a juice-like aqueous model system in the presence of ascorbic acid" *Food Chemistry*, 100(1): 192-197.
- Dupuy, J., Le Bars, P., Boudra, H. y Le Bars, J. (1993). "Thermostability of fumonisin B<sub>1</sub>, a mycotoxin from *Fusarium moniliforme*, in corn" *Applied and Environmental Microbiology*, 59(9): 2864-2867.
- Dutton, M. (1996). "Fumonisin, mycotoxins of increasing importance: Their nature and effects" *Pharmacology and Therapeutics*, 70(2): 137-161.
- Elmnasser N., Guillou, S., Leroi, F., Orange, N., Bakhrouf, A. y Federighi, M. (2007). "Pulsed-light system as a novel food decontamination technology: A review" *Canadian Journal of Microbiology*, 53(7): 813-821.
- Enongene, E., Sharma, R., Bhandari, N., Voss, K. y Riley, R. (2000). "Disruption of sphingolipid metabolism in small intestines, liver and kidney of mice dosed subcutaneously with fumonisin B<sub>1</sub>" *Food and Chemical Toxicology*, 38(9): 793-799.
- Escoula, L., Thomsen, M. Bourdiol, D., Pipy, B., Peuriere, S. y Roubinet, F. (1988). "Patulin immunotoxicology: effect on phagocyte activation and the cellular and humoral immune system of mice and rabbits" *International Journal of Immunopharmacology*, 10(8): 983-989.
- Etcheverry, M. (1992). "Crecimiento de hongos toxicogénicos y acumulación de micotoxinas. Efectos de diversos parámetros". Departamento de Microbiología e Inmunología, Área Micología, Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto, Córdoba, Argentina.
- FDA [Food and Drug Administration] (2001). Patulin in Apple Juice, Apple Juice Concentrates and Apple Juice Products. U.S. Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition Office of Plant and Dairy Foods and Beverages, 2001, <http://vm.cfsan.fda.gov/dms/patubck2.html>.
- Federico, F. (2009). "Formación de Derivados de Fumonisin en la Elaboración de Palos de Harina de Maíz." Tesis presentada para optar al título de Magíster en Bromatología y Tecnología de la Industrialización de los Alimentos de la Universidad de Buenos Aires. Director: Resnik, S.

- Fernández-Cruz, M., Mansilla, M. y Tadeo, J. (2010). "Mycotoxins in fruits and their processed products: Analysis, occurrence and health implications" *Journal of Advanced Research*, 1(2): 113-122.
- Fliege, R. y Metzler, M. (2000). "Electrophilic properties of patulin. N-acetylcysteine and glutathione adducts" *Chemical Research in Toxicology*, 13(5): 373-381.
- Frisvad, J., Smedsgaard, J., Larsen, T. y Samson, R. (2004). "Mycotoxins, drugs and other extrolites produced by species in *Penicillium* subgenus *Penicillium*" *Studies in Mycology*, 49: 201-242.
- Frisvad, J., Thrane, U., Samson, R. y Pitt, P. (2006). "Important mycotoxins and the fungi which produce them" *Advances in Food Mycology*, 571: 3-31.
- Frisvad, J., Smedsgaard, J., Samson, R., Larsen, T. y Thrane, U. (2007a). "Fumonisin B<sub>2</sub> production by *Aspergillus niger*" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(23): 9727-9732.
- Frisvad, J., Thrane, U. y Samson, R. (2007b). "Mycotoxin producers" En: *Food Mycology: A Multifaceted Approach to Fungi and Food*, Cap. 8: 135-159. Eds. Dijksterhuis, J. y Samson.
- Fuchs, S., Sontag, G., Stidl, R., Ehrlich, V., Kundi, M. y Knasmüller, S. (2008) "Detoxification of patulin and ochratoxin A, two abundant mycotoxins, by lactic acid bacteria" *Food and Chemical Toxicology*, 46(4): 1398-1407.
- Garza, H., Swanson, B. y Branen, A. (1977). "Toxicology study of patulin in monkeys" *Journal of Food Science*, 42(5): 1229-1231.
- Gelderblom, W., Thiel, P., van der Merwe, K., Marasas, W. y Spies, H. (1983). "A mutagen produced by *Fusarium moniliforme*" *Toxicon*, 21(4): 467-473.
- Gelderblom, W., Marasas, W., Steyn, P., Thiel, P., van der Merwe, K., van Rooyen, P., Vleggaar, R. y Wessels, P. (1984a). "Structure elucidation of fusarin C, a mutagen produced by *Fusarium moniliforme*" *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 2: 122-124.
- Gelderblom, W., Thiel, P., Marasas, W. y van der Merwe, K. (1984b). "Natural occurrence of fusarin C, a mutagen produced by *Fusarium moniliforme*, in corn" *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 32(5): 1064-1067.

- Gelderblom, W., Thiel, P., Jaskiewicz, K. y Marasas, W. (1986) "Investigations on the carcinogenicity of fusarin C—a mutagenic metabolite of *Fusarium moniliforme*" *Carcinogenesis*, 7: 1899–1901.
- 
- Gelderblom, W., Marasas, W., Jaskiewicz, K., Combrinck, S. y van Schalkwyk, D (1988a). "Cancer promoting potential of different strains of *Fusarium moniliforme* in a short-term cancer initiation/promotion assay" *Carcinogenesis*, 9: 1405–1409.
- Gelderblom, W., Jaskiewicz, K., Marasas, W., Thiel, P., Horak, R., Vleggaar, R. y Kriek, N. (1988b). "Fumonisin—novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*" *Applied and Environmental Microbiology*, 54(7): 1806–1811.
- Gelderblom, W., Cawood, M., Snyman, S., Vleggaar, R., Marasas, W. (1993). "Structure-activity relationships of fumonisins in short-term carcinogenesis and cytotoxicity assays" *Food and Chemical Toxicology* 31: 407–414.
- GEMS/Food-EURO Second Workshop on Reliable Evaluation of Low-Level Contamination of Food. "Report on a Workshop in the Frame of GEMS/Food-EURO" Kulmbach, Federal Republic of Germany, 26 - 27 May 1995. EUR/HFA target 22. [http://www.who.int/foodsafety/publications/chem/en/lowlevel\\_may1995.pdf](http://www.who.int/foodsafety/publications/chem/en/lowlevel_may1995.pdf).
- Gökmen, V. y Acar, J. (1996). "Rapid reversed-phase liquid chromatographic determination of patulin in apple juice" *Journal of Chromatography A*, 730(1-2): 53–58.
- Gökmen, V., Artik, N., Acar, J., Kahraman, N. y Poyrazoglu, E. (2001). "Effects of various clarification treatments on patulin, phenolic compound and organic acid compositions of apple juice" *European Food Research and Technology*, 213 (3): 194–199.
- Gökmen, V., Acar, J. y Sarioglu, K. (2005). "Liquid chromatographic method for the determination of patulin in apple juice using solid-phase extraction" *Analytica Chimica Acta*, 543(1/2): 64–69.
- Gómez P., Alzamora S., Castro, M., y Salvatori, D. (2010). "Effect of ultraviolet-C light dose on quality of cut-apple: Microorganism, color and compression behavior" *Journal of Food Engineering*, 98(1): 60–70.
- Gómez-López V., Ragaert P., Debevere, J. y Devlieghere, F. (2007). "Pulsed light for food decontamination: a review" *Trends in Food Science & Technology*, 18 (9): 464–473.

