



**Universidad
Zaragoza**



**UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
FACULTAD DE VETERINARIA**

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Máster en Iniciación a la Investigación en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

Septiembre 2012

**Inhibición del crecimiento y de la biosíntesis de micotoxinas
de mohos del Gº *Fusarium* mediante el uso de ácidos fenólicos**

Trabajo presentado por: JONATHAN MACANCELA QUIÑONEZ

Departamento: Producción Animal y Ciencia de los Alimentos

Área: Nutrición y Bromatología

Tutores: Dr. AGUSTÍN ARIÑO MONEVA

Dra. MARTA HERRERA SÁNCHEZ

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quería agradecer a mi profesor/tutor Dr. Agustín Ariño Moneva por confiar en mí y darme la oportunidad de formar parte de su equipo de investigación, por su tiempo dedicado y los conocimientos que me ha transmitido, así como a mi tutora Dra. Marta Herrera Sánchez por su ayuda con el trabajo y la presente Memoria. De la misma forma quedo agradecido, a todos los compañeros y equipo de investigación que con su apoyo de forma incondicional han hecho posible el presente trabajo fin de máster.

Por otra parte agradecer también al Gobierno de Aragón (DGA Grupo Consolidado de Investigación A01/2011) y al MICINN (Proyecto AGL2011-26808), que gracias a su financiación ha hecho posible mi pequeño aporte en estos grandes proyectos.

Y como no agradecer a mis familiares y amigos, en especial a mi madre que con su confianza, apoyo y ejemplo de superación ha hecho de mí la persona que soy ahora.

RESUMEN

El maíz es uno de los principales cereales contaminados por micotoxinas, sobre todo, las producidas por especies fitopatógenas de mohos del género *Fusarium*, que son hongos ubicuos comunes del suelo y que contaminan el maíz en campo. Estos mohos tienen la capacidad para sintetizar toxinas cuando los cereales están todavía en el campo, así como durante su almacenamiento post-cosecha, sobre todo cuando los granos no son suficientemente desecados después de la cosecha y cuando se producen abusos de temperatura y humedad. Las principales micotoxinas producidas por las especies toxigénicas de *Fusarium* son: tricotecenos como deoxinivalenol, toxinas T-2 y HT-2, así como fumonisinas (FB1 y FB2) y zearalenona. Estas toxinas son potencialmente peligrosas tanto para el ser humano como para los animales de granja provocando intoxicaciones alimentarias denominadas micotoxicosis.

La infección por *Fusarium* en grano progresa desde el exterior al interior del grano, pero esto puede estar limitado por la presencia de barreras físicas y ciertos componentes químicos como los ácidos fenólicos que se encuentran en su parte externa. Algunos autores han investigado anteriormente la capacidad *in vitro* que tienen algunos ácidos fenólicos de inhibir el crecimiento fúngico y la síntesis de algunas micotoxinas, como aflatoxinas y de algunos tricotecenos tipo B. Sin embargo no hay datos en la bibliografía disponible sobre la inhibición de toxinas de *Fusarium* como fumonisinas y zearalenona en grano de maíz. Por lo tanto uno de los objetivos de este estudio es evaluar *in vitro* el efecto de los ácidos fenólicos sobre el crecimiento y producción de micotoxinas en maíz.

En el presente trabajo, las especies *F. verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. graminearum* (y su teleomorfo *G. zeae*), *F. sporotrichioides* y *F. langsethiae* se han mostrado sensibles a los ácidos fenólicos ensayados (cafeico, clorogénico, ferúlico y *p*-cumárico) en concentraciones de 0,5 a 10 mM, ya que se ha reducido su tasa de crecimiento con porcentajes de inhibición de hasta 100% dependiendo de la cepa, el ácido fenólico y la dosis utilizada. Sin embargo, los ensayos en grano de maíz con ácidos fenólicos a concentraciones inhibitorias, indican que la capacidad de biosíntesis de micotoxinas no se ve afectada significativamente, con algunas excepciones.

ÍNDICE

1.Introducción	1-2
1.1.Objetivos	3
2.Revisión bibliográfica.....	4-17
2.1. Micotoxinas.....	4-7
2.1.1. Fumonisinass.....	7-8
2.1.2. Zearalenona	9-10
2.1.3. Tricotecenos	10-11
2.1.3.1. Deoxinivalenol.....	11-12
2.1.3.2. Toxinas T-2 y HT-2	12
2.2. Ácidos fenólicos.....	13-14
2.3. Métodos de análisis de micotoxinas	15-17
3.Material y métodos	18-27
3.1. Estudio de la inhibición del crecimiento de especies toxigénicas de <i>Fusarium</i> por adición de ácidos fenólicos	18-21
3.2. Estudio de la inhibición de la biosíntesis de micotoxinas de <i>Fusarium</i> por adición de ácidos fenólicos.....	21-27
4.Resultados y discusión.....	28-38
4.1. Resultados.....	28-36
4.1.1. Efecto de los ácidos fenólicos sobre el crecimiento de las especies toxigénicas de <i>Fusarium</i>	28-32
4.1.2. Efecto de los ácidos fenólicos sobre la biosíntesis de micotoxinas de <i>Fusarium</i>	33-36
4.2. Discusión.....	37-38
5.Conclusiones.....	39-40
6.Bibliografía.....	41-45
7.Anexos.	

1. INTRODUCCIÓN

Los cereales son las principales materias primas afectadas por micotoxinas, especialmente el maíz (*Zea mays L.*) que es una matriz muy susceptible a la contaminación fúngica tanto en la cosecha, post-cosecha, manipulación, almacenamiento y durante su transformación en alimentos y piensos (Farnochi *et al.*, 2005). La Organización para la Agricultura y Alimentación de las Naciones Unidas (FAO, 2004) ha estimado que aproximadamente cada año un 25% de los cultivos alimentarios a nivel mundial están contaminados por micotoxinas, causando una disminución en la calidad y rendimiento de las cosechas, lo que se traduce en importantes pérdidas económicas, así como una reducción en la producción animal y problemas de salud debido a su toxicidad (Magan *et al.*, 2004).

Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidas por hongos toxigénicos que se desarrollan en productos vegetales y son tóxicos para los seres humanos y animales, lo que explica la gran preocupación de las industrias alimentarias y de piensos en la **prevención de su entrada en la cadena alimentaria**. Los mohos y sus micotoxinas afectan negativamente a los alimentos elaborados cuando se usan materias primas contaminadas, ya sean vegetales contaminados o productos de origen animal procedentes de animales alimentados con piensos contaminados (Jean, 2007).

Los mohos toxigénicos los podemos clasificar en dos grupos: mohos de campo y mohos de almacenamiento. Los mohos de campo incluyen las especies que pertenecen al género *Fusarium* e invaden los granos antes de la recolección, de ahí el importante papel de la prevención en campo durante el desarrollo del maíz. Los mohos de almacenamiento que comprenden un pequeño número de especies pertenecientes a los géneros *Aspergillus*, *Eurotium* y *Penicillium*, invaden el grano durante su almacenamiento y son los principales responsables del deterioro de los cereales y piensos (Soriano *et al.*, 2007).

Las especies fitopatógenas del género *Fusarium* son muy importantes desde el punto de vista agroalimentario, ya que pueden causar enfermedades en la mayoría de los cereales, principalmente en maíz pudiendo afectar también a otros vegetales y frutas. Son especies ubicuas que se encuentran ampliamente distribuidas tanto en suelos como en sustratos orgánicos (Soriano *et al.*, 2007). Su importancia no se debe tan sólo a la pérdida de las cosechas, sino también a la producción de micotoxinas. Entre las toxinas

producidas por este género se encuentran los tricotecenos -deoxinivalenol (DON), nivalenol (NIV), toxinas T-2 y HT-2-, la zearalenona (ZEA) y las fumonisinas (FB1 y FB2) (Sanchis *et al.*, 2000). **Estas micotoxinas constituyen una familia de toxinas de gran interés para la agricultura y la seguridad alimentaria, así como también en la salud de los animales** (Glenn, 2007).

En el año 2006, se publicó el Reglamento CE nº 1881/2006 (modificado por el Reglamento CE nº 1126/2007) por el que se establecieron los contenidos máximos tolerables de las toxinas de *Fusarium* en cereales y derivados. Estas normativas ponen de manifiesto el interés que existe por estas toxinas, en la salud de los consumidores. En la actualidad, la mejor manera para reducir o evitar la contaminación de los cereales por toxinas de *Fusarium* **es su prevención**, que es esencial, ya que hay pocas formas de superar por completo los problemas producidos por estas micotoxinas una vez están presentes (Pierre, 2007).

Diferentes estudios han demostrado que en los granos infectados por *Fusarium* tanto el micelio del hongo como las toxinas residen principalmente en las cubiertas externas del grano maduro. Esto sugiere que la infección progresa desde el exterior del grano al interior y que la penetración de hongos en el endospermo puede estar limitada por barreras físicas y **ciertos componentes químicos de las partes externas del grano**. Entre estos componentes químicos se encuentran los **ácidos fenólicos** que están presentes de forma natural principalmente en las partes externas del grano como el pericarpio y la capa de aleurona (Ruiz *et al.*, 2008); también se han encontrado en el endospermo y embrión aunque en menor cantidad (Jing y Giusti, 2005). En este sentido, los ácidos fenólicos podrían ser buenos candidatos en cuanto a la inhibición del crecimiento fúngico y la síntesis de algunas micotoxinas como ha sido demostrado *in vitro* para aflatoxinas de *Aspergillus* (Nesci *et al.*, 2009) y tricotecenos tipo B de *Fusarium* (Atanasova-Penichon *et al.*, 2008; Boutigny *et al.*, 2009 y 2010).

Además el interés público por la disminución del uso de agentes químicos sintéticos en la industria agroalimentaria ha llevado a la búsqueda de **fungicidas alternativos de origen natural**, para el control de mohos toxigénicos (Sanchis *et al.*, 2000).

1.1. OBJETIVOS

Por todo lo expuesto anteriormente, en el presente trabajo se persiguen los siguientes objetivos:

1º) Puesta a punto de un método de determinación *in vitro* de la inhibición del crecimiento de *Fusarium* spp. por adición de ácidos fenólicos.

2º) Puesta a punto de un método de determinación *in vitro* de la inhibición de la biosíntesis de micotoxinas de *Fusarium* spp. mediante la adición de ácidos fenólicos.

3º) Evaluación *in vitro* del efecto de los ácidos fenólicos (cafeico, clorogénico, ferúlico y *p*-cumárico.) sobre el crecimiento y producción de micotoxinas (fumonisinas, deoxinivalenol y zearalenona) por las especies de *F. verticillioides*, *F. graminearum*, *F. sporotrichioides*, *F. proliferatum* y *F. langsethiae*.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. MICOTOXINAS

Las micotoxinas, que deriva de las palabras griegas *mikes* y *toxina* que significan hongo y veneno respectivamente, son compuestos provenientes del metabolismo secundario de los hongos, cuya síntesis se produce cuando la fase de crecimiento llega a su etapa final y durante la fase estacionaria (Figura 1).

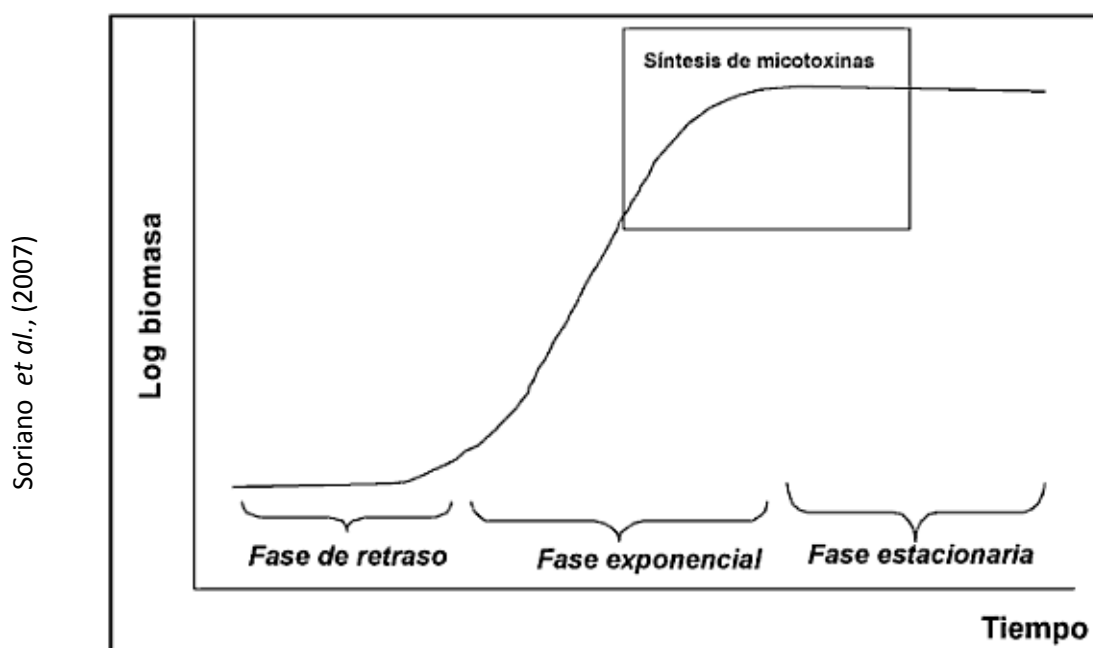


Figura1. Fase de crecimiento fúngico y localización de la síntesis de micotoxinas

Las micotoxinas afectan a un amplio rango de productos agrícolas, incluyendo cereales, frutos secos, granos de café, semillas oleaginosas y especias, los cuales son la base de la economía de muchos países en desarrollo. Estos cultivos son susceptibles a la contaminación por hongos y por tanto, a la producción de micotoxinas.