- Haros, M. y Suarez, C. (1997). "Effect of chemical pretreatments and lactic acid on the rate of water absorption and starch yield in corn wet milling" *Cereal Chemistry*, 76(5):783-787.
- Harper, J. (1989). "Food extruders and their applications" *Extrusion Cooking*, AACC, Inc., Minnesota, EEUU. Editores: Mercier, C., Linko, P. y Harper, J.
- Harrison, L., Colvin, B., Greene, J., Newman, L. y Cole, J. (1990). "Pulmonary edema and hydrothorax in swine produced by fumonisin B<sub>1</sub>, a toxic metabolite of *Fusarium moniliforme*" *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 2: 217-221.
- Harrison, M. (1989). "Presence and stability of patulin in apple products: a review" *Journal of Food Safety*, 9(3): 147-153.
- Hartl, M. y Humpf, H. (1999). "Simultaneous Determination of Fumonisin B<sub>1</sub> and Hydrolyzed Fumonisin B<sub>1</sub> in Corn Products by Liquid Chromatography/Electrospray Ionization Mass Spectrometry" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(12): 5078-5083.
- Harwig, J., Scott, P., Kennedy, B. y Chen, Y. (1973). "Disappearance of patulin from apple juice fermented by *Saccharomyces spp*" *Journal Canadian Institute of Food Science and Technology*, 6(1):45-46.
- Howard, P., Churchwell, M., Couch, L., Marques, M. y Doerge, D. (1998). "Formation of N-(carboxymethyl) fumonisin B<sub>1</sub> following the reaction of fumonisin B<sub>1</sub> with reducing sugars" *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 46(9): 3546-3557.
- Humpf, H. y Voss, K. (2004). "Effects of thermal food processing on the chemical structure and toxicity of fumonisin mycotoxins" *Molecular Nutrition and Food Research*, 48: 255-269.
- IARC [International Agency for Research on Cancer] (1986). "Monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to humans: Patulin" 40: 83-98.
- IARC [International Agency for Research on Cancer] (2002). "Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans - Some Traditional Herbal Medicines, Some Mycotoxins, Naphthalene and Styrene" Volume 82.
- Iha, M., y Sabino, M. (2006). "Determination of patulin in apple juice by liquid chromatography" *Journal of AOAC International*, 89(2): 139-143.
- Jackson, L. y Jablonski, J. (2004). "Fumonisins". En: *Mycotoxins in Food: Detections and Controls*, Cap. 16: 367-405. Eds. Magan, M. y Olsen, M.

- Jackson, L. y Dombrink-Kurtzman, M. (2006). "Patulin" En: Microbiology of fruits and vegetables, Cap. 13: 281-311. Ed. Sapers, G., Gorny, J. y Yousef, A.
- Jaskiewicz K., Marasas W. y van der Walt, F. (1987) "Oesophageal and other main cancer patterns in four districts of Transkei, 1981-1984" South African Medical Journal, 72(1), 27-30.
- JECFA [Joint Expert Committee on Food Additives] (1996). Patulin. Safety Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants, 847 Patulin, WHO Food Additive Series, 35. <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v35je16.htm>.
- Jestoi, M., Rokka, M., Yli-Mattila, T., Parikka, P., Rizzo, A. y Peltonen, K. (2004). "Presence and concentrations of the *Fusarium*-related mycotoxins beauvericin, enniatins and moniliformin in Finnish grain samples" Food Additives and Contaminants, 21(8): 794-802.
- Kadakal, C. y Nas, S. (2002). "Effect of apple decay proportion on the patulin, fumaric acid, hmf and other apple juice properties" Journal of Food Safety, 22(1): 17-25.
- Kadakal, C., Nas, S. y Poyrazoglu, E. (2002). "Effect of commercial processing stages of apple juice on patulin, fumaric acid and hydroxymethylfurfural (HMF) levels" Journal of Food Quality, 25: 359-368.
- Karimi, G., Hassanzadeh, M., Azdanpanah, H., Nazari, F., Iranshahi, M. y Nili, A. (2008). "Contamination of patulin in clear apple juice in Mashhad, Iran" Journal of Food Safety, 28(3): 413-421.
- Kawashima, L., Valente Soares, L. y Massaguer, P. (2002). "The development of an analytical method for two mycotoxins, patulin y verruculogen, and survey of their presence in commercial tomato pulp" Brazilian Journal of Microbiology, 33(3): 269-273.
- Kellerman, T., Marasas, W., Pienaar, J. y Naude, T. (1972). "A mycotoxicosis of Equidae caused by *Fusarium moniliforme* Sheldon" The Onderstepoort Journal of Veterinary Research, 39(4):205-208.
- Kim, E., Scott, P. y Lau, B. (2003). "Hidden fumonisin in corn flakes" Food Additives and Contaminants, 20: 161-169.
- Koca, N. y Eksi, A. (2005). "Reduction of patulin in apple juice concentrates during storage" Journal of Food Safety, 25(1): 1-8.

- Kriek, N., Kellerman, T. y Marasas, W. (1981a). "A comparative study of the toxicity of *Fusarium verticillioides* (= *F. moniliforme*) to horses, primates, pigs, sheep and rats" *The Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 48(2):129-131.
- Kriek, N., Marasas, W. y Thiel, P. (1981b). "Hepato- and cardiotoxicity of *Fusarium verticillioides* (*F. moniliforme*) isolates from southern African maize" *Food and Cosmetics Toxicology*, 19: 447-456.
- Krska, R., Welzig, E. y Boudra, H. (2007). "Analysis of *Fusarium* toxins in feed" *Animal Feed Science and Technology*, 137(3-4): 241-264.
- Kryger, R. (2001). "Volatility of patulin in apple juice" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(8): 4141-4143.
- Laidou, I., Thanassoulopoulos, C. y Liakopoulou-Kyriakides, M. (2001). "Diffusion of patulin in the flesh of pears inoculated with four post-harvest pathogens" *Journal of Phytopathology*, 149(7-8): 457-461.
- Lee, K., y Röschenthaler, R. (1986). "DNA-Damaging Activity of Patulin in *Escherichia coli*" *Applied and Environmental Microbiology*, 52(5): 1046-1054.
- Leggott, N., Shephard, G., Stockenström, S., Staal, E. y van Schalkwyk, D. (2001). "The reduction of patulin in apple juice by three different types of activated carbon" *Food Additives and Contaminants*, 18(9): 825-829.
- Li, F., Zhao, S., Chin, L., Li, Y., Wu, D., Zhao, X., Han, C., Zhang, H. y Ji, R. (2007). "Determination of patulin in apple and Hawthorn beverages by solid-phase filtration column and liquid chromatography" *Journal of AOAC International*, 90(1):167-172.
- Lindroth, S. y Niskanen, A. (1978). "Comparison of potential patulin hazard in home-made and commercial apple products" *Journal of Food Science*, 43(2): 446-448.
- Lindroth, S. y von Wright, A. (1978). "Comparison of the toxicities of patulin and patulin adducts formed with cysteine" *Applied and Environmental Microbiology*, 35(6): 1003-1007.
- Lindroth, S. (1980). "Thermal destruction of patulin in berries and berry jams" *Journal of Food Safety*, 2(3): 165-170.
- Liu, B., Yu, F., Wu, T., Li, S., Su, M., Wang, M. y Shih, S. (2003). "Evaluation of genotoxic risk and oxidative DNA damage in mammalian cells exposed to mycotoxins, patulin and citrinin" *Toxicology and Applied Pharmacology*, 191(3): 255-63.

- Llewellyn, G., McCay, J., Brown, J., Musgrove, D., Butterworth, L., Munson, A. y White, K. (1998). "Immunological evaluation of the mycotoxin patulin in female B6C3F1 mice" *Food and Chemical Toxicology*, 36(12): 1107-1115.
- Logrieco, A., Mulé, G., Moretti, A., Bottalico, A. (2002). "Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with maize ear rot in Europe" *European Journal of Plant Pathology* 108: 597-609.
- López-Díaz, T. y Flannigan, B. (1997). "Mycotoxins of *Aspergillus clavatus*: toxicity of cytochalasin E, patulin, and extracts of contaminated barley malt" *Journal of Food Protection*, 60(11): 1381-1385.
- Lovett, J. (1972). "Patulin toxicosis in poultry" *Poultry Science*, 51(6): 2097-2098.
- Lovett, J. y Peeler, J. (1973). "Effect of pH on the thermal destruction kinetics of patulin in aqueous solution" *Journal of Food Science*, 38(6): 1094-1095.
- MacDonald, S., Long, M., Gilbert, J. y Felgueiras, I. (2000). "Liquid chromatographic method for determination of patulin in clear and cloudy apple juices and apple puree: Collaborative study" *Journal of AOAC International*, 83(6): 1387-1394.
- Maiorano, A., Reyneri, A., Sacco, D., Magni, A. y Ramponi, C. (2009). "A dynamic risk assessment model (FUMAgain) of fumonisin synthesis by *Fusarium verticillioides* in maize grain in Italy" *Crop Protection*, 28: 243-256.
- Makaula, A.N., Marasas, W.F., Venter, F.S., Badenhorst, C.J., Bradshaw, D. y Swanevelder, S. (1996). "Oesophageal and other cancer patterns in four selected districts of the Transkei, Southern Africa: 1985-1990" *South African Medical Journal*, 3(1), 11-15.
- Månsson, M., Klejnstrup, M., Phipps, R., Nielsen, K., Frisvad, J., Gottfredsen, C. y Larsen, T. (2010) "Isolation and NMR characterization of fumonisin B<sub>2</sub> and a new fumonisin B<sub>6</sub> from *Aspergillus niger*" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(2):949-53.
- Marasas, W., Kellerman, T., Pienaar, J. y Naude, T. (1976). "Leukoencephalomalacia: a mycotoxicosis of Equidae caused by *Fusarium moniliforme* Sheldon" *The Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 43(3):113-122.
- Marasas, W., Wehner, F., van Rensburg, S. y van Schalkwyk, D. (1981). "Mycoflora of corn produced in human esophageal cancer areas in Transkei, southern Africa" *Phytopathology*, 71: 792-796.

- Marasas, W., Kriek, N., Fincham, J. y van Rensburg, S. (1984). "Primary liver cancer and oesophageal basal cell hyperplasia in rats caused by *Fusarium moniliforme*" *International Journal of Cancer*, 34(3): 383-387.
- Marasas, W. (2001). "Discovery and occurrence of the fumonisins: a historical perspective" *Environmental Health Perspective*, 109(2): 239-243.
- Marin, S., Magan, N., Ramos, A.J. y Sanchis, V. (2004). "Fumonisin producing strains of *Fusarium*: a review of their ecophysiology" *Journal of Food Protection*, 61: 1792-1805.
- Marín, S., Morales, H., Hasan, H., Ramos, A. y Sanchis, V. (2006). "Patulin distribution in Fuji and Golden apples contaminated with *Penicillium expansum*" *Food Additives and Contaminants Part A*, 23(12): 1316-1322.
- Marín, S., Mateo, E., Vicente Sanchis, V., Valle-Algarra, F., Ramos, A. y Jiménez, M. (2011). "Patulin contamination in fruit derivatives, including baby food, from the Spanish market" *Food Chemistry*, 124(2): 563-568.
- McKenzie, K., Sarr, Mayura, A., Bailey, R., Miller, D., Rogers, T., Norred, W., Voss, K., Plattner, R., Kubena, K. y Phillips, T. (1997). "Oxidative degradation and detoxification of mycotoxins using a novel source of ozone" *Food and Chemical Toxicology*, 35(8): 807-820.
- McKinley, E. y Carlton, W. (1980). "Patulin mycotoxicosis in the Syrian hamster" *Food and Cosmetics Toxicology*, 18(2): 173-179.
- McKinley, E., Carlton, W. y Boon, G. (1982). "Patulin mycotoxicosis in the rat: toxicology, pathology and clinical pathology" *Food and Chemical Toxicology*, 20(3): 289-300.
- Meister, U. (2001). "Investigations on the change of fumonisin content of maize during hydrothermal treatment of maize. Analysis by means of HPLC methods and ELISA" *European Food Research and Technology*, 213: 187-193.
- Merrill Jr, A., Schmelz, E. Dillehay, D., Spiegel, S., Shayman, J., Schroeder, J., Riley, R., Voss, K. y Wang, E. (1997). "Sphingolipids - the enigmatic lipid class: biochemistry, physiology, and pathophysiology" *Toxicology and Applied Pharmacology*, 142(1): 208-225.
- Merrill Jr, A., Sullards, M., Wang, E., Voss, K., y Riley, R. (2001). "Sphingolipid metabolism: roles in signal transduction and disruption by fumonisinas" *Environmental Health Perspectives*, 109(2): 283-289.