Los mohos productores de micotoxinas pueden invadir la materia vegetal en el campo antes de la cosecha, en la post-cosecha, manipulación, almacenamiento y durante su transformación en alimentos y piensos. En el caso de los cereales podemos distinguir entre una micobiota de campo que incluye los géneros *Fusarium*, *Alternaria*, *Cladosporium* y *Drechslera*, que requieren un alto contenido de humedad para crecer (22-25%), e invaden los granos antes de la recolección, de ahí el importante papel de la **prevención en campo durante el desarrollo del maíz**. Por otro lado, la micobiota de

almacenamiento comprende un pequeño número de especies pertenecientes a los géneros *Aspergillus*, *Eurotium* y *Penicillium*. Su característica común es que son capaces de crecer con contenidos de humedad bajos y alta presión osmótica. Son los principales responsables del deterioro de los cereales y piensos almacenados (Soriano *et al.*, 2007).

Si bien los fusarios son tradicionalmente considerados hongos de campo, no se debe olvidar su capacidad para sintetizar toxinas en cereales almacenados, sobre todo en malas condiciones de almacenamiento cuando los granos no son suficientemente desecados después de la cosecha y cuando se producen abusos de temperatura. No en vano, *Fusarium verticillioides* es de los fusarios más xerófilos, capaz de sintetizar fumonisinas con valores de actividad de agua (a_w) de 0.93 (Marin *et al.*, 2004).

Algunos mohos del género *Fusarium* sintetizan diversos tipos de micotoxinas como fumonisinas (ej. fumonisina FB1, FB2, FB3), tricotecenos (ej. deoxinivalenol, toxina T-2, toxina HT-2) y zearalenona. Además de estas toxinas, *Fusarium* puede sintetizar de manera esporádica otras micotoxinas como moniliformina, beauvericina y fusaproliferina. En la tabla 1 se muestran las especies de *Fusarium* productoras de micotoxinas más importantes desde el punto de vista agroalimentario, así como su forma teleomórfica o sexual, los principales cultivos afectados y su ubicación geográfica.

El crecimiento fúngico y la producción de micotoxinas por parte de mohos micotoxigénicos depende de la interacción de varios factores, como los biológicos, medioambientales y los relacionados con la cosecha, almacenamiento y procesado de los cereales. El conocimiento de estos factores es muy importante para la predicción y el control de la entrada de micotoxinas en la cadena alimentaria.

Uno de los factores más influyentes son las condiciones climáticas. Los climas cálidos con mucha humedad ambiental, así como las precipitaciones abundantes antes de la cosecha, favorecen la proliferación de los mohos y posterior biosíntesis de micotoxinas.

Entre los factores biológicos se encuentra el daño producido por insectos. Los insectos provocan el deterioro de los granos de cereal en el campo o durante el almacenamiento, debido a que dañan la estructura externa del grano y facilitan la entrada e invasión de mohos micotoxigénicos. En Europa una de las plagas más

Tabla 1. Especies de *Fusarium*, estado sexual (teleomórfico), cultivos primarios afectados, región endémica, producción de micotoxinas

<i>Fusarium</i> spp.	Forma Teleomórfica	Cultivos afectados ^a	Región geográfica	Micotoxina ^b
<i>F. culmorum</i>	Desconocida	Maíz, granos pequeños	Nivel mundial	DON, ZEA, NIV, FUS
<i>F. graminearum</i>	<i>Gibberella zeae</i>	Maíz, granos pequeños	Nivel mundial	DON, ZEA, NIV, FUS
<i>F. langsethiae</i>	Desconocida	Granos pequeños	Europa	DAS, T2, HT2, BEA ^c
<i>F. poae</i>	Desconocida	Granos pequeños	Nivel mundial	NIV, T2, HT2, FB, DAS, BEA, FUS
<i>F. proliferatum</i>	<i>Gibberella intermedia</i>	Maíz	Nivel mundial	FB, MON, BEA, FP
<i>F. sporotrichioides</i>	Desconocida	Granos pequeños	Nivel mundial	T2, HT2, DAS, BEA, FUS
<i>F. verticillioides</i>	<i>Gibberella moniliformis</i>	Maíz	Nivel mundial	FB, FUS, MON ^c

^a Alta prevalencia en los cultivos indicados. “Granos pequeños” hace referencia a trigo, cebada y avena.

^b BEA, beauvericina; DAS, diacetoxiscirpenol; DON, deoxinivalenol o sus derivados acetilados; FB, fumonisinas FB1,FB2 y FB3; FP, fusaproliferina; FUS, fusarina C; HT2, toxina HT2; MON, moniliformina; NIV, nivalenol o sus derivados acetilados; T2, toxina T2; ZEA, zearalenona.

^c La producción de esta toxina es poco frecuente entre las cepas de estas especies.

conocidas es la que origina el insecto llamado “taladro del maíz”, muy importante debido a los daños que produce en este cereal y a las consecuentes pérdidas económicas.

Otros factores pueden ser las prácticas agronómicas como el arado, gestión de residuos, rotación de cultivos, uso de fungicidas o fecha de la cosecha, entre otros (Sanchis *et al.*, 2000).

2.1.1. FUMONISINAS

Las fumonisinas son un grupo de micotoxinas sintetizadas por varias especies del género *Fusarium* y por *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici*. En la tabla 2 se muestra las principales especies de hongos que elaboran estas micotoxinas, predominando por lo general en alimentos, y sobre todo en maíz, las especies *F. verticillioides* y *F. proliferatum*.

Tabla 2. Mohos productores de fumonisinas

Soriano <i>et al.</i> , (2007)	Género	Especie
	<i>Fusarium</i>	<i>F. verticillioides</i>
		<i>F. proliferatum</i>
		<i>F. nygami</i>
		<i>F. napiforme</i>
		<i>F. oxysporum</i>
		<i>F. polyphialidicum</i>
		<i>F. anthropilum</i>
	<i>Alternaria</i>	<i>A. alternata</i> f. sp. <i>lycopersici</i>

Se han caracterizado hasta 28 análogos de fumonisinas que pueden ser separados en 4 grupos principales: A, B, C y serie P. El grupo B es el que se aísla más comúnmente en la naturaleza, siendo la fumonisina B1 (FB1) la más tóxica y abundante, y por lo general representa entre el 70-80% del contenido total de fumonisinas en alimentos contaminados de forma natural por *Fusarium verticillioides*.

Los principales alimentos implicados en la contaminación por fumonisinas son el maíz y sus productos derivados, que pueden contener cantidades significativas de estas toxinas (Ariño *et al*, 2009; Herrera *et al*, 2010). La contaminación del maíz y derivados por fumonisinas es un fenómeno de distribución mundial (JECFA, 2010). Entre los derivados del maíz susceptibles de contener fumonisinas se encuentran harina de maíz, cereales de desayuno, polenta, sémola, palomitas, snacks, maíz dulce, galletas, alimentos para niños, tortitas y tacos (JECFA, 2010; Soriano *et al.*, 2007; CE, 2003; Sanchis *et al.*, 2000; Marasas *et al.*, 1999).

Toxicidad

Las fumonisinas FB1 y FB2 son clasificadas por la Agencia Internacional de Investigación contra el Cáncer (IARC) desde 1993 dentro del grupo 2B como “posible carcinógeno en humanos”, pues existe limitada evidencia sobre humanos pero suficiente en animales (IARC, 2002). Las fumonisinas presentan una similitud estructural con las bases esfingoides y alteran las rutas metabólicas de los esfingolípidos inhibiendo su síntesis. Esta alteración genera toxicidad en ciertos órganos y sistemas, sobre todo en cerebro, hígado y riñón donde estas micotoxinas se acumulan. En estudios a largo plazo en ratas y ratones se observan carcinomas hepáticos y carcinomas renales tubulares. En caballos la exposición a fumonisinas produce un cuadro agudo-subagudo de leucoencefalomalacia y en cerdos aparece un cuadro de edema pulmonar agudo (Stockmann-Juvala *et al.*, 2008).

En humanos se han realizado diversos estudios epidemiológicos sobre la posible relación entre la ingesta de fumonisinas y el desarrollo de cáncer (Marasas *et al.*, 1999). En la región del Transkei (Sudáfrica) se llevó a cabo un estudio sobre la exposición a fumonisinas y la aparición de cáncer esófago desde 1976 hasta 1986. En China se propuso que una alta incidencia de cáncer de esófago estaba asociada con el consumo de maíz contaminado con fumonisinas, además de una mayor incidencia de cáncer de hígado en regiones donde existían mayores niveles de contaminación. Tanto en el estudio de Sudáfrica como en el de China se encontró una correlación entre la ingesta de FB1 y la incidencia de cáncer de esófago.

2.1.2. ZEARALENONA

Esta micotoxina es producida principalmente por las especies de *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum*, y *Fusarium crookwellense*. Es la micotoxina que está presente con mayor frecuencia en la enfermedad conocida como “fusariosis” de los cereales en los países del Centro y Norte de Europa. Los granos infectados por *Fusarium* pueden presentar una coloración rosa asociada con la producción de un pigmento rosa producido simultáneamente con *zearalenona* (ZEA).

Aunque las especies de *Fusarium* que producen ZEA colonizan los cereales durante el desarrollo del cultivo en ambientes húmedos y frescos, ZEA puede ser sintetizada a temperaturas relativamente frías durante el almacenamiento dando lugar a mayores niveles de esta micotoxina, cuando las condiciones de crecimiento del hongo son favorables (Richard, 2007).

A nivel mundial los principales cultivos contaminados por ZEA son el maíz, trigo, cebada, arroz y otros cereales así como otros cultivos alimentarios, pudiendo contaminar los productos procesados.

Es un compuesto estable durante el almacenamiento, molienda, procesado y cocinado de los alimentos, y no se degrada a altas temperaturas, aunque el tratamiento térmico destruye cierta cantidad de zearalenona. La molienda húmeda del maíz concentra la zearalenona en las fracciones de fibra y germen de maíz, aunque no en la fracción de almidón (Lauren *et al.*, 1997). En la molienda seca del maíz, se puede reducir la concentración de zearalenona hasta un 80-90% en la fracción de harina, aunque la reducción es menor en fibra que en germen (EMAN, 2011).

Toxicidad

La zearalenona se encuadra en el grupo 3 de la IARC ya que no puede ser clasificada respecto a su carcinogenicidad para el ser humano y las evidencias para la carcinogenicidad en animales de experimentación son limitadas (IARC, 1993). La zearalenona es una micotoxina no esteroidea, con actividad estrogénica. Por su similitud estructural con el 17- β -estradiol (estrógeno natural), se une a los receptores estrogénicos de las células provocando un cuadro de hiperestrogenismo y disminución de la

fertilidad. La especie animal doméstica más sensible es la porcina siendo las hembras de dicha especie las más sensibles. Existen pocos datos científicos acerca de los efectos en humanos debido a las escasas investigaciones realizadas. Sin embargo, se ha sugerido la posible implicación de la zearalenona en epidemias de la telarquia precoz (desarrollo prematuro del tejido mamario) en cientos de niñas, como en la epidemia que hubo entre 1978 y 1981 en Puerto Rico (Sáenz de Rodríguez *et al.*, 1985). También se ha sugerido su posible implicación con cáncer de cérvix (EMAN, 2011).

2.1.3. TRICOTECENOS

Los tricotecenos son un amplio grupo de micotoxinas que se caracterizan por tener un doble enlace entre C-9,10 y un anillo epoxi en la posición C-12,13. Actualmente de unas 150 variantes de tricotecenos de origen natural producidas por varios géneros de hongos como: *Fusarium*, *Trichoderma*, *Stachybotrys*, *Cylindrocarpon*, *Cephalosporium* y *Myrothecium*, más de 40 son producidos por especies de *Fusarium* (Desjardins, 2006), entre las que destacan por su importancia agroalimentaria *F. sporotrichioides*, *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. langsethiae* y *F. poae* (Glenn, 2007).

De todas las micotoxinas de *Fusarium* descubiertas a día de hoy, son los tricotecenos los que están más frecuentemente asociados con intoxicaciones crónicas y mortales en los seres humanos y en animales, incluyendo la “leucopenia tóxica alimentaria” enfermedad aparecida ocasionalmente en zonas de Rusia, y Asia central, y “Akakabi-byo”(enfermedad del moho color rojo) en Japón (Desjardins *et al.*, 2007).

Los tricotecenos se suelen dividir normalmente en 4 grupos: A, B, C y D, de los que los tipos A y B tienen gran importancia en seguridad alimentaria (Weidenbörner, 2001) (tabla 3).

Tabla 3. Clasificación de Tricotecenos A y B

Grupo	Micotoxina
Tipo A	Toxina T-2
	Toxina HT-2
	Diacetoxyscirpenol
	Monoacetoxyscirpenol
	Neosolaniol
Tipo B	Nivalenol
	Deoxinivalenol
	Fusarenona X
	Diacetilnivalenol

2.1.3.1. DEOXINIVALENOL

El deoxinivalenol también conocido como DON o vomitoxina es uno de los 150 compuestos conocidos como tricotecenos. DON se produce casi siempre antes de la cosecha, cuando los cultivos son invadidos por ciertas especies de *Fusarium* principalmente *F. graminearum* y *F. culmorum*. Estas dos especies son patógenas para las plantas y causan la enfermedad denominada “fusariosis de la espiga del trigo”. La forma sexual de *Fusarium graminearum* (*Gibberella zeae*) produce la “podredumbre de la mazorca de maíz” (Richard, 2000).

Los principales productos contaminados por DON son los cereales principalmente maíz y pequeños granos como trigo, avena y cebada. Así también puede afectar a otros cultivos como trigo sarraceno, triticale, centeno, sorgo, y arroz. Diferentes estudios demuestran que hasta un 50% de las cosechas pueden estar contaminadas por DON cuando las especies de *Fusarium* apropiadas infectan los cultivos de cereales. Debido a que DON es un compuesto estable, también ha sido detectado en una amplia gama de productos de cereales transformados, desde cereales, pan, pastas alimenticias, alimentos infantiles, malta y cerveza. Sin embargo la transferencia de DON de piensos contaminados a la carne y otros productos de origen animal parece ser poco probable (Richard, 2007).

Toxicidad

El Deoxinivalenol es clasificado en el grupo 3 por la IARC ya que no puede ser clasificado como carcinógeno en humanos y las evidencias para la carcinogenicidad en animales de experimentación son limitadas (IARC, 1993).