- Mirocha, C., Chen, J., Xie, W., Xu, Y., Abbas, H. y Hogge, L. (1996). "Biosynthesis of fumonisin and AAL derivatives by *Alternaria* and *Fusarium* in laboratory culture", En: *Fumonisin in Food*, Plenum Press 213-224. Editores: Jackson, L., DeVries, J. y Bullerman, L.
- Missmer, S., Suarez, L., Felkner, M., Wang, E., Merrill Jr, A., Rothman, K. y Hendricks, K. (2006) "Exposure to fumonisins and the occurrence of neural tube defects along the Texas-Mexico border" *Environmental Health Perspectives*, 114(2): 237-241.
- Morgavi, D. y Riley, R. (2007). "An historical overview of field disease outbreaks known or suspected to be caused by consumption of feeds contaminated with *Fusarium* toxins" *Animal Feed Science and Technology*, 137: 201-212.
- Morgensen, J., Frisvad, J., Thrane, U. y Nielsen, K. (2010) "Production of Fumonisin B<sub>2</sub> and B<sub>4</sub> by *Aspergillus niger* on grapes and raisins" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(2): 954-958.
- Motta, E. (2005). "Estimación de la exposición a micotoxinas a través de dos técnicas: Ocratoxina A en plasma y biodisponibilidad de fumonisina B<sub>1</sub> en copos de maíz." Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área Industrias. Directores: Resnik, S. y Scott, P.
- Munkvold, G. y Desjardins, A. (1997). "Fumonisin in maize. Can we reduce their occurrence?" *Plant Disease*, 81: 556-565.
- Murphy, P., Hendrich, S., Hopmans, E., Hauck, C., Lu, Z., Buseman, G. y Munkvold, G. (1996). "Effect of processing on fumonisin content of corn" *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 392: 323-334.
- Nelson, P., Desjardins, A. y Plattner, R. (1993). "Fumonisin, mycotoxins produced by *Fusarium* species: biology chemistry, and significance" *Annual Reviews of Phytopathology*, 31: 233-252.
- Noonim, P., Mahakarnchanakul, W., Nielsen, K., Frisvad, J. y Samson, R. (2009). "Fumonisin B<sub>2</sub> production by *Aspergillus niger* in Thai coffee beans" *Food Additives and Contaminants*, 26(1): 94-100.
- Norred, W., Riley, R., Meredith, F., Poling, S. y Plattner, R. (2001). "Instability of N-acetylated fumonisin B<sub>1</sub> (FA1) and the impact on inhibition of ceramide synthase in rat liver slices" *Food and Chemical Toxicology*, 39: 1071-1078.

- Osswald, H., Frank, H., Komitowskia, D. y Winter, H. (1978). "Long-term testing of patulin administered orally to Sprague-Dawley rats and Swiss mice" *Food and Cosmetics Toxicology*, 16(3): 243-247.
- Pagliuca, G., Zironi, E., Ceccolini, A., Matera, R., Serrazanetti, G. y Piva, A. (2005). "Simple method for the simultaneous isolation and determination of fumonisin B<sub>1</sub> and its metabolite aminopentol-1 in swine liver by liquid chromatography-fluorescence detection" *Journal of Chromatography B*, 819(1): 97-103.
- Paster, N., Huppert, D. y Barkai-Golan, R. (1995). "Production of patulin by different strains of *Penicillium expansum* in pear and apple cultivars stored at different temperatures and modified atmospheres" *Food Additives and Contaminants*, 12(1): 51-58.
- Phillips, T. y Hayes, A. (1977). "Effects of patulin on adenosine triphosphatase in the mouse" *Toxicology and Applied Pharmacology*, 42(1): 175-188.
- Phillips, T. y Hayes, A. (1978). "Effects of patulin on the kinetics of substrate and cationic ligand activation of adenosine triphosphatase in mouse brain" *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 205(3): 606-616.
- Piemontese, L., Solfrizzo, M. y Visconti, A. (2005). "Occurrence of patulin in conventional y organic fruit products in Italy y subsequent exposure assessment" *Food Additives and Contaminants*, 22(5): 437-442.
- Piñeiro, M., Miller, J., Silva, G. y Musser, S. (1999). "Effect of commercial processing on fumonisin concentrations of maize-based foods" *Mycotoxin Research*, 15: 2-12.
- Pitt, J. y Hocking, A. (1997). "Fungi and Food Spoilage" Blackie Academic & Professional, London-New York.
- Poling, S. y Plattner, R. (1999). "Rapid purification of fumonisins and their hydrolysis products with solid-phase extraction columns" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 2344-2349.
- Poling, S., Plattner, R. y Weisleder, D. (2002). "N-(1-Deoxy-D-fructos-1-yl) fumonisin B<sub>1</sub>, the initial reaction product of fumonisin B<sub>1</sub> and D-glucose" *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 50(5): 1318-1324.
- Puel, O., Tadriss, S., Galtier, P., Oswald, I. y Delaforge, M. (2005). "*Byssoschlamys nivea* as a source of mycophenolic acid" *Applied and Environmental Microbiology*, 71(1): 550-553.

- Restani, P. (2003). "Dietary patulin and its effects" *Reviews in Food and Nutrition Toxicity*, Cap. 18: 364-399. Ed. Watson, R. y Preedy.
- Rheeder, J., Marasas, W. y Vismer, H. (2002). "Production of fumonisin analogs by *Fusarium* species" *Applied and Environmental Microbiology*, 68(5): 2101-2105.
- Riley, R., Hinton, D. Showker, J., Rigsby, W. y Norred, W. (1990). "Chronology of patulin-induced alterations in membrane function of cultured renal cells, LLC-PK1" *Toxicology and Applied Pharmacology*, 102(1): 128-141.
- Riley, R. y Showker, J. (1991). "The mechanism of patulin's cytotoxicity and the antioxidant activity of indole tetramic acids" *Toxicology and Applied Pharmacology*, 109(1): 108-126.
- Riley, R., Norred, W. y Bacon, C. (1993). "Fungal toxins in foods" *Annual Review of Nutrition*, 13: 167-189.
- Riley, R., Enongene, E., Voss, K., Norred, W., Meredith, F., Sharma, R., Spitsbergen, J., Williams, D., Carlson, D. y Merrill A. (2001) "Sphingolipid Perturbations as Mechanisms for Fumonisin Carcinogenesis" *Environmental Health Perspectives*, 109(2): 301-308.
- Roland, J. y Beuchat, L. (1984) "Biomass and patulin production by *Byssochlamys nivea* in apple juice as affected by sorbate, benzoate, SO<sub>2</sub> and temperature" *Journal of Food Science*, 49(2): 402-406.
- Roll, R., Matthiaschk, G y Korte A. (1990). "Embryotoxicity and mutagenicity of mycotoxins" *Journal of Environmental Pathology Toxicology and Oncology*, 10(1-2): 1-7.
- SAGPyA a. <http://www.sagpya.gov.ar/new/0-0/nuevositio/agricultura/cultivos/granos/pdf/Indicadores%20del%20sector%20maicero%200506%20IU%20F%2024.10.06.pdf>
- SAGPyA b. <http://www.sagpya.gov.ar/new/0-0/programas/dma/publicaciones/perspectivas/Perfiles%20descriptivos/Cadena%20de%20ma%C3%ADz.pdf>
- SAGPyA c. <http://www.sagpya.gov.ar/new/0-0/prensa/publicaciones/maiz/pag20.php>
- Sant'Ana, A., Costa Simas, R., Almeida, C., Cabral, E., Rauber, R., Mallmann, C., Eberlin, M., Rosenthal, A. y Massaguer, P. (2010) "Influence of package, type of apple juice and temperature on the production of patulin by *Byssochlamys nivea* and *Byssochlamys fulva*" *International Journal of Food Microbiology*, 142(1-2): 156-163.