Los cerdos son los animales más habitualmente afectados por esta toxina, la ingesta de granos contaminados puede producir toxicidad aguda con cuadros de vómitos, rechazo de alimento, pérdida de peso y diarrea. Los niveles superiores a 1 mg/g pueden considerarse potencialmente perjudiciales para estos animales (Richard, 1998). DON es inmunosupresor y puede causar problemas en los riñones de los animales (Pestka y Bondy, 1994). En los seres humanos se cree que exhiben un síndrome de vómito similar a los cerdos cuando consumen cereales contaminados con DON (Richard, 2007).

2.1.3.2 TOXINAS T-2 – HT-2

Las toxinas T-2 y HT-2 son tricotecenos de tipo A producidos por diferentes especies de *Fusarium* como *F. sporotrichioides*, *F. langsethiae* y *F. poae* (Bottalico, 1998; Torp y Alder, 2004; Torp y Nirenberg, 2004). Estos hongos comúnmente colonizan los granos y pueden crecer a temperaturas de refrigeración, mientras que las toxinas T2 y HT2 generalmente se producen en un rango de temperatura entre 7-25 °C. Estas micotoxinas pueden sintetizarse a mayores temperaturas, pero lo que sucede en la naturaleza es que a bajas temperaturas no compiten con hongos de otros géneros (Soriano *et al.*, 2007).

Los principales productos contaminados por toxinas T-2 y HT-2 son los cereales como cebada, centeno, avena, trigo, maíz y arroz. Así también se han encontrado en algunos productos preparados con estos cereales, como pan, pastas alimenticias, cereales para el desayuno, y alimentos para bebés y niños.

2.2. ÁCIDOS FENÓLICOS

Los ácidos fenólicos son sustancias de origen vegetal, producto del metabolismo secundario de las plantas que pertenecen a un grupo muy amplio de compuestos fenólicos que incluyen más de 8000 compuestos, que constan de un anillo aromático de benceno con uno o más grupos hidroxilo. Estos compuestos fenólicos se encuentran ampliamente distribuidos en las plantas. Casi todas las frutas, vegetales frescos y granos de cereales contienen cantidades apreciables de fenoles naturales, aunque estos varían considerablemente entre los distintos tejidos y células vegetales (Dai *et al.*, 1995). El maíz es el cereal que más fenoles totales contiene, en comparación con otros cereales como trigo, arroz o avena (Adorn y Liu, 2002), siendo el ácido ferúlico el más abundante, representando alrededor del 85% de los fenoles totales (De la Parra *et al.*, 2007). Estos compuestos fenólicos se encuentran principalmente en el pericarpio, aleurona, endospermo y embrión (Fossen *et al.*, 2001; Pascal *et al.*, 2002; Jing y Giusti, 2005).

Los ácidos fenólicos representan la forma más común de los compuestos fenólicos que se encuentran en los granos enteros y que constituyen uno de los grupos más complejos de fitoquímicos presentes en el grano de cereal (Piironen *et al.*, 2008).

Los ácidos fenólicos pueden ser divididos en 2 grupos, los derivados del ácido hidroxibenzoico que incluyen los ácidos *p*-hidroxibenzoico, protocatecuico, vanílico, gálico, sirínico y elágico, y los derivados del ácido hidroxicinámico entre los que se encuentran los ácidos clorogénico, *p*-cumárico, cafeico, ferúlico y sinápico. Estos ácidos se encuentran principalmente unidos a diferentes componentes de la pared celular como celulosa, lignina y proteínas. Los ácidos fenólicos más abundantes en el grano entero son el ácido ferúlico, *p*-cumárico, vanílico y sirínico (Sosulski, *et al.*, 1982).

La importancia actual de los ácidos fenólicos, es debido al interés que despiertan por sus beneficios potenciales para la salud en determinadas patologías, por su actividad antioxidante y por su **acción antimicrobiana**. Este último efecto ha sido demostrado por diversos autores atribuyendo a los ácidos fenólicos una actividad antimicrobiana importante frente a bacterias y mohos. Además los ácidos fenólicos presentan efectos en la inhibición de la producción de varias micotoxinas como aflatoxinas y tricotecenos (Norton, 1999; Bakan *et al.*, 2003; Atasanova-Penichon *et al.*, 2008; Boutigny *et al.*, 2009-2010). Así también Samapundo *et al.* (2007) demostraron que, los ácidos

fenólicos cafeico y vanílico son capaces de retrasar o inhibir el crecimiento de cepas de *Fusarium verticillioides* y *Fusarium proliferatum* en medios de cultivo cuando se usaron concentraciones de $\geq 2000 \mu\text{g/g}$ y con un valor de actividad de agua (a_w) $\leq 0,948$.

El ácido ferúlico es el más abundante en maíz, y es un derivado del ácido trans-cinámico, producto de la biosíntesis de la fenilalanina y tirosina en las plantas y uno de los componentes de la lignina, se encuentra en los tejidos de las plantas en dos formas: libre y ligada y se concentra principalmente en la pared celular de los cereales, la piel de las frutas y las raíces de las verduras, donde se esterifica principalmente con arabinosa formando enlaces cruzados por puentes éter (Saulnier *et al.* 2007).

Se han encontrado concentraciones de ácido ferúlico en diferentes productos vegetales que van desde 1,2-6,2 $\mu\text{g/g}$ de materia seca para las fracciones de ácido ferúlico libre y de 163-721 $\mu\text{g/g}$ en materia seca para la fracción ligada, siendo estas concentraciones más altas en cereales que en otros vegetales (Zhao *et al.*, 2008). Además el ácido ferúlico es precursor de la síntesis de otros compuestos fenólicos de la planta. (Figura 2).

Z. Zhao, M.H. Moghadasian / Food Chemistry 109 (2008) 691–702

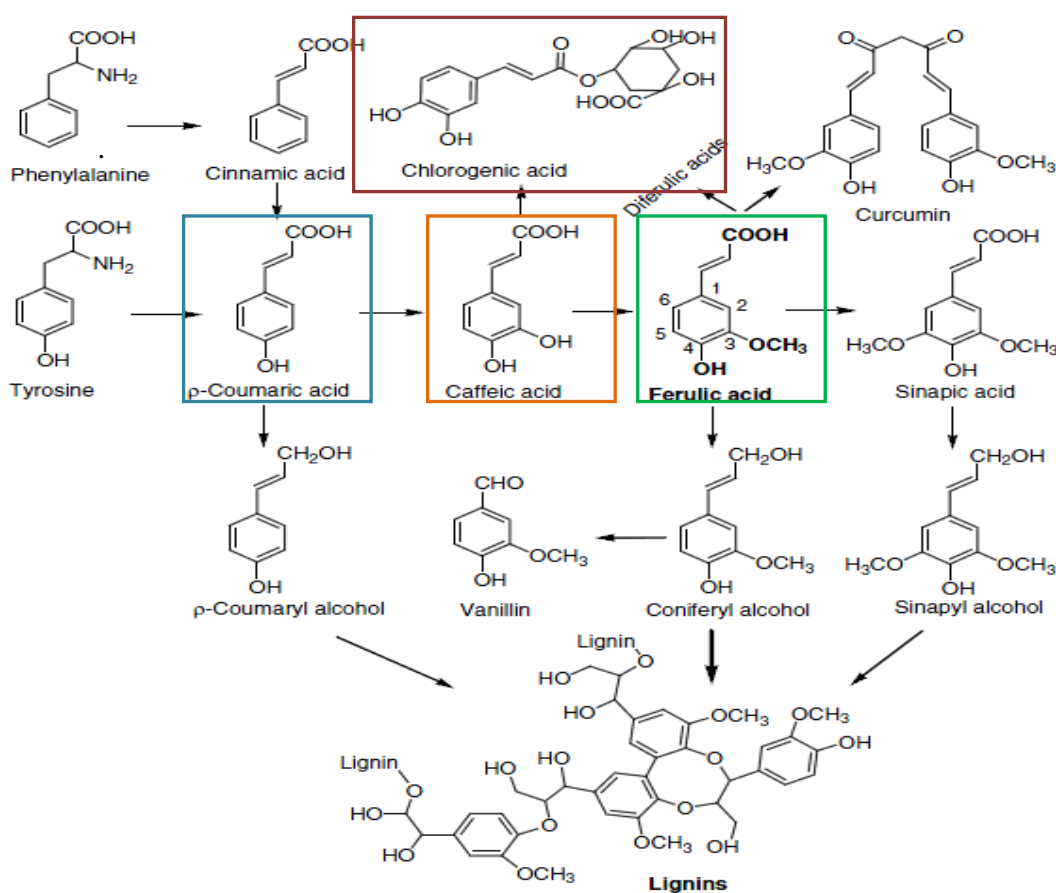


Figura 2. Estructura química y síntesis del ácido ferúlico y sus compuestos relacionados en las plantas.

2.3. MÉTODOS DE ANÁLISIS DE MICOTOXINAS

Existen varios organismos internacionales que elaboran y publican métodos de análisis de micotoxinas en alimentos, como AOAC (Association of Official Analytical Chemists), CEN (Comité Europeo de Normalización) o ISO (Organización Internacional de Normalización). En España, la Asociación Española de Normalización y Certificación (AENOR) adopta y convierte las normas ISO y CEN en normas españolas (UNE).

En la actualidad están vigentes varias normas de análisis de toxinas de *Fusarium* en alimentos:

- UNE-EN 13585: 2002 - Determinación de fumonisinas B1 y B2 en maíz. Método por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con lavado por extracción en fase sólida.
- UNE-EN 14352: 2005 - Determinación de fumonisinas B1 y B2 en productos a base de maíz. Método por HPLC con purificación en columna de inmunoafinidad.
- UNE-EN 15850: 2010 - Determinación de zearalenona en harina de cebada, de maíz y de trigo, polenta y alimentos a base de cereales para bebés y niños. Método por HPLC con purificación en columna de inmunoafinidad y detección por fluorescencia.
- UNE-EN 15891: 2011 - Determinación de deoxinivalenol en cereales, productos a base de cereales y en alimentos a base de cereales para bebés y niños. Método por HPLC con purificación en columna de inmunoafinidad y detección por UV.

De forma general el análisis de micotoxinas consta de las siguientes etapas:



La toma de muestras tiene un papel fundamental en la precisión de la determinación del contenido de micotoxinas, que están distribuidas muy heterogéneamente en los lotes, por ello en el año 2006 se publicó el Reglamento (CE) 401/2006 de la Comisión, por el que se establecen los métodos de muestreo y de análisis para el control oficial del contenido de micotoxinas en los productos alimenticios.

El método de extracción usado para separar la micotoxina de la matriz biológica depende de las propiedades físico-químicas de la toxina. Los analitos con cierta polaridad, tales como las fumonisinas, deoxinivalenol y zearalenona, suelen requerir la presencia de disolventes acuosos tales como metanol-agua o acetonitrilo-agua (Turner *et al.*, 2009)

El procedimiento de purificación (clean-up) es uno de los pasos más importantes, ya que la pureza de los extractos afecta a la sensibilidad de los resultados, puesto que cantidades traza de una molécula diana pueden ser enmascaradas por componentes interferentes presentes no sólo en la matriz sino también en los materiales y solventes utilizados en la técnica (Turner *et al.*, 2009).

Después de la extracción y purificación de la muestra se realiza la determinación de las micotoxinas, en la que podemos diferenciar entre las técnicas instrumentales, y técnicas de cribado o screening (que pueden ser utilizadas sin purificación previa).

Técnicas Instrumentales: Entre las más importantes tenemos: la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) que es un método exacto y preciso que ha sido aceptado como método oficial (AOAC International 994.08) y como método de referencia para algunas micotoxinas. Otros métodos de referencia son la Cromatografía de Gases (GC), que se utiliza para el análisis de tricotecnos y la Cromatografía de Capa Fina (TLC). Para la confirmación de los resultados se suele utilizar la cromatografía asociada a un espectrómetro de masas (GC-MS, LC-MS, LC-MS/MS) (Muscarella, *et al.* 2008).

Técnicas de cribado o screening: En los últimos años se han desarrollado métodos inmunoquímicos para facilitar el análisis. La ventaja de estos métodos es que son rápidos, simples y de bajos requerimientos instrumentales. Por consiguiente, en el caso de un gran número de análisis a realizar, los métodos inmunoquímicos representan una buena alternativa. Sin embargo, en algunos casos pueden presentarse interferencias que dan lugar a falsos positivos, por ello es aconsejable reconfirmar los resultados por técnicas instrumentales más robustas como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) o la cromatografía líquida o de gases acoplada a un espectrómetro de masas (LC-MS o GC-MS). Entre las técnicas de cribado más importantes tenemos las técnicas de ELISA y las de Inmunoensayo de flujo lateral.

Técnicas de flujo Lateral: Es un tipo de test usado para el análisis de micotoxinas y otras sustancias químicas, que permite el flujo de la muestra por capilaridad a lo largo de una membrana de nitrocelulosa. Esta técnica de inmunoensayo, puede ser cualitativa en la que se establece un valor límite de corte, o cuantitativa cuando se trabaja con un lector de bandas fotométricas.

Las tiras reactivas para las micotoxinas están basadas en un formato de inmunoensayo competitivo en el que se utiliza un anticuerpo marcado para producir la señal analítica. Cuando la muestra es introducida en la tira va migrando a la membrana de nitrocelulosa, que tiene una zona de ensayo y una zona control. Si la muestra tiene micotoxinas en la zona de ensayo se formará una banda coloreada que puede ser medida con un lector de reflectancia fotométrica, que dará un resultado según la intensidad del color. En la zona control hay presentes anticuerpos específicos, por tanto, siempre será visible independientemente de la presencia del analito objeto en la muestra, lo que confirma que el desarrollo de la prueba ha sido correcto.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. ESTUDIO DE LA INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO DE ESPECIES TOXIGÉNICAS DE *FUSARIUM* POR ADICIÓN DE ÁCIDOS FENÓLICOS.

Se realizó por siembra de las cepas de *Fusarium* en medio sólido de Agar Corn Meal, el cual estaba enriquecido con ácidos fenólicos (cafeico, clorogénico, ferúlico y *p*-cumárico) a diferentes concentraciones, así como el correspondiente control sin enriquecer.

Obtención de las cepas de referencia.-

Las cepas de *Fusarium* utilizadas en este estudio se obtuvieron de la colección Española de cultivos tipo (CECT) y del Centraalbureau voor Schimmelcultures de la colección Holandesa (CBS). En la tabla 4 se especifican las cepas utilizadas, la especie a la que pertenecen y su país de procedencia.

Tabla 4. Cepas del género *Fusarium* utilizadas, indicando la especie y país de procedencia.

Cepa	Especie	País
CECT 2987	<i>F. verticillioides</i>	España
CECT 2150	<i>F. graminearum</i> ^a	España
CECT 20166	<i>F. sporotrichioides</i>	España
CBS 110261	<i>F. graminearum</i>	Holanda
CBS 119837	<i>F. proliferatum</i>	Holanda
CBS 113234	<i>F. langsethiae</i>	Holanda

^a Cepa en estado teleomórfico (*Gibberella zeae*).

Ácidos fenólicos.-

Los ácidos fenólicos utilizados para este estudio (cafeico, clorogénico, ferúlico y *p*-cumárico) fueron suministrados por Sigma-Aldrich Chemie. Tabla 5.

Tabla 5. Ácidos fenólicos utilizados en el estudio, indicando: su fórmula empírica, grado de pureza y peso molecular.

Ácido fenólico	Fórmula Empírica	Grado de Pureza	Peso molecular (gramos/mol)
Ácido cafeico	C ₉ H ₈ O ₄	≥ 98 %	180,16
Ácido clorogénico	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	≥ 95 %	354,31
Ácido ferúlico	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	99 %	194,18
Ácido <i>p</i> -cumárico	C ₉ H ₈ O ₃	≥ 98 %	164,16

Preparación del inóculo de las cepas de *Fusarium*.

Las cepas de referencia de *Fusarium* que se encontraban liofilizadas, fueron almacenadas en congelación a -80 °C en crioviales hasta su uso. Para su revivificación fueron llevadas con asa estéril a tubos de ensayo que contenían 9 ml caldo Sabouraud estéril, e incubadas durante 4 días a una temperatura aproximada de 25 °C, para dar las condiciones óptimas de crecimiento, lo que se confirmó por la presencia de turbidez en todos los tubos.

Las cepas revivificadas fueron cultivadas en agar patata dextrosa (PDA) el cual está compuesto por (g/litro de agua destilada): polvo de patata (300 g), glucosa (20 g), agar (20 g). El medio se agitó y se llevó a ebullición hasta obtener una suspensión homogénea que se esterilizó en autoclave durante 20 minutos. Posteriormente se vertió entre 18-20 ml de agar en placas de Petri y una vez solidificadas se realizó la siembra de las cepas de *Fusarium* al centro de la placa, que se incubaron a una temperatura aproximada de 25 °C durante 7 días.

Preparación de las soluciones madre de ácidos fenólicos.

Se prepararon soluciones madre de los ácidos fenólicos a estudiar (cafeico, clorogénico, ferúlico y *p*-cumárico) a concentraciones de 202,5 mM en etanol-agua. En la tabla 6 se muestra a modo resumen la preparación de las soluciones madre de ácidos fenólicos.

Tabla 6. Resumen de preparación de soluciones madre de ácidos fenólicos.

Ácido fenólico	Pm (g/mol)	Peso (g)	Vol. etanol (ml)	Vol. agua dest. (ml)	Vol. total(ml)	% etanol	[mM]	[mg/L]
Cafeico	180,16	1,824	40	10	50	80	202,5	36482,4
Clorogénico	354,31	3,587	5	45	50	10	202,5	71747,77
Ferúlico	194,18	1,966	25	25	50	50	202,5	39321,45
<i>p</i> -Cumárico	164,16	1,662	25	25	50	50	202,5	33242,4

Pm: peso molecular. [mM]:milimolar. [mg/L] o ppm, partes por millón.

Debido al grado de solubilidad que presentan los ácidos fenólicos se utilizaron diferentes proporciones de etanol:agua para su disolución. Las soluciones madre de ácidos fenólicos fueron almacenadas en congelación (-20 °C) hasta su uso.

Las concentraciones de ácidos fenólicos utilizadas en el estudio para cada cepa de *Fusarium*, se muestran en la tabla 7.

Tabla 7. Cepas de *Fusarium* y concentraciones de ácidos fenólicos utilizados en el estudio.

Ác.Fenólicos Cepas	Cafeico	Clorogénico	Ferúlico	<i>p</i> -cumárico
<i>F. verticillioides</i>	0,5 - 1 - 2,5 - 3 - 3,5 - 4 - 5 - 7 y 10 mM			
<i>F. graminearum</i>				
<i>F. sporotrichioides</i>				
<i>F. graminearum</i> ^a				
<i>F. proliferatum</i>				
<i>F. langsethiae</i>				

^a En su forma sexual (*Gibberella zeae*)

Preparación del medio con ácidos fenólicos e inoculación de las cepas *Fusarium*.

El medio de cultivo utilizado para el estudio de la inhibición del crecimiento de *Fusarium* spp fue el agar corn meal, que se preparó según las condiciones del fabricante. Una vez que el agar es llevado a ebullición se transfieren volúmenes de 20 ml a botes de vidrio, que son esterilizados en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Se deja enfriar hasta una temperatura aproximada de 45 °C y se adicionan

los ácidos fenólicos según la concentración deseada, homogeneizando con un movimiento suave de muñeca. Luego esta mezcla agar/ácido fenólico se vierte en placas de Petri. Asimismo, se prepararon placas control sin adición de ácidos fenólicos. Las placas se dejan enfriar y cuando el medio está completamente solidificado se lleva a cabo la siembra de las cepas de *Fusarium*, del margen de un cultivo de 7 días en agar PDA. Una vez realizada la siembra se incuban a 25 °C durante 7 días.

Evaluación de los resultados.-

Para saber el efecto que tuvieron los ácidos fenólicos sobre el crecimiento de las cepas de *Fusarium*, se realizaron mediciones de los diámetros de las colonias con regla graduada en dos direcciones perpendiculares en intervalos regulares de tiempo, durante 7 días, y que fueron comparadas con las cepas control (agar sin adición de ácidos fenólicos) para poder estimar el porcentaje de inhibición del crecimiento.

3.2 ESTUDIO DE LA INHIBICIÓN DE LA BIOSÍNTESIS DE MICOTOXINAS DE *FUSARIUM* POR ADICIÓN DE ÁCIDOS FENÓLICOS.

El estudio de la inhibición de la biosíntesis de micotoxinas de *Fusarium* se realizó sobre un lote de maíz que fue contaminado *in vitro* por la adición de una suspensión de esporos de *Fusarium* spp.

Cepas de referencia.-

En este ensayo se utilizaron las mismas cepas de *Fusarium* que en el estudio anterior (tabla 8) excluyendo las cepas de *F. sporotrichioides* y *F. langsethiae* productoras de toxinas T-2 y HT-2, que se dejan para un estudio posterior.

Tabla 8. Cepas del género *Fusarium* utilizadas, indicando la especie, país de procedencia y la micotoxina que produce.

Cepa	Especie	País	Producción
CECT 2987	<i>F. verticillioides</i>	España	Fumonisin
CECT 2150	<i>F. graminearum</i> ^a	España	ZEA, DON
CBS 110261	<i>F. graminearum</i>	Holanda	ZEA, DON
CBS 119837	<i>F. proliferatum</i>	Holanda	Fumonisin

^a Cepa en estado teleomórfico (*Gibberella zeae*). ZEA: Zearalenona. DON: Deoxinivalenol.

Ácidos fenólicos.-

Se utilizaron los mismos ácidos fenólicos del estudio anterior, preparando soluciones madre a dos concentraciones distintas para cada ácido fenólico, dichas concentraciones fueron elegidas según el ensayo anterior en agar corn meal, considerando aquellas concentraciones que producían la máxima inhibición del crecimiento y la inmediata anterior (tabla 9).

Tabla 9. Concentraciones de ácidos fenólicos utilizadas en el estudio para cada cepa de *Fusarium*

Ác.Fenólicos Cepas	Cafeico	Clorogénico	Ferúlico	<i>p</i> -Cumárico
<i>F. verticillioides</i>	7 - 10 mM	7 - 10 mM	5 - 7 mM	7 - 10 mM
<i>F. graminearum</i>	7 - 10 mM	7 - 10 mM	2,5 - 3 mM	4 - 5 mM
<i>F. proliferatum</i>	7 - 10 mM	5 - 7 mM	5 - 7 mM	5 - 7 mM
<i>F. graminearum</i> ^a	4 - 5 mM	5 - 7 mM	1 - 2,5 mM	2,5 - 3 mM

^a Cepa en estado teleomórfico (*Gibberella zeae*).

Lote de maíz.-

Para todos los ensayos se utilizó un lote de maíz grano procedente de Francia, con un contenido de humedad del 14%.

Obtención del inóculo.

Para la obtención del inóculo (esporos) las cepas fueron subcultivadas en PDA por la técnica del agar inclinado en tubos de rosca estériles y mantenidas a una temperatura de 25 °C durante 7 días.

Después de los 7 días de incubación se añadió asépticamente 10 ml de un agente humectante (5 g Tween-80/ litro de agua destilada), en cada tubo de agar inclinado de PDA. Seguidamente con asas Drigalski se hizo un ligero frotamiento en la superficie de crecimiento para soltar una mezcla de esporos y micelio de los tubos de PDA. La suspensión resultante se filtró con embudo y gasa estéril (4 ó 5 capas) y los esporos resultantes son recogidos en tubos de rosca estériles y almacenados en refrigeración (4 °C) hasta su recuento en cámara de Neubauer y posterior confirmación en agar patata dextrosa (PDA) y en Dicloran Rosa Bengala Cloranfenicol (DRBC).

Recuento de esporos en Cámara de Neubauer.

El número de esporas por ml de suspensión de esporas se determinó utilizando una cámara de recuento Neubauer (Optik Labor) que está adaptada a un microscopio de contraste de fases (Leica) que permite el recuento de las conidias. El procedimiento es el siguiente: Con pipetas y puntas estériles se depositan 100 µl de la suspensión de esporos en el portaobjetos especial (cámara de Neubauer) y se cubre con un cubreobjetos que se adhiere por tensión superficial y se observa al microscopio con el objetivo de 40X. El proceso de recuento de esporas se realizó tres veces y se calculó el promedio del número de esporas por ml de suspensión de esporas.

Confirmación del recuento de esporos mediante siembra en placa.

La confirmación del recuento del número de esporos se realizó mediante siembra en superficie en PDA y DRBC, por duplicado, para lo cual se prepararon diluciones hasta obtener recuentos de esporos entre 10-100 esporos/ml en placa, según la concentración de esporos obtenida en cámara de Neubauer.

Estas diluciones se prepararon en viales de vidrio de 2 ml de capacidad cogiendo 0,1 ml de suspensión madre y llevándola 0,9 ml de agua de peptona estéril al 0,1% (Dilución -1), así hasta obtener la dilución deseada.

Los medios de cultivo PDA y DRBC se prepararon según indicaciones del fabricante. Una vez preparadas y solidificadas las placas con los medios de cultivo se

llevó a cabo la siembra añadiendo 0,1 ml de la dilución de esporos y realizando una homogeneización sobre la superficie de la placa con asa Drigalski. Las placas fueron incubadas a 25 °C durante 3 días.

Tras la incubación se cuenta el número de esporos presentes en las placas (sembradas por duplicado) se hace el promedio, se multiplica por el inverso del volumen de la siembra y por la inversa de la dilución y el resultado se expresa en esporos/ml.

Con el recuento en placa se confirma el recuento teórico de la cámara de Neubauer y se preparan diluciones hasta obtener recuentos de 10^4 esporos/ml que se almacenan en refrigeración (4 °C) hasta su uso.

Inoculación del maíz con esporas de *Fusarium* spp.

Se pesan 50 gramos de maíz en matraces de 250 ml, que son rehidratados añadiendo 50 ml de agua destilada y se deja reposar durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de que el maíz haya absorbido parte del agua se lleva al autoclave durante 15 minutos. Luego se deja enfriar hasta alcanzar la temperatura ambiente y se agita enérgicamente para soltar los granos.

Se lleva a cabo un segundo tratamiento en autoclave con las mismas condiciones que antes y se deja reposar durante una hora a temperatura ambiente.

Transcurrido este tiempo los granos de maíz son depositados asépticamente en placas de Petri (25 gramos por placa, aproximadamente) de plástico de 90 mm de diámetro, recubriendo completamente la base, a la que previamente se le ha colocado un papel de filtro estéril.

Los granos de maíz son rociados homogéneamente con un dispensador en spray con el ácido fenólico correspondiente, realizando 10 pulverizaciones (equivalentes a 1 ml de solución). Se deja reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Posteriormente el maíz se inocula con la suspensión de esporos añadiendo un volumen total de 100 µl (10^4 esporas/ml) en tres puntos equidistantes. La incubación se realizó durante 28 días a una temperatura de 25 °C.

Para mantener una actividad de agua constante durante el período de incubación se midió la actividad de agua del maíz después de su rehidratación (DECAGON CX-1) resultando una $a_w=0,9964$ y se preparó en un matraz una mezcla glicerol:agua con la misma actividad de agua que el maíz rehidratado. Esta mezcla fue introducida en la estufa de incubación y controlada periódicamente para evitar los cambios en la actividad de agua de los granos de maíz.

Evaluación de los resultados.-

Para estudiar el efecto de los ácidos fenólicos sobre la biosíntesis de micotoxinas se realizó el siguiente procedimiento: Después de la incubación del maíz inoculado (28 días a 25 °C), los granos enmohecidos se colocan sobre papel de aluminio y se autoclavan durante 1 minuto para destruir el micelio y quedarnos con las micotoxinas, que resisten dicho tratamiento térmico. Posteriormente el maíz es triturado con un molino (, bajo campana de extracción y almacenado en congelación a -20 °C hasta su análisis, que compararemos con las cepas control (maíz sin adición de ácidos fenólicos).