- Sargeant, K., Sheridan, A., O'Kelly J. y Carnaghan, R. (1961). "Toxicity associated with certain samples of groundnuts" *Nature*, 192: 1096-1097.
- Scoop (Scientific Cooperation) (2002). "Assesment of dietary intake of patulin by the population of EU Member States" Reports on tasks for scientific cooperation Task 3.2.8, March 2002.
- Scott, P. (1993). "Fumonisin" *International Journal of Food Microbiology*, 18(4): 257-70.
- Scott, P. y Somers, E. (1968). "Stability of patulin and penicillic acid in fruit juices and flour" *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, 16(3): 483-485.
- Seefelder, W., Hartl, M. y Humpf, H. (2001). "Determination of N-(carboxymethyl)fumonisin B1 in corn products by liquid chromatography/electrospray ionization--mass spectrometry". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 2146-2151.
- Seefelder, W., Knecht, A. y Humpf, H. (2003). „Bound fumonisin B<sub>1</sub>: analysis of fumonisin-B1 glyco and amino acid conjugates by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry" *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 5567-5573.
- Shier, W., Abbas, H. y Badria, F. (1997). "Structure-activity relationships of the corn fungal toxin fumonisin B1: Implications for food safety" *Journal of Natural Toxins* 6: 225-242.
- Sorenson, W., Simpson, J. y Castranova, V. (1985). "Toxicity of the mycotoxin patulin for rat alveolar macrophage" *Environmental Research*, 38(2): 407-416.
- Sorenson, W., Gerberick, G., Lewis, D. y Castranova, V. (1986). "Toxicity of mycotoxins for the rat pulmonary macrophage in vitro" *Environmental Health Perspectives*, 66: 45-53.
- Spadaro, D., Ciavarella, A. Frati, S., Garibaldi, A., Gullino, M. (2007). "Incidence and level of patulin contamination in pure and mixed apple juices marketed in Italy" *Food Control*, 18(9): 1098-1102.
- Speijers, G., Franken, M. y van Leeuwen, F. (1988). "Subacute toxicity study of patulin in the rat: effects on the kidney and the gastrointestinal tract" *Food and Chemical Toxicology*, 26(1): 23-30.
- Stinson, E., Osman, S., Huhtanen, C. y Bills D. (1978). "Disappearance of patulin during alcoholic fermentation of apple juice" *Applied and Environmental Microbiology*, 36(4): 620-622.

- Sydenham, E., Theil, P., Marasas, W., Shephard, G., Van Schalkwyk, D. y Koch, K. (1990). "Natural occurrence of some *Fusarium* mycotoxins in corn from low and high esophageal cancer prevalence areas of Transkei, Southern Africa" *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 38(10): 1900-1903.
- Sydenham, E., Shephard, G. y Thiel, P. (1992). "Liquid chromatographic determination of fumonisins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> and B<sub>3</sub> in foods and feeds" *Journal of AOAC International* 75(2): 313-318.
- Sydenham, E., Thiel, P., Shepard, G., Koch, K. y Hutton, T. (1995). "Preparation and elucidation of the partially hydrolyzed moiety of fumonisin B<sub>1</sub>" *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43(9): 2400- 2405.
- Takeshita K., Shibato J., Sameshima, T., Fukunaga, S., Isobe, S., Arihara, K. e Itoh, M. (2003). "Damage of yeast cells induced by pulsed light irradiation" *International Journal of Food Microbiology*, 85(1-2): 151-158.
- Tangni, E., Theys, R., Mignolety, E., Maudouxz, M., Michelet, J. y Larondelley Y. (2003). "Patulin in domestic y imported apple-based drinks in Belgium: Occurrence and exposure assessment" *Food Additives and Contaminants*, 20(5): 482-489.
- Tashiro, F., Hirai, K. y Ueno, Y. (1979). "Inhibitory effects of carcinogenic mycotoxins on deoxyribonucleic acid-dependent ribonucleic acid polymerase and ribonuclease H." *Applied and Environmental Microbiology*, 38(2): 191-196.
- Thiel, P., Gelderblom, W., Marasas, W., Nelson, P. y Wilson, T. (1986). "Natural occurrence of moniliformin and fusarin C in corn screenings known to be hepatocarcinogenic in rats" *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 34: 773-775.
- Trucksess, M. y Tang Y. (1999). "Solid-phase extraction method for patulin in apple juice y unfiltered apple juice" *Journal of AOAC International*, 82(5): 1109-1113.
- Valle-Algarra, F., Mateo, E., Gimeno-Adelantado, J., Mateo-Castro, R. y Jiménez, M. (2009). "Optimization of clean-up procedure for patulin determination in apple juice and apple purees by liquid chromatography" *Talanta*, 80(2): 636-642.
- van Egmond, H. (1989). "Current situation on regulations for mycotoxins. Overview of tolerances and status of standard methods of sampling and analysis" *Food Additives and Contaminants: Part A*, 6(2): 139-188.

- Wang, E., Norred, W., Bacon, C., Riley, R. y Merrill, A. (1991). "Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins. Implications for diseases associated with *Fusarium moniliforme*." *Journal of Biological Chemistry*, 266(22): 14486-14490.
- Watanabe, M. y Shimizu, H. (2005). "Detection of patulin in apple juices marketed in the Tohoku district, Japan" *Journal of Food Protection*, 68(3): 610-612.
- Welke, J., Hoeltz, M., Dottori, H. y Noll, I. (2009). "Effect of processing stages of apple juice concentrate on patulin levels" *Food Control*, 20(1): 48-52.
- Welke, J., Hoeltz, M., Dottori, H. y Noll, I. (2010). "Fungi and patulin in apples and the role of processing on patulin levels in juices: A study on naturally contaminated apples" *Journal of Food Safety*, 30(2): 276-287.
- Wheeler, J., Harrison, M. y Koehler P. (1987). "Presence and stability of patulin in pasteurized apple cider" *Journal of Food Science*, 52(2): 479-480.
- WHO [World Health Organization] (2000). Fumonisin B<sub>1</sub> (Environmental health criteria 219). International programme on chemical safety. Geneva: World Health Organization; 2000.
- WHO [World Health Organization] (2002). Technical Report Series. Evaluation of certain mycotoxins in food, Fifty-sixth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. WHO Technical Report. Series 906, 916-926.
- Wilson, B. y Maronport, R (1971) "Causative fungus agent of leukoencephalomalacia in equine animals" *Veterinary Record*, 88(19): 484- 486.
- Wilson, T., Nelson, P. y Knepp, C. (1985). "Hepatic neoplastic nodules, adenofibrosis, and cholangiocarcinomas in male Fischer rats fed corn naturally contaminated with *Fusarium moniliforme*". *Carcinogenesis*, 6: 1155-1160.
- Wilson, T., Nelson, P., Marasas, W., Thiel, P., Shephard, G., Sydenham, E., Nelson, H. y Ross, P. (1990). "A mycological evaluation and in vivo toxicity evaluation of feed from 41 farms with equine leukoencephalomalacia" *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 2: 352-354.