Análisis de Micotoxinas: El análisis cuantitativo de las micotoxinas se realizó mediante un test rápido de inmunoensayo de flujo lateral, ROSA (Rapid One Step Assay) de Charm Sciences, Lawrence, MA., de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Este método de análisis ha sido validado anteriormente en nuestro laboratorio para las micotoxinas deoxinivalenol, zearalenona y fumonisinas en maíz, mostrando una buena correlación con los métodos instrumentales basados en cromatografía líquida de alta resolución.

Los análisis se realizaron por duplicado para cada cepa y concentración de ácido fenólico estudiado. En el caso de las fumonisinas el test determina las fumonisinas totales (FB1+FB2), mediante el siguiente procedimiento (Fig. 2): en una balanza analítica (Sartorius CP 2245) se pesan en tubos Falcon (50 ml) una muestra representativa de 2 gramos de maíz molido que se extrajeron con 4 ml de una solución de metanol:agua (7:3, vol/vol) usando un agitador de tubos (Techno-Kartell TK3S), durante 2 minutos. Los extractos obtenidos son filtrados usando un filtro Whatman N° 2V de 185 mm de diámetro (Whatman, Clifton, NJ). Del filtrado se toman 100 µl que son diluidos en 1 ml de la dilución buffer (ROSA FUMQ) para preparar el primer extracto diluido. En caso necesario de una segunda dilución, se toman 300 µl del primer

extracto diluido y se llevan a 1 ml de la dilución buffer (ROSA FUMQ) (segundo extracto diluido). Y en caso necesario de una tercera dilución se toman 100 µl del segundo extracto diluido y se llevan a 1 ml de la dilución buffer (ROSA FUMQ) (tercer extracto diluido). Posteriormente se coloca una tira de flujo lateral del kit de análisis de fumonisinas en la incubadora ROSA-M, para añadirle 300 µl del extracto diluido de interés, que se incuba a 45 °C durante 10 minutos. Los resultados se leen con el lector ROSA-M a través del canal FUM, 3 line mode, y en la matriz 00, 01 ó 02 según estemos trabajando con el primero, segundo o tercer extracto diluido correspondientemente. Los rangos de lectura para cada matriz son los siguientes:

- Matriz 00 → 0 – 1 ppm (mg/kg)
- Matriz 00 → 0 – 6 ppm (mg/kg)
- Matriz 03 → 6 – 60 ppm (mg/kg)

Para el análisis de Deoxinivalenol y Zearalenona se siguió el mismo procedimiento que las fumonisinas pero con pequeñas variaciones, tabla 10.

Tabla 10. Diferencias en el método de análisis de Deoxinivalenol y Zearalenona y variaciones en relación a las fumonisinas.

Micotoxina	Disolvente de extracción	Relación Gramos de muestra / Vol. disolvente	Filtración después de la dilución	Matriz de lectura	Rango de lectura
ZEA	MeOH 70 %	2:1 Se pesan 2 g de muestra en 4 ml de MeOH.	Filtros M51 de 0,45µ RC-15 Jeringuillas (1 ml)	Matriz: 00	0 – 1,4 mg/kg
DON	Agua Mili Q	2:5 Se pesan 2 g de muestra en 10 ml de Agua Mili Q.	N/P	Matriz: 00	0 – 6 mg/kg
				Matriz: 03	6 – 12 mg/kg
				Matriz: 04	12 – 24 mg/kg

ZEA: Zearalenona ; DON: Deoxinivalenol
N/P: No procede

Figura 2. Resumen del análisis de fumonisinas por ROSA.

1. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA



(1) Pesar 2 g
De muestra



(2) Añadir el
solvente
metanol (70%)



(3) Agitar
durante 2
minutos



(4) Centrifugar o
filtrar el extracto

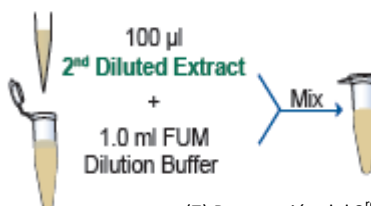


(5) Preparación del
extracto diluido

En caso de hacer diluciones



(6) Preparación del 2º
extracto diluido



(7) Preparación del 3º
extracto diluido

2. PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS



(1) Coloque la
tira del test en
la incubadora

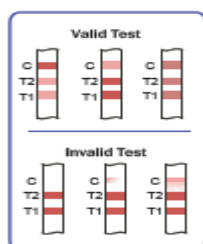


(2) Añadir con pipeta 300
µl del extracto diluido en
el compartimento de la
tira



(3) Cierre la tapa de la
incubadora, apriete el
pestillo e incubar
durante 10 minutos

3. LECTURA DE LOS RESULTADOS



(1) Inspeccione las
tiras de la prueba



(2) Lea los
resultados con el
lector ROSA-M

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 RESULTADOS.

4.1.1. ESTUDIO SOBRE EL CRECIMIENTO DE *FUSARIUM* SPP. POR ADICIÓN DE ÁCIDOS FENÓLICOS.

Para el estudio de la inhibición del crecimiento de las cepas de *Fusarium* se evaluaron dos parámetros: el porcentaje de crecimiento o inhibición y la tasa de crecimiento. Para el cálculo de los porcentajes de inhibición sobre el crecimiento se utilizaron los datos de crecimiento del séptimo día, con respecto a su control. Los resultados demuestran que a medida que aumentan las concentraciones de ácidos fenólicos el porcentaje de inhibición también aumenta de manera significativa, siendo este efecto mayor para los ácidos: ferúlico y *p*-cumárico. En la figura 3 se muestran los porcentajes de inhibición de las cepas *Fusarium* para cada ácido fenólico.

La tasa de crecimiento de las colonias fue determinada como la pendiente de la curva de los datos recogidos durante los siete días de crecimiento. Los resultados obtenidos indican que a medida que la concentración de ácidos fenólicos es mayor, la tasa de velocidad de crecimiento diario disminuye. En la figura 4 se observa las tasas de crecimiento diario para cada cepa de *Fusarium* para cada concentración de ácido fenólico.

De forma general los resultados muestran que las distintas cepas de *Fusarium* ensayadas se comportan de manera similar en lo atinente a la disminución del crecimiento frente a todos los ácidos fenólicos estudiados.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO.-

Para el análisis estadístico de la inhibición del crecimiento de las cepas de *Fusarium*, se ha utilizado el programa Microsoft Excel (Microsoft Corporation). En el cual se ha realizado un análisis de correlación para establecer la medida de la intensidad de la relación que existe entre el porcentaje de inhibición del crecimiento al séptimo día y las concentraciones de ácidos fenólicos estudiadas. En el anexo 1 se muestra una tabla con el análisis de correlación realizado para cada una de las cepas de *Fusarium* así como para cada concentración de ácidos fenólicos estudiada.

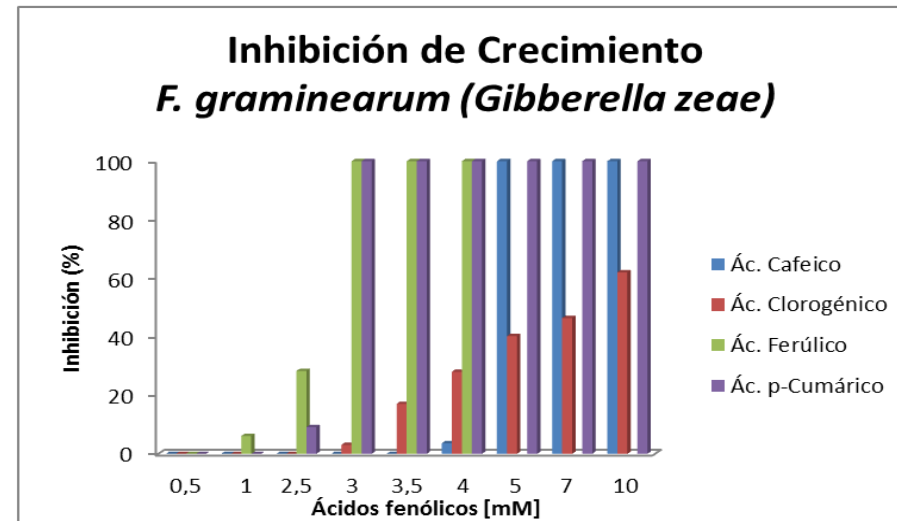
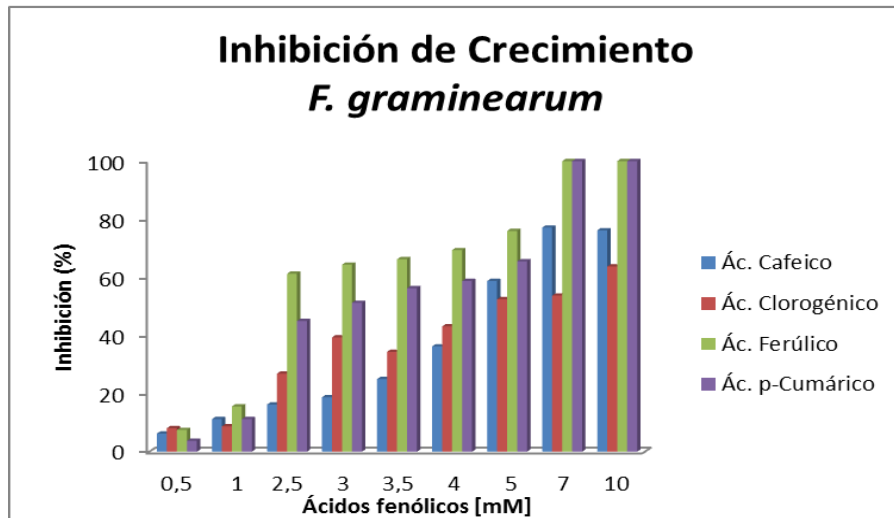
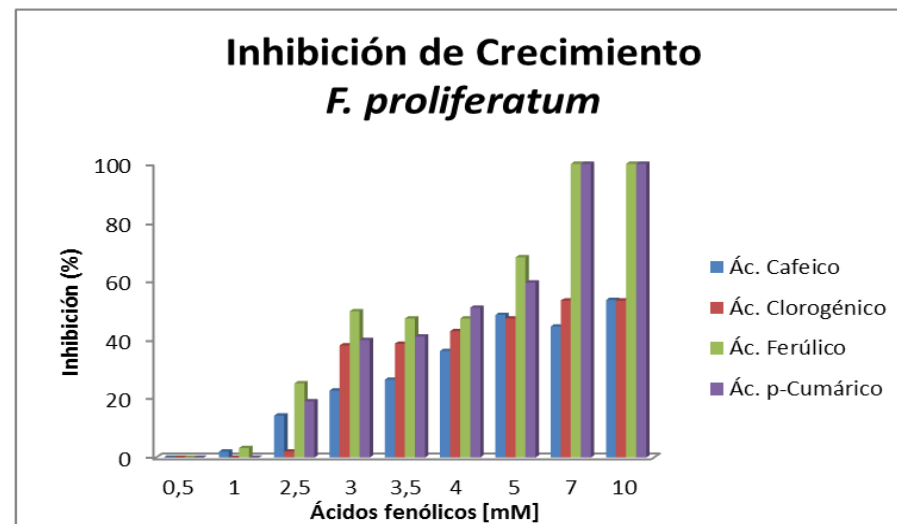
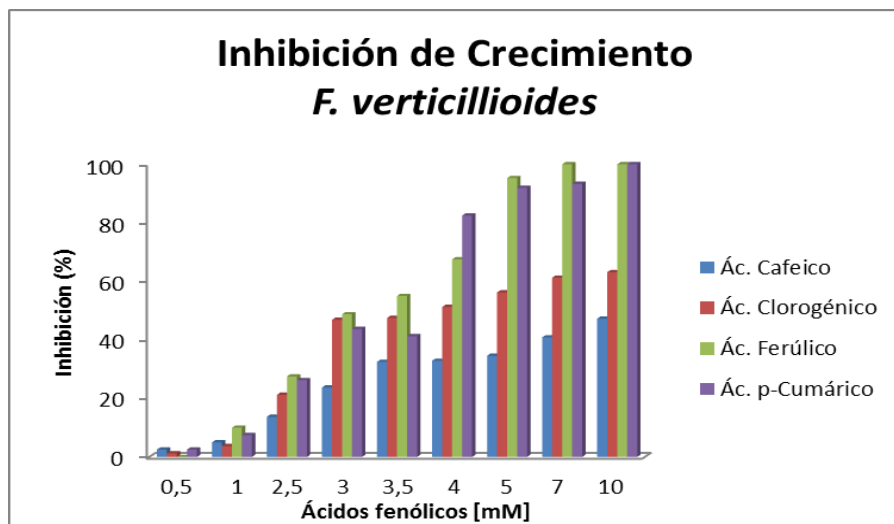


Figura 3. Efecto de las concentraciones de ácidos fenólicos en el crecimiento de *Fusarium* spp. en agar corn meal.