# **ANEXOS**

### Muestras analizadas en el estudio de la ocurrencia natural de patulina

Fecha	NºMuestra	Muestra LAA	Peso (g)	Factor	Patulina µg/Kg	Producto	Marca Comercial	Datos del envase
20/03/2007	8772	<b>1356</b>	10,4955	0,095278929	ND	Mermelada de manzana	Dulciora	01/12/2006 094 17:06 Dulciora SA V.Mercedes (SL)
20/03/2007	8773	<b>1357</b>	9,772	0,102333197	ND	Mermelada de manzana	Dulciora	01/12/2006 094 17:07 Dulciora SA V.Mercedes (SL)
							Dulciora	01/12/2006 094 17:08 Dulciora SA V.Mercedes (SL)
20/03/2007	8774	<b>1359</b>	11,9968	0,083355561	ND	Mermelada de manzana	Dulciora	01/12/2006 094 17:09 Dulciora SA V.Mercedes (SL)
20/3/2007	8775	<b>1360</b>	10,6591	0,093816551	ND	Mermelada de manzana	Dulciora	15/09/2006 017 07:11 Dulciora SA V.Mercedes (SL)
20/03/2007	8776	<b>1361</b>	10,1816	0,09821639	ND	Mermelada de manzana	Arcor	15/12/2007 350 12:50 Arcor SAIC Arroyito Cordoba
20/03/2007	8777	<b>1362</b>	11,3547	0,088069258	ND	Mermelada de manzana	Cabaña Mico	15/06/08 lote 3811 Cabaña Mico, I. Malvinas El Bolsón sin conservantes
20/03/2007	8778	<b>1363</b>	9,8457	0,101567182	ND	Mermelada de manzana	Alimentos Natali	15/06/07 lote 390 Al. Natali, Paso del Rey (BA) Mermelada Diet
20/03/2007	8779	<b>1364</b>	11,0992	0,090096584	ND	Jalea de manzana	LAA	Sin datos
20/03/2007	8780	<b>1365</b>	9,8158	0,101876566	ND	Mermelada de manzana	LAA	Sin datos
22/03/2007	8781	<b>1366</b>	10,0896	0,123889946	ND	Mermelada de manzana	Alimentos Natali	18/07/07 Lote 1208 Alimentos Natali, Paso del Rey (BA)
16/04/2007	8828	<b>1367</b>	14,5715	0,068627115	2	Pure de manzana	Gentleman	06/05/2009 L 13:27 Alimentos Wasil SA Quilicura-Chile
22/03/2007	8782	<b>1368</b>	10,5422	0,118571076	22	Pure de manzana	Canale	30/06/08 L 98 12:15 Redepa S.A, Lavallol (BA)
22/03/2007	8783	<b>1433</b>	11,8962	0,093400507	ND	Mermelada de manzana	El Kapé	28/06/2008 Peccin Andrea Gualeguaychú
22/03/2007	8784	<b>1493</b>	10,4906	0,112145215	32	Mermelada de manzana y anana	Nueva era	Producto regional y artesanal
22/03/2007	8785	<b>1494</b>	11,4964	0,133821156	ND	Mermelada de pera	Nueva era	Producto regional y artesanal
22/03/2007	8786	<b>1495</b>	10,1981	0,115361743	ND	Mermelada de manzana y kiwi	Nueva era	Producto regional y artesanal
22/03/2007	8787	<b>1496</b>	9,7512	0,102551481	ND	Mermelada de manzana y zanahoria	Nueva era	Producto regional y artesanal
22/03/2007	8788	<b>1497</b>	9,5883	0,104293775	ND	Mermelada de manzana y rosas	Nueva era	Producto regional y artesanal
22/03/2007	8789	<b>1498</b>	13,5836	0,073618187	ND	Mermelada de manzana	Alimentos Natali	15/11/06 lote 340 Alimentos Natali, Paso del Rey (BA) Mermelada Diet
22/03/2007	8790	<b>1499</b>	11,2657	0,088765012	ND	Mermelada de manzana	Alimentos Natali	15/05/07 lote 370 Alimentos Natali, Paso del Rey (BA) Mermelada Diet
22/03/2007	8791	<b>1500</b>	10,9218	0,091559999	ND	Mermelada de manzana	Alimentos Natali	23/01/08 lote 1227 Alimentos Natali, Paso del Rey (BA)
22/03/2007	8792	<b>1501</b>	9,4866	0,105411844	ND	Mermelada de pera	Alimentos Natali	17/02/08 lote 2100 Alimentos Natali, Paso del Rey (BA)
22/03/2007	8793	<b>1502</b>	9,3831	0,106574586	18	Mermelada de manzana	Arcor	01/06/2008 158 00:11 Arcor SAIC Arroyito Cordoba
22/03/2007	8794	<b>1503</b>	13,1738	0,075908242	3	Mermelada de manzana	Arcor	15/07/2007 208 20:41 Arcor SAIC Arroyito Cordoba
29/03/2007	8810	<b>1504</b>	10,4529	0,095667231	ND	Pure de manzana	Canale	07/07/08 L 98 20:15 Redepa S.A, Lavallol (BA)
29/03/2007	8811	<b>1505</b>	10,2086	0,097956625	17	Mermelada de manzana	El Kapé	21/09/2008 Peccin Andrea Gualeguaychú
29/03/2007	8812	<b>1506</b>	11,3937	0,087767802	ND	Chutney de manzanas verdes	Mulla	10/2007 Susana Gab, San Francisco Cordoba
29/03/2007	8813	<b>1507</b>	13,062	0,076557954	25	Dulce de pera	Dulce Mama	Elab 08/01/06 Mabel Rodea, Chascomus. Elab. Artesanal
29/03/2007	8814	<b>1508</b>	9,9365	0,100639058	ND	Mermelada de manzana	Dos Fronteras	Venc 08/2007
29/03/2007	8815	<b>1509</b>	10,8035	0,092562595	ND	Jalea de manzana	La casa de azucar	Venc. 06/02/08 Patricia Marchetti, Necochea Mermelada Artesanal
04/10/2007	8816	<b>1511</b>	11,1188	0,089937763	ND	Mermelada de manzana	Dulcor	Dulcor S.A. 24/10/08 L316 Arroyito Cordoba
04/10/2007	8817	<b>1512</b>	12,7733	0,078288305	ND	Jalea de manzana	Frutas del Sur	Frutandina S.A. Env 05/04 Lote 0408 El Bolson, Rio Negro
16/04/2007	8826	<b>1513</b>	19,5259	0,051214029	ND	Manzanas en almibar	El Chucupal	El Chucupal S.R.L. 08/09 Dto El Carmen Jujuy

04/10/2007	8818	<b>1514</b>	9,7479	0,102586198	ND	Manzana natural fruta untable	Estancias Rama	Est. Rama SA 11/08 Lote 11/05 Valle de Pancanta (SL)
04/10/2007	8819	<b>1515</b>	11,7135	0,08537158	ND	Jalea de manzana	Dulceria Suiza	B. Nina von Rennenkampf, 07/01/09 Bariloche
04/10/2007	8820	<b>1516</b>	9,3948	0,106441861	ND	Dulce de manzana	Granja Dagorret	Norberto J. Dagorret 12/07 Chascomus
04/10/2007	8821	<b>1517</b>	11,955	0,08364701	ND	Jalea de manzana	Ruth Lager	Elab 02/06 lote 07 partida 002 Venado Tuerto, Santa Fe
04/10/2007	8822	<b>1518</b>	10,252	0,097541943	ND	mermelada de pera	Raulito	Productos Raulito SRL venc 27/08/07 Cordoba
04/10/2007	8823	<b>1519</b>	11,3843	0,087840271	ND	Jalea de manzana	Los Fundadores	venc 16/06/08 Colonia Suiza Uruguay
04/10/2007	8824	<b>1520</b>	11,0143	0,090791063	ND	Dulce de manzana	Cabaña Mico	Cabaña Mico El Bolsón (RN) venc 23/06/10 Lote 3912
04/10/2007	8825	<b>1521</b>	9,7948	0,102094989	ND	Dulce de manzana	S/N	S/N
16/04/2007	8827	<b>1522</b>	10,2303	0,097748844	84	Pure de manzana	La costeña	Conservas La costeña SA Tulpletac-México ven.11/08/08 L3OP
16/04/2007	8829	<b>1523</b>	10,28	0,097276265	39	Mermelada de manzana	Dulcinora	Dulcinora S.A. V. Mercedes San Luis 01/01/07 129 14:50
21/05/2007	8849	<b>1525</b>	9,8673	0,135126461	ND	Mermelada de pera	Mama Rosa	Establec. Mamma Rosa, Las Heras (Mza) Venc. 06/2007
21/05/2007	8850	<b>1526</b>	9,8623	0,101396226	22	Mermelada de manzana	Noel	Arcor SAIC, Arroyito Cordoba, 01/03/2008 074 21:56
21/05/2007	8851	<b>1527</b>	11,899	0,084040676	ND	Mermelada de pera	Natali	Alimentos Natali, Paso del Rey (BA)
21/05/2007	8852	<b>1528</b>	10,2048	0,130657468	34	Mermelada de manzana	Arcor	Arcor SAIC, Arroyito Cordoba, 15/07/2008 209 09:06
21/05/2007	8853	<b>1529</b>	14,3864	0,069510093	221	Pure de manzana	Canale	Redepa SA, San Rafael Mendoza, 08/06/08 L98 13:21
25/06/2007	8854	<b>1532</b>	9,3691	0,106733838	5	Pure de manzana	Canale	Redepa SA, San Rafael Mendoza, 08/06/08 L98 13:22
25/06/2007	8855	<b>1533</b>	10,1604	0,098421322	165	Pure de manzana	Canale	Redepa SA, San Rafael Mendoza, 08/06/08 L98 13:16
25/06/2007	8856	<b>1534</b>	10,4313	0,095865328	ND	Pure de manzana	Canale	Redepa SA, San Rafael Mendoza, 08/06/08 L98 13:22

## Muestras del estudio de molienda húmeda de maíz escala planta piloto

CIM	Maíz				Almidón				Gluten				Gemen				Fibra				Aguas de maceracion				Aguas de lavado			
	No	FB1	FB2	FB3	Totales	FB1	FB2	FB3	Totales	FB1	FB2	FB3	Totales	FB1	FB2	FB3	Totales	FB1	FB2	FB3	Totales	FB1	FB2	FB3	Totales	FB1	FB2	FB3
3147	4388,7	1682,3	314,7	6385,7	ND	ND	ND	ND	5,32	10,21	1,42	16,95	901,54	614,07	112,37	1627,98	890,56	141,23	21,94	1053,73	153,04	17,21	7,33	177,58	376,01	133,88	50,91	560,80
3148	5306,1	1896,9	473,2	7676,2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	243,14	147,30	17,12	407,56	ND	ND	ND	ND	48,50	ND	ND	48,50	ND	ND	ND	ND
3149	4406,2	1679,9	433	6519,1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	41,31	30,08	10,29	81,68	2,36	11,44	ND	13,80	64,48	ND	ND	64,48	32,65	ND	ND	32,65
3150	2435,4	496,6	173	3105,0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	2,10	ND	ND	2,10	ND	ND	ND	ND
3174	2949,3	1480,5	340,7	4770,5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	804,38	ND	ND	804,38
3175	2146,2	953,6	177	3276,8	93,56	2,98	0,00	96,54	0,16	ND	ND	0,16	1017,67	819,18	72,83	1909,68	53,32	44,88	ND	98,20	1337,96	32,05	ND	1370,01	2,53	ND	ND	2,53
3176	1183,3	513	139	1835,3	ND	ND	ND	ND	0,26	0,32	0,00	0,58	319,40	556,88	ND	876,28	ND	ND	ND	ND	5,45	1,37	ND	6,82	ND	ND	ND	ND
3177	4994,8	3106,8	594,5	8696,1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	176,06	219,10	42,10	437,26	ND	ND	ND	ND	4047,67	204,29	102,60	4354,56	7,35	ND	ND	7,35
3178	5155,4	2232,5	699	8086,9	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1,65	1,72	ND	3,37	ND	ND	ND	ND	112,01	488,16	52,11	652,28	3,83	3,52	0,31	7,66
3179	11698,1	5197,1	1229,7	18124,9									1594,19	1361,09	123,67	3078,95	195,22	155,11	ND	350,33	34,97	5,69	0,94	41,60	24,71	18,91	0,91	44,53
3180	11733,6	5499,6	1378,3	18611,5	0,09	ND	ND	0,09	ND	ND	ND	ND	159,16	120,34	20,36	299,86	201,20	37,22	13,25	251,67	0,74	ND	ND	0,74	2,56	ND	ND	2,56
3181	6843	3863,3	897,6	11603,9	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	744,25	762,91	60,90	1568,06	719,54	89,99	14,47	824,00	2315,12	520,46	89,37	2924,95	293,80	249,63	ND	543,43
3182	9963,8	4739,2	1274,6	15977,6	ND	ND	ND	ND	0,28	0,48	ND	0,76					ND	ND	ND	ND					43,44	20,99	3,20	67,63
3183	5337,4	2461,8	684,6	8483,8	ND	ND	ND	ND	0,15	0,21	ND	0,36	4639,58	516,71	78,48	5234,77	ND	ND	ND	ND	10,04	3,06	ND	13,10	ND	ND	ND	ND
3184	12879,7	6742,2	1511,1	21133,0	ND	ND	ND	ND	0,64	ND	ND	0,64	0,95	1,06	ND	2,01	0,27	ND	ND	0,27	19,62	4,49	1,97	26,08				
3185	10163,9	5584,4	1077,6	16825,9	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,43	ND	0,47	0,90	0,33	ND	ND	0,33	5,32	1,44	ND	6,76	8,07	4,21	ND	12,28
3186	10769,7	6005,1	1335,4	18110,2	ND	ND	ND	ND	0,22	0,42	ND	0,63	2,68	2,04	ND	4,72	0,36	0,49	ND	0,85	6,12	0,98	ND	7,10	4,38	ND	ND	4,38
3187	7029,9	4005,1	1342,3	12377,3	ND	ND	ND	ND	0,39	1,04	ND	1,43	4,91	1,17	4,93	11,01	0,26	ND	ND	0,26	18,48	5,16	0,71	24,35				ND
3189	11217,4	6058,6	1344,8	18620,8	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1,88	2,49	ND	4,37	0,38	0,54	ND	0,92	8,20	2,28	ND	10,48				ND
3190	2213,3	954,8	240,5	3408,6	ND	ND	ND	ND	14,29	6,48	ND	20,77	43,74	22,05	5,05	70,84	3,78	5,28	ND	9,06	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
3191	9376,5	4621,7	866,5	14864,7	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	797,02	795,26	106,54	1698,82	ND	ND	ND	ND	226,58	15,34	ND	241,92	213,01	56,16	ND	269,17
3192	619,8	242,5	30,7	893,0	ND	ND	ND	ND	8,13	7,80	2,50	18,43	86,20	84,58	9,37	180,15	10,18	9,16	2,97	22,31	43,87	ND	ND	43,87	ND	ND	ND	ND
3193	3047,3	1180,2	186,7	4414,2	1,12	ND	ND	1,12	6,47	13,69	2,60	22,76	126,94	122,18	16,06	265,18	22,14	27,68	12,37	62,19	47,76	ND	ND	47,76	469,60	118,11	29,48	617,19
3203	1268	594,6	153,3	2015,9	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	42,21	ND	ND	42,21	4,36	ND	ND	4,36	ND	ND	ND	ND	39,45	ND	ND	39,45
3204	437	150,3	61,4	648,7	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,56	ND	ND	0,56	ND	ND	ND	ND	ND
3211	1548,9	538,6	86,7	2174,2	ND	ND	ND	ND	0,25	ND	ND	0,25	5,60	3,89	1,76	11,25	0,32	ND	ND	0,32	13,60	3,92	0,52	18,04	3,44	2,20	ND	5,64
3212	1313,7	568,4	119	2001,1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
3215	1885	771	209,9	2865,9	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	47,28	119,87	4,41	171,56	279,29	26,07	ND	305,36	679,78	39,03	ND	718,81	ND	ND	ND	ND
3216	1062,4	560	128,5	1750,9	ND	ND	ND	0,11	ND	ND	ND	ND	0,34	ND	ND	0,34	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,00	0,18	ND	ND	0,18
3217	1778	904,3	220,9	2903,2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,13	ND	ND	0,13	ND	ND	ND	ND	0,31	ND	ND	0,31	ND	ND	ND	ND
3218	1547,3	685,1	212,8	2445,2	ND	ND	ND	ND	0,05	ND	ND	0,05	0,11	ND	ND	0,11	ND	ND	ND	ND	0,78	ND	ND	0,78	ND	ND	ND	ND
3219	2465,8	772,6	379,6	3618,0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,36	0,95	ND	1,31	0,06	ND	ND	0,06	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
3220	1299,1	564,2	204,4	2067,7	0,04	ND	ND	0,04	ND	ND	ND	ND	0,31	ND	ND	0,31	0,44	ND	ND	0,44	2,17	ND	ND	2,17	3,00	ND	ND	3,00
3221	1065,8	694,2	92,3	1852,3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,00	ND	ND	ND	ND	2,77	0,73	ND	3,50	ND	ND	ND	ND