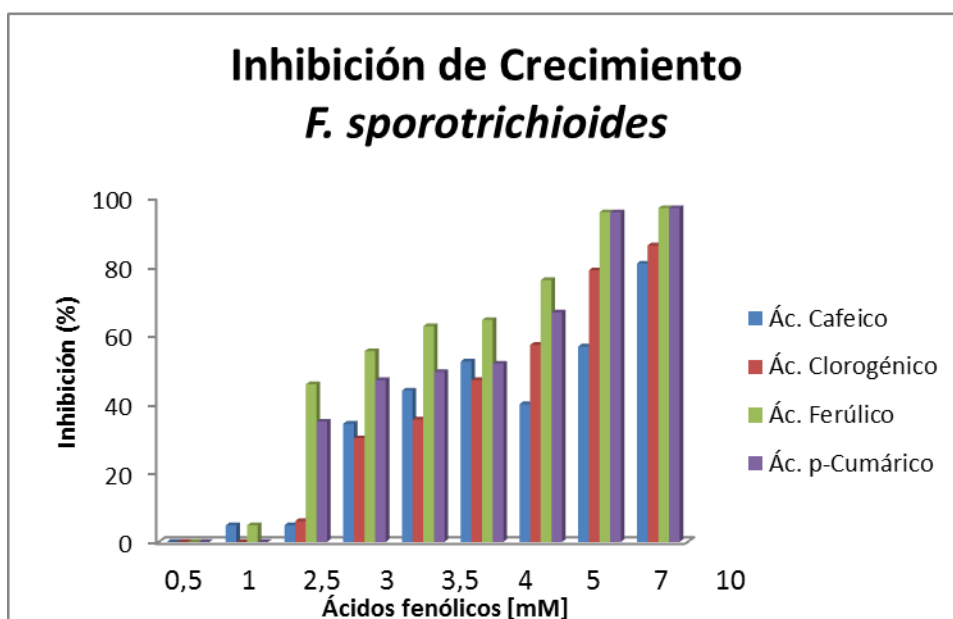
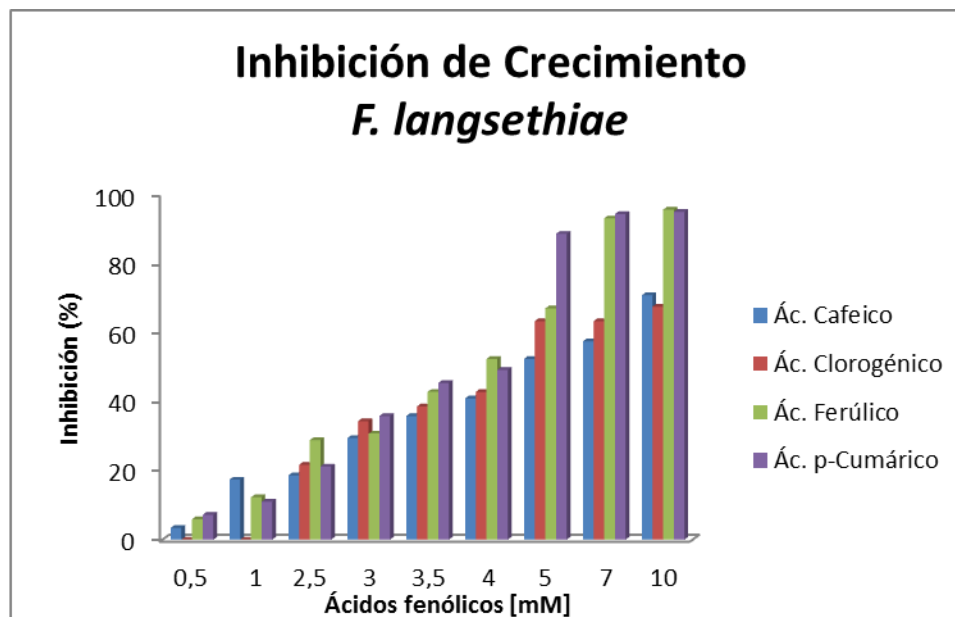


Figura 3. Efecto de las concentraciones de ácidos fenólicos en el crecimiento de *Fusarium* spp. en agar corn meal.

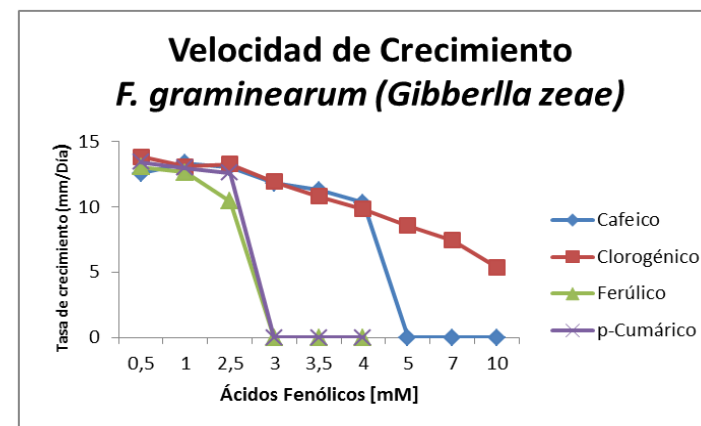
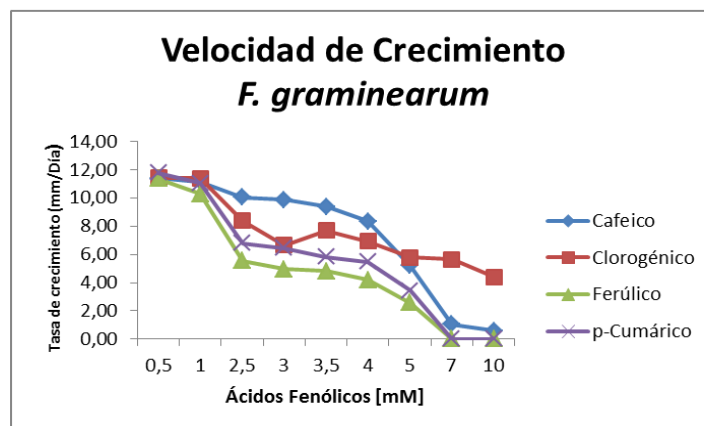
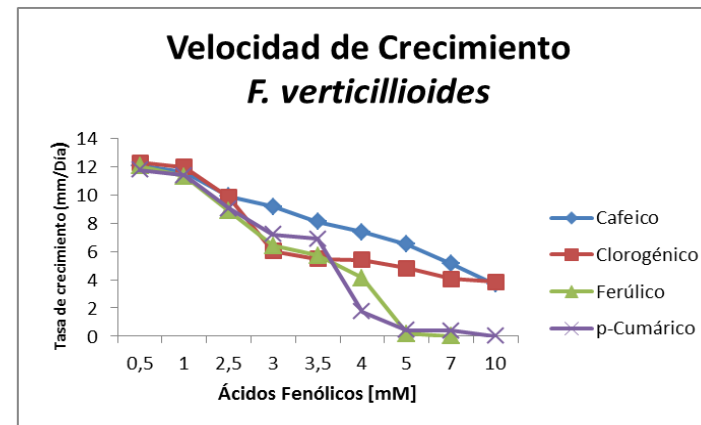
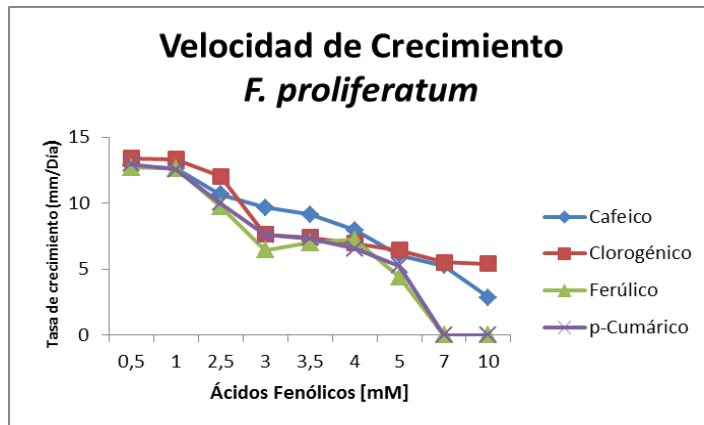


Figura 4. Efecto de las concentraciones de ácidos fenólicos sobre la tasa de velocidad de crecimiento diario de las cepas de *Fusarium*, en agar corn meal.

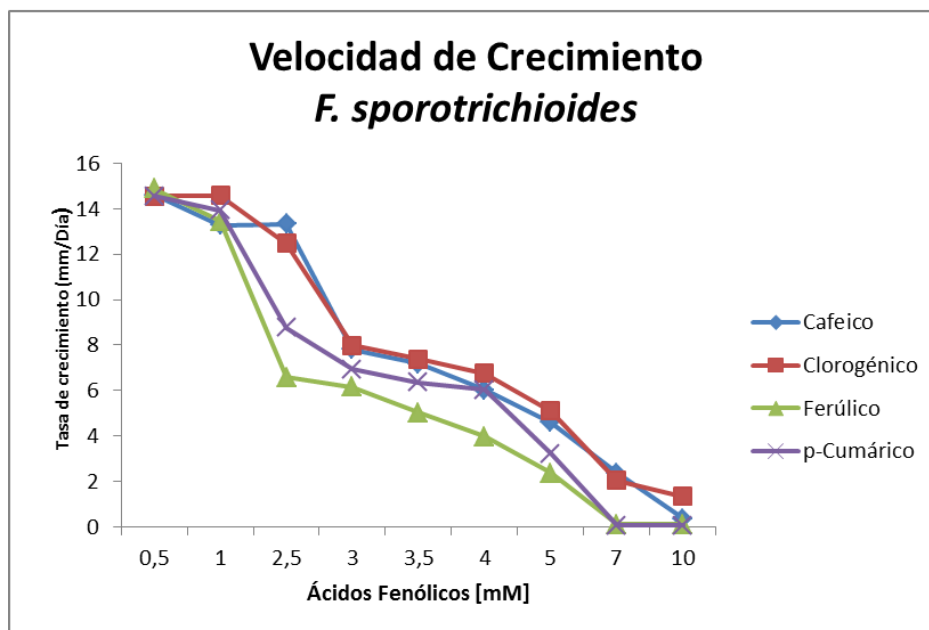
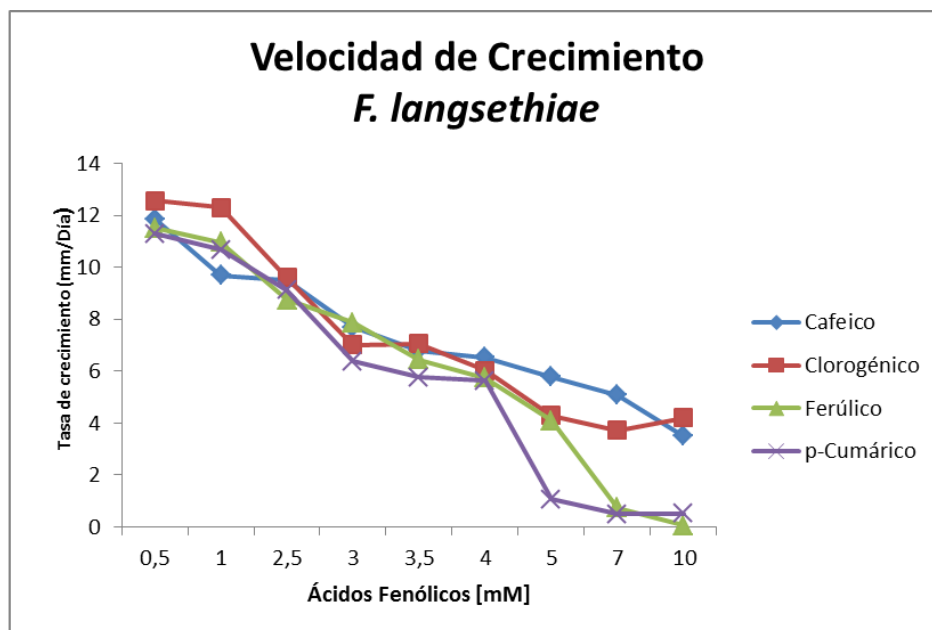


Figura 4. Efecto de las concentraciones de ácidos fenólicos sobre la tasa de velocidad de crecimiento diario de las cepas de *Fusarium*, en agar corn meal.

4.1.2. ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE MICOTOXINAS DE *FUSARIUM* SPP. POR ADICIÓN DE ÁCIDOS FENÓLICOS.

Los resultados de la producción de micotoxinas obtenidos mediante el test de cribado ROSA de flujo lateral, indican que de forma general no existen diferencias significativas entre el control y los tratamientos con ácidos fenólicos a concentraciones inhibitorias, por lo que a pesar del efecto reductor sobre el crecimiento fúngico, los ácidos fenólicos no parecen afectar a la biosíntesis de micotoxinas en las condiciones ensayadas, con algunas excepciones.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO.-

Para el análisis estadístico de la producción de micotoxinas de las cepas de *Fusarium* en maíz, se realizó un ANOVA de un factor (Analysis of Variance, en inglés) seguido de un test de comparación múltiple de Tukey ($p < 0,05$) para determinar si existen diferencias significativas entre el control y los tratamientos y entre estos últimos. El análisis estadístico fue realizado por “SPSS Statistics software version 20” (IBM Corporation). En el anexo 2 se muestran los resultados del análisis estadístico realizado para este ensayo (solo se muestran los resultados estadísticamente significativos).

A continuación se muestran los resultados obtenidos por el test de flujo lateral (ROSA) con su interpretación para cada cepa de *Fusarium*, a cada concentración de ácido fenólico ensayado.

***F. proliferatum*:** Se determinó la producción de fumonisinas totales, observando que los resultados obtenidos tanto para el control como para los ácidos fenólicos ensayados son muy variados, sin embargo no se encontraron diferencias significativas con respecto a su control y entre los tratamientos. Con lo que se puede decir que a estas concentraciones de ácidos fenólicos no se aprecia ningún efecto en cuanto a la inhibición de la síntesis de fumonisinas (Tabla 11).

Tabla 11. Producción de fumonisinas por *F. proliferatum* en granos de maíz a 25 °C durante 28 días.

CEPA	MUESTRA	Fumonisinas($\mu\text{g/g}$)			
		R1	R2	MEDIA	SD
<i>F. proliferatum</i>	Control	580	620	600	28,28
	Ácido Cafeico [7 mM]	440	520	480	56,57
	Ácido Cafeico [10 mM]	940	720	830	155,56
	Ácido Clorogénico [5mM]	780	400	590	268,70
	Ácido Clorogénico [7mM]	580	240	410	240,41
	Ácido Ferúlico [5mM]	440	460	450	14,14
	Ácido Ferúlico [7mM]	620	420	520	141,42
	Ácido <i>p</i> -Cumárico [5mM]	1080	680	880	282,84
	Ácido <i>p</i> -Cumárico [7mM]	700	700	700	0

R1: Réplica uno; R2: Réplica dos; SD: Desviación estándar; mM: Milimoles.

***F. verticillioides*:** Al igual que para *Fusarium proliferatum* se determinó la producción de fumonisinas totales. No se encontraron diferencias significativas con el control y entre los tratamientos. Excepto para el ácido *p*-cumárico a [10 mM] en el que se observa una disminución significativa en la producción de fumonisinas del 69,28 % con respecto a su control (tabla 12).

Tabla 12. Producción de fumonisinas por *F. verticillioides* en granos de maíz a 25 °C durante 28 días

CEPA	MUESTRA	Fumonisinas($\mu\text{g/g}$)			
		R1	R2	MEDIA	SD
<i>F. verticillioides</i>	CONTROL	1180	1750	1465	403,05
	Ácido Caféico [7 mM]	1500	1350	1425	106,06
	Ácido Caféico [10 mM]	1350	1350	1350	0
	Ácido Clorogénico [5mM]	600	650	625	35,35
	Ácido Clorogénico [7mM]	800	800	800	0
	Ácido Ferúlico [5mM]	800	1150	975	247,48
	Ácido Ferúlico [7mM]	1600	1350	1475	176,77
	Ácido <i>p</i> -Cumárico [7mM]	1250	1100	1175	106,06
	Ácido <i>p</i> -Cumárico [10mM]	450	450	450*	0

R1: Réplica uno; R2: Réplica dos; SD: Desviación estándar.

*Media con diferencia significativa respecto al control, con test de comparación múltiple de Tukey ($p < 0,05$).

***Gibberella zeae*:** Se determinó la producción de deoxinivalenol y zearalenona (tabla 13). En el análisis de DON en ninguno de los casos se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos y el control. En el caso de ZEA sí se encontraron diferencias significativas, produciendo un porcentaje de inhibición entre el control y los siguientes ácidos fenólicos:

Ácido clorogénico	[5 mM]	→ 61,68 %
Ácido ferúlico	[1 mM]	→ 79,21 %
Ácido ferúlico	[2,5 mM]	→ 77,64 %
Ácido <i>p</i> -cumárico	[2,5 mM]	→ 34,92 %
Ácido <i>p</i> -cumárico	[3,5 mM]	→ 47,74 %

***F.graminearum*:** Se llevó a cabo la determinación de deoxinivalenol y zearalenona. En este caso los resultados no muestran una inhibición en la producción de las micotoxinas sino que se observa un efecto potenciador en su producción, siendo significativa solo para ciertos ácidos fenólicos (tabla 14). No obstante, hay que destacar que la capacidad micotoxigénica de esta cepa de *F. graminearum* es mucho menor que la de la cepa anterior de *G. zeae*. Por ejemplo, el ensayo control de *G. zeae* produjo 110 µg/g de deoxinivalenol, frente a únicamente 5,75 µg/g en su anamorfo *F. graminearum*. Asimismo, la tasa control de zearalenona fue de 15,92 y 1,11 µg/g, respectivamente.

Tabla 13. Producción de deoxinivalenol y zearalenona por *G. zeae*^a en granos de maíz a 25 °C durante 28 días.

CEPA	MUESTRA	Deoxinivalenol(µg/g)				Zearalenona(µg/g)			
		R1	R2	MEDIA	SD	R1	R2	MEDIA	SD
<i>G. zeae</i> ^a	CONTROL	140	80	110	42,4264069	16,42	15,42	15,92	0,70
	Ácido Caféico [4mM]	120	80	100	28,2842712	17,96	14,46	16,21	2,47
	Ácido Caféico [5mM]	80	80	80	0	18,2	12,9	15,55	3,74
	Ácido Clorogénico [5mM]	180	160	170	14,1421356	5,38	6,82	6,1*	1,0
	Ácido Clorogénico [7mM]	160	200	180	28,2842712	10,24	13,82	12,03	2,53
	Ácido Ferúlico [1mM]	80	80	80	0	3,02	3,6	3,31*	0,41
	Ácido Ferúlico [2,5mM]	60	60	60	0	4,04	3,08	3,56*	0,67
	Ácido <i>p</i> -Cumárico [2,5mM]	200	180	190	14,1421356	11,68	9,04	10,36*	1,86
	Ácido <i>p</i> -Cumárico [3,5mM]	120	100	110	14,1421356	8,04	8,6	8,32*	0,39

R1: Réplica uno; R2: Réplica dos; SD: Desviación estándar.

^a Cepa en estado teleomórfico (*Gibberella zeae*), cuyo anamorfo es *F. graminearum*

*Media con diferencia significativa, con test de comparación múltiple de Tukey ($p < 0,05$).

Tabla 14. Producción de deoxinivalenol y zearalenona por *F. graminearum* en granos de maíz a 25 °C durante 28 días.

CEPA	MUESTRA	Deoxinivalenol(µg/g)				Zearalenona(µg/g)			
		R1	R2	MEDIA	SD	R1	R2	MEDIA	SD
<i>F. graminearum</i>	CONTROL	5,8	5,7	5,75	0,07071068	1,23	0,98	1,11	0,17
	Ácido Caféico [7mM]	5,5	5,7	5,6	0,14142136	2,45	1,34	1,90	0,78
	Ácido Caféico [10mM]	14	12	13*	1,41421356	6,98	7,12	7,05*	0,09
	Ácido Clorogénico [7mM]	12	17	14,5	3,53553391	8,56	6,54	7,55*	1,43
	Ácido Clorogénico [10mM]	14	16	15*	1,41421356	1,12	0,56	0,84	0,40
	Ácido Ferúlico [2,5mM]	12	15	13,5*	2,12132034	12,56	14,23	13,40*	1,18
	Ácido Ferúlico [3mM]	9	8	8,5	0,70710678	4,58	2,94	3,76	1,16
	Ácido <i>p</i> -Cumárico [4mM]	16	15	15,5*	0,70710678	3,12	4,89	4,01	1,25
	Ácido <i>p</i> -Cumárico [5mM]	6	5	5,5	0,70710678	1,80	3,42	2,61	1,15

R1: Réplica uno; R2: Réplica dos; SD: Desviación estándar.

*Media con diferencia significativa, con test de comparación múltiple de Tukey ($p < 0,05$).

4.2. DISCUSIÓN

4.2.1. DISCUSIÓN SOBRE LA INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO DE *FUSARIUM* POR ADICIÓN DE ÁCIDOS FENÓLICOS.

El presente estudio pone de manifiesto que los cuatro ácidos fenólicos estudiados (cafeico, clorogénico, ferúlico y *p*-cumárico) han conseguido inhibir significativamente el crecimiento de las cepas de *Fusarium* ensayadas (*F. verticillioides*, *F. graminearum*, *F. sporotrichioides*, *F. proliferatum* y *F. langsethiae*) sobre agar corn-meal. Este efecto es mayor para el ácido ferúlico y *p*-cumárico que consiguieron inhibir el 100 % de prácticamente todas las cepas, mientras que los ácidos cafeico y clorogénico muestran un menor grado de inhibición. En cuanto a las cepas de *Fusarium* fue *F. graminearum* la más sensible, produciéndose inhibiciones del 100 % a concentraciones por debajo de [3 mM] para los ácidos ferúlico y *p*-cumárico, y por debajo de [5 mM] para el ácido cafeico. Estudios similares han demostrado el efecto inhibitorio de ciertos ácidos fenólicos sobre el crecimiento de varios mohos. Como es el caso de (Nesci, *et al.*, 2009) que demostraron que el ácido trans-cinámico y el ácido ferúlico a concentraciones de 10-20 mM son capaces de inhibir de forma significativa el crecimiento de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* en medios de Czapek Dox (CD) y en agar corn meal extract (MMEA).

Así también (Torres, *et al.*, 2003) demostraron que los antioxidantes hidroxibutilanisol (BHA) y propil parabeno (PP) a concentraciones de 500 µg/g y a una a_w de 0,95 son capaces de inhibir significativamente el crecimiento de las cepas de *Fusarium verticillioides* y *Fusarium proliferatum*.

4.2.2. DISCUSIÓN SOBRE LA PRODUCCIÓN DE MICOTOXINAS DE *FUSARIUM* POR ADICIÓN DE ÁCIDOS FENÓLICOS.

Nuestros resultados demuestran que de forma general sí que existen variaciones en la producción de micotoxinas con respecto a los controles, pero estas diferencias no son estadísticamente significativas salvo en algún caso, con lo que podemos decir que a las concentraciones de trabajo de los ácidos fenólicos no se produce el efecto deseado en la inhibición de la biosíntesis de micotoxinas por las cepas de *Fusarium* estudiadas, incluso en algunos casos parase haber un efecto potenciador de la producción de estas micotoxinas.

D'Mello et al. (1998), en una revisión bibliográfica sobre estudios in vitro concluyeron que los fungicidas fueron en gran medida ineficaces para controlar la producción de micotoxinas de *Fusarium*. Por otra parte, una revisión de Moss (1991) sobre los efectos de una serie de biocidas en la producción de micotoxinas y el crecimiento del micelio de los hongos toxigénicos en los cereales, llegó a la conclusión de que pueden observarse un amplio espectro de actividades que van desde la inhibición completa de la producción de micotoxinas, con poco efecto sobre el crecimiento micelial, al incremento de la formación de micotoxinas con la inhibición parcial de crecimiento.

5. CONCLUSIONES

Primera

Se ha realizado una puesta a punto de un método de determinación *in vitro* de la inhibición del crecimiento de *Fusarium* basado en la utilización del agar Corn Meal, la inoculación a partir de cultivos puros y la evaluación del porcentaje de inhibición y de la tasa de crecimiento, método que ha mostrado su utilidad con seis cepas de referencia enfrentadas a cuatro ácidos fenólicos.

Segunda

Se ha realizado una puesta a punto de un método *in vitro* para la biosíntesis de toxinas de *Fusarium*, basado en la inoculación de una suspensión de esporas fúngicas en granos de maíz rehidratados e incubación durante 28 días, obteniendo concentraciones significativas de fumonisinas, zearalenona y deoxinivalenol a partir de cepas de referencia. Este modelo ha permitido ensayar el efecto de los ácidos fenólicos sobre la síntesis de toxinas de *Fusarium*, utilizando técnicas inmunoquímicas (test de cribado ROSA de flujo lateral) para la cuantificación de las micotoxinas.

Tercera

Las especies *F. verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. graminearum* (y su teleomorfo *G. zae*), *F. sporotrichioides* y *F. langsethiae* se han mostrado sensibles a los ácidos fenólicos ensayados (cafeico, clorogénico, ferúlico y *p*-cumárico) en concentraciones de 0,5 a 10 mM, ya que se ha reducido su tasa de crecimiento en agar corn meal, con porcentajes de inhibición de hasta 100% dependiendo de la cepa, el ácido fenólico y la dosis utilizada.

Cuarta

Los ácidos ferúlico y *p*-cumárico se han mostrado muy eficaces en la inhibición del crecimiento de los fusarios toxigénicos, ya que a concentraciones por encima de 7 mM producen una inhibición total del crecimiento de las cepas de *Fusarium* ensayadas. Sin embargo, los ácidos cafeico y clorogénico a las concentraciones más altas del ensayo (10 mM) no consiguen inhibir totalmente el crecimiento de las cepas de *Fusarium* ensayadas, excepto para *F. graminearum* en su forma teleomórfica (*G. zae*)

Quinta

La cepa de *Fusarium* más sensible al tratamiento con ácidos fenólicos en agar Corn Meal fue *Fusarium graminearum*, tanto en su forma teleomórfica como en su forma asexual. Esto podría tener importancia agronómica ya que se trata de un hongo fitopatógeno causante de plagas en cereales como trigo y maíz, que habitualmente puede sintetizar micotoxinas en los granos en la fase de pre-cosecha.

Sexta

Los resultados de la producción de micotoxinas obtenidos mediante el test de cribado ROSA de flujo lateral, indican que de forma general no existen diferencias significativas entre el control y los tratamientos con ácidos fenólicos a concentraciones inhibitorias, por lo que a pesar del efecto reductor del crecimiento fúngico, los ácidos fenólicos no parecen afectar a la biosíntesis de micotoxinas en las condiciones ensayadas, salvo en el caso de la producción de zearalenona por *G. zaeae*. No obstante, en algunos ensayos ha habido una disminución significativa (caso de las fumonisinas y el ácido p-cumárico en *F. verticillioides*), mientras que en otros se ha estimulado aparentemente la síntesis de toxinas (caso de deoxinivalenol para los 4 ácidos ensayados en *F. graminearum*).

Séptima

A falta de completar los ensayos, los resultados obtenidos indican la dificultad de correlacionar los estudios de inhibición *in vitro* del crecimiento fúngico con los de biosíntesis de micotoxinas, hecho que ya ha sido observado por algunos autores en la búsqueda de fungicidas de aplicación en campo, y que es una muestra de las complejas relaciones entre los mohos y sus toxinas, las plantas, los agentes biocidas y los factores externos.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Adorn K, Liu R.H., (2002). Antioxidant activity of grains. *Journal. Agric. Food Chemistry*. 50: 6182-6187.
- Ariño A., Herrera M., Juan T., Estopañan G., Carramiñana J.J., Rota C. y Herrera A. (2009). Influence of agricultural practices on the contamination of maize by fumonisin mycotoxins. *Journal of food Protection* 72: 898-902.
- Atasanova-Penichon, Boutigny A.L., Barreau C., Richard-Forget F. (2008). Efficiency of monomeric and oligomeric forms of phenolic acids extracted from wheat durum bran to modulate TCTB biosynthesis by *Fusarium*. *Cereal Research Communications* 36: 471-472.
- Bakan B., Melcion D., Richard-Molard D., Cahagnier B. (2003). Fungal growth and *Fusarium* mycotoxin content in isogenic traditional maize and genetically modified maize grown in France and Spain. *J. Agric. Food Chem.* 50: 728-731.
- Bottalico A., (1998). *Fusarium* diseases of cereals: species complex and related mycotoxin profiles in Europe. *Journal of Plant Pathology* 80,85- 103.
- Boutigny A.L., Barreau C., Atanasova-Penichon V., Verdal-Bonin M.N., Pinson-Gadías L., Richard-Forget F. (2009). Ferulic acid, an efficient inhibitor of type B trichothecene biosynthesis and *Tri* gene expression in *Fusarium* liquid cultures. *Mycological Research* 113: 746-753.
- Boutigny A.L., Barreau C., Atanasova-Penichon V., Benet M., Richard-Forget F. (2010). Natural phenolic acids from wheat brain inhibit *Fusarium culmorum* trichothecene biosynthesis *in vitro* by repressing *Tri* gene expression. *European Journal of Plant Pathology* 127: 275-286.
- CE (Comisión Europea) 2003. Report on expert participating in SCOOP task 3.2.10. Collection of occurrence data of *Fusarium* toxins in food and assessment of dietary intake by the population of EU member states. Brussels, Directorate General Health and Consumer Protection.