### Muestras del estudio de molienda húmeda de maíz escala planta insdustrial

	FB <sub>1</sub>									FB <sub>2</sub>								
	Maíz	Germen de maíz	Gluten meal	Gluten feed	Fibra Húmeda sin agua de maceración	Fibra Húmeda más agua de maceración	Suspensión de almidón 16 hs	Suspensión de almidón 19 hs	Agua de Maceración	Maíz	Germen de maíz	Gluten meal	Gluten feed	Fibra Húmeda sin agua de maceración	Fibra Húmeda más agua de maceración	Suspensión de almidón 16 hs	Suspensión de almidón 19 hs	Agua de Maceración
Tanque 1401 14-07-04 Lab Acevedo 05-13	7929	1133	3520	1020						3217	1211	5298	224					
Tanque 1401 N 09-08-04	1548,03	1453,92	ND	1226,8			205,44	60,76		385,7	352,36	ND	868,7			ND	ND	
Tanque M 17-09-04	6139,4	1673,7	2301,8		855,7	518,3	96,42		622,3	2673,9	2360,5	3919,2		797,1	175,2	ND		225
Tanque JyQ 17-09-04	4625,6	2095,2	2730,7	1241,3	622,5		ND		0	1861,45	2195,6	4328,1	281,9	2087,7		ND		ND
Tanque N 25-09-05	5566,6	1307	2011,3	1131,1	1091,3		ND		464,9	2024,3	1604,6	2856,7	267,2	1149,2		ND		147,9
Tanque 2y6 28-09-04	5498,45	911,5	1417,5		209,2		ND		770,4	1819,55	1043,4	2418,1		ND		ND		187,4
Tanque 4y8 05-10-04	1615,85	763,7	2184,1		414,5		ND		711,9	681,45	738,8	2336,7		404,8		ND		168,7
Tanque JyQ 05-10-04	6491,1	1061,1	2049,8	1233,8	343,4		ND		616,4	2622,7	991,3	3593,6	353,4	364,8		ND		176,6
Tanque N 10-10-04	7899,1	1537,4	1357,9		418,6		ND		762,6	3301,7	2022,6	2612,4		518,1		ND		196,7
Tanque 4y8 14-10-04	5735,55	886,2	1934		254	3591,3	ND		781	2170	833,9	3020		323	659,9	ND		188,4
Tanque L 16-10-04	2602	861,1	2104,9		496,3	2279,3	ND		477,1	1014,4	1021,1	3293,5		657,1	491,8	ND		ND

Tanque J y K 14-12-04	5373,5	882	2405	2648	358		ND		2079	1878	827	3506	143	323		ND		ND
Tanque Q 03-01-05	9995,5	2534,4	646,5	649,7	139,1		ND		319,2	3888,9	2497	1554,8	218,7	326,8		ND		ND
Tanque 1401-2 y 6 17-12-04	7450,1	1463,1	3166,2	ND	262,9				ND	2830,15	1694,4	4520,6	ND	463,4				ND
Tanque 1401-3 y 7 04-01-05	6872,15	334,7	2076,3	ND	610,4		ND		416,1	2087,8	610,7	3341,4	ND	759,7		ND		ND
Tanque M 10-01-05	7057,7	2584,7	ND	ND	ND		ND		221,7	2439,8	4147,4	ND	ND	ND		ND		183
Tanque M 24-01-05	14286,6	1289,9	1937,5	870,3	353,5		98,25		363,4	6199,7	4611,13	2506,3	545,9	780,8		198,2		347,3
Tanque 1401 K 17-09-04	3460,5	656,7	2075		427,6	180,8	ND		507,8	1405,8	903,4	3064,8		422,4	189,9	ND		147,2