- Dai G.H., Andary C., Mondolot-Cosson L., Boubals D. (1995). Involvement of phenolic compounds in the resistance of grapevine callus to downy mildew (*Plasmopara viticola*). *Europ. J. Plant Pathol.* 101: 541-547.
- De la Parra Insfran D., Brenes H., Serna S., Talcott T., (2007). Polyphenolic and antioxidant activity of corn for production of masa, tortillas, and tortilla chips. *Jouranl Agric. Food Chemistry.* 55: 4177-4183.
- Desjardins A.E., Proctor R.H., (2007). Molecular biology of *Fusarium* mycotoxins. *International Journal of Food Microbiology* 199: 47-50.
- Desjardins A.E. (2006). *Fusarium* Mycotoxins: Chemistry, Genetics, and Biology. APS Press, St. Paul Minnesota, USA.
- D'Mello, J.F.P., Macdonald, M.C., Postel, D., Dijksma, W.T.P., Dujardin, A., Placinta, C.M. (1998). Pesticide use and mycotoxin production in *Fusarium* and *Aspergillus* phytopathogens. *Eur. J. Plant Pathol.*, 104, 741-751.
- EMAN (European Mycotoxin Awareness Network) Disponible en: <http://www.mycotoxins.org/>
- FAO (2004). Reglamentos a nivel mundial para las micotoxinas en los Alimentos y en las Raciones en el año 2003- Estudio FAO: Alimentación y Nutrición N°81.
- Farnochi M. C., Torres A.M., Magan N., Chulze S.N., (2005). Effect of antioxidants and competing mycelfora on *Fusarium verticillioides* and *F. proliferatum* populations and fumonisin production on maize grain. *Journal of Stored Products Research* 41: 211-219.
- Fosseen T., Slimestad R., Andersen M.O. (2001). Anthocyanins from maize (*Zea mays* L.) and reed canarygrass (*Phalaris arundinacea*). *J. Agric. Food Chem.* 49: 2318-2321.
- Glenn, A.E. (2007). Mycotoxigenic *Fusarium* species in animal feed. *Animal Feed Science and Technology.* 137:213-240.
- Herrera M., Conchello P., Juan T., Estopañan G., Herrera A. y Ariño A. (2010). Fumonisin concentrations in maize as affected by physico-chemical, environmental and agronomical conditions. *Maydica* 55(2): 121-126.
- IARC (International Agency for Research of Cancer) (1993). Some Naturally Occurring Substances Food Items and Constituents. I

- IARC (International Agency for Research of Cancer) (2002). Some herbal traditional medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. IARC Monographs volume 82.
- Jean Pierre J. (2007). Methods for preventing, decontaminating and minimizing the toxicity of mycotoxins in feeds. *Animal Feed Science and Technology*. 137:342-362.
- JECFA. Codex Committee on Contaminants in foods (2010). Proposed draft maximum levels for fumonisins in maize and maize products and associates sampling plans.
- Jing P., Giusti M. N. (2005). Characterization of anthocyanin-rich waste from purple corn cobs (*Zea mays* L.) and its application to color milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53: 8775-8781.
- Lauren D.R., Ringrose M.A. (1997). Determination of the fate of three *Fusarium* mycotoxins through wet-milling of maize using an improved HPLC analytical technique. *Food Additives and Contaminants*. 14: 435-443.
- Magan N., Aldred D., Sanchis V. (2004). The role of spoilage fungi in seed deterioration. In: Arora, D.K. (Ed.), *Fungal Biotechnology in Agricultural, Food and Environmental Applications*. Marcel Dekker, New York, pp. 311-323
- Marasas WFO; Miller J.D., Riley R.T., Visconti A. (1999). Fumonisin B1. *Environmental health criteria*, 219. WHO.
- Marín S., Velluti A., Ramos A., Sanchis V. (2004). *Food Microbiology*. 21:313-318.
- Moss, M.O. (1991). Influence of agricultural biocides on mycotoxin formation in cereals. *Developments in Food Science*, 26, 281-295.
- Muscarella M., Lo Magro S., Nardiello D., Palermo C., Centonze D. (2008). Development of a new analytical method for determination of fumonisins B1 and B2 in food products based on high performance liquid chromatography A, 1203: 88-93.
- Nesci A., Marin S., Etcheverry M., Sanchis V. (2009). Natural maize phytochemicals for control of maize mycoflora and aflatoxigenic fungi. *World Mycotoxin Journal* 2: 305-312.
- Norton B. W. (1999). The significance of tannins in tropic animal production. *Tannin Livestock Human Nutr*. 92: 14-23

- Pascal T., Santos B.C., Rivas G.J.C. (2002). LCMS analysis of anthocyanins from purple corn cob. *J. Sci. Food. Agric.* 82: 1003-1006.
- Pestka J.J., Bondy G.S. (1994). Immunotoxic effects of mycotoxins. In: Miller J.D., Trenholm H.L., (Eds), *Mycotoxins in Grain-Compounds other than Aflatoxin*. Eagan Press, St. Paul 339-358.
- Piironen V., Lampi A.M., Ekholm P., Salmenkallio-Marttila M., Liukkonen K.H. (2008). Micronutrients and phytochemicals in wheat grain In *Wheat: Chemistry and Technology*, 4th ed.; Khan K., Shewry P.R., Eds.; AACC: St. Paul, MN.
- Reglamento (CE) n° 1126/2007 de la Comisión, de 28 de septiembre de 2007 que modifica el Reglamento (CE) n° 1881/2006 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios por lo que se refiere a las toxinas de *Fusarium* en el maíz y los productos del maíz. DO L 225: 14-17.
- Richard J.L. (2007). Some major mycotoxins and their mycotoxicoses – an overview. *International Journal of food Microbiology* 119: 3-10.
- Richard J.L. (2000). Mycotoxins - an overview. In: Richard J.L. (Ed.), *Romer Labs`guide to Mycotoxins*, 1: 1-48.
- Richard J.L. (1998) Mycotoxins, toxicity and metabolism in animals – a system approach overview. In Miraglia M., van Egmond H.P., Brera C., Gilbert J. (Eds). *Mycotoxins and Phycotoxins-Developments in Chemistry, Toxicology and Food Safety*. Alaken, Inc., Fort Collins 363-397.
- Ruiz N., Sánchez F., Hernández V., Figueroa D., Loarca G. (2008). Determinación de Compuestos Fenólicos y su Actividad Antioxidante en Granos de Maíz. *Sociedad Mexicana de Fitogenética*, A. C.
- Sáenz de Rodríguez C.A., Bongiovanni A.M., Conde de Borrego L. (1985). An epidemic of precocious development in Puerto Rico children. *J. Pediatr.* 107: 393-396.
- Sanchis V., Marín S., Ramos A. J. (2000). Control de las micotoxinas emergentes. Situación legislativa actual. *Rev. Iberoam. Micol.*, 17: S69-S75.
- Samapundo S., Devlieghere F., Meulenaer B., Lamboni Y., Osei-Nimoh D., Debere J. M. (2007). Interaction of water activity and bicarbonate salts in the inhibition of growth and

- mycotoxin production by *Fusarium* and *Aspergillus* species of importance to corn. International Journal of Food Microbiology 116:266-274.
- Saulnier L., Sado P., Branlard G., Charmet G., Guillon F. (2007). Wheat arabinoxylans: exploiting variation in amount and composition to develop enhanced varieties. J. Cereal Sci. 46: 261-281.
- Soriano J. M. et al., (2007). Micotoxinas en Alimentos. Ediciones Díaz Santos, ISBN: 978-84-7978-808-7.
- Sosulski F., Krygier K., Hogge L. (1982). Free, esterified, and insoluble bound phenolic acids. 3. Composition of phenolic acids in cereals and potato flours. J. Agric. Food Chem. 30: 337-340.
- Stockmann-Juvala H., Savolainen K. (2008). A review of the toxic effects and mechanisms of action of fumonisin B1. Hum. Exp. Toxicol., 27, 799-809.
- Turner N.W., Subrahmanyam S., Piletsky S.A. (2009). Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. Analytica Chimica Acta 632: 168-180.
- Torp M., Adler A. (2004). The European Sporotrichiella 309 Project: a polyphasic approach to the biology of new *Fusarium* species. International Journal of Food Microbiology 95: 257-266.
- Torp M., Nirenberg H.I. (2004). *Fusarium langsethiae* sp. nov. on cereals in Europe. International Journal of Food Microbiology 95: 247-256.
- Torres A. M., Ramirez M. L., Arroyo M., Chulze S.N., Magan N. (2003). Potential use of antioxidants for control of growth and fumonisin production by *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum* on whole maize grain. International Journal of Food Microbiology 83: 319-324.
- Weidenbörner M. (2001). Encyclopedia of Food Mycotoxins. ISBN: 3540675566.
- Zhao Z., Moghadasin M.H., (2008). Chemistry, natural sources, dietary intake and pharmacokinetic properties of ferulic acid: A review. Food Chemistry 109: 691-702.

7. ANEXOS

ANEXO 1

Tabla con los cálculos de Correlación de los resultados del estudio de la inhibición del crecimiento de *Fusarium* spp.

Cepa	Ácido fenólico	Coeficiente de correlación	Coeficiente de Determinación(R ²)	p-valor
<i>F. proliferatum</i>	Ácido Cafeico	-0,984	0,968	< 0,001
	Ácido Clorogénico	-0,851	0,724	< 0,001
	Ácido Ferúlico	-0,958	0,917	< 0,001
	Ácido p-cumárico	-0,965	0,931	< 0,001
<i>F. verticillioides</i>	Ácido Cafeico	-0,977	0,954	< 0,001
	Ácido Clorogénico	-0,869	0,756	< 0,001
	Ácido Ferúlico	-0,919	0,845	< 0,001
	Ácido p-cumárico	-0,907	0,823	< 0,001
<i>F. graminearum</i>	Ácido Cafeico	-0,961	0,923	< 0,001
	Ácido Clorogénico	-0,931	0,867	< 0,001
	Ácido Ferúlico	-0,885	0,783	< 0,001
	Ácido p-cumárico	-0,948	0,899	< 0,001
<i>Gibberella zeae</i>	Ácido Cafeico	-0,828	0,685	0,00311663
	Ácido Clorogénico	-0,945	0,894	< 0,001
	Ácido Ferúlico	-0,927	0,859	0,00266052
	Ácido p-cumárico	-0,880	0,775	0,00891095
<i>F. langsethiae</i>	Ácido Cafeico	-0,965	0,930	< 0,001
	Ácido Clorogénico	-0,899	0,809	< 0,001
	Ácido Ferúlico	-0,970	0,940	< 0,001
	Ácido p-cumárico	-0,933	0,871	< 0,001
<i>F. sporotrichioides</i>	Ácido Cafeico	-0,955	0,911	< 0,001
	Ácido Clorogénico	-0,941	0,886	< 0,001
	Ácido Ferúlico	-0,917	0,841	< 0,001
	Ácido p-cumárico	-0,949	0,900	< 0,001

ANEXO 2

Test de Tukey de Comparaciones múltiples.

Fusarium verticillioides / Fumonisin.

Ácido *p*-cumárico.

(I) Concentración [mM]	(J) Concentración [mM]	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
0,00	7,00	1015,00000 *	240,62419	,049	9,4994	2020,5006
	10,00	290,00000	240,62419	,527	-715,5006	1295,5006
7,00	0,00	-1015,00000 *	240,62419	,049	-2020,5006	-9,4994
	10,00	-725,00000	240,62419	,112	-1730,5006	280,5006
10,00	0,00	-290,00000	240,62419	,527	-1295,5006	715,5006
	7,00	725,00000	240,62419	,112	-280,5006	1730,5006

*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

Gibberella zeae / Zearalenona.

Ácido clorogénico.

(I) Concentración [mM]	(J) Concentración [mM]	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
0,00	5,00	9,82000 *	1,62737	,019	3,0197	16,6203
	7,00	3,89000	1,62737	,184	-2,9103	10,6903
5,00	0,00	-9,82000 *	1,62737	,019	-16,6203	-3,0197
	7,00	-5,93000	1,62737	,071	-12,7303	,8703
7,00	0,00	-3,89000	1,62737	,184	-10,6903	2,9103
	5,00	5,93000	1,62737	,071	-,8703	12,7303

*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

Gibberella zeae* / Zearalenona.*Ácido ferúlico**

(I) Concentración [mM]	(J) Concentración [mM]	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
0,00	1,00	12,61000 *	,61346	,001	10,0465	15,1735
	2,50	12,36000 *	,61346	,001	9,7965	14,9235
1,00	0,00	-12,61000 *	,61346	,001	-15,1735	-10,0465
	2,50	-,25000	,61346	,915	-2,8135	2,3135
2,50	0,00	-12,36000 *	,61346	,001	-14,9235	-9,7965
	1,00	,25000	,61346	,915	-2,3135	2,8135

*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

Gibberella zeae* / Zearalenona.*Ácido *p*-cumárico**

(I) Concentración [mM]	(J) Concentración [mM]	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
0,00	2,50	5,56000 *	1,17496	,036	,6502	10,4698
	3,50	7,60000 *	1,17496	,015	2,6902	12,5098
2,50	0,00	-5,56000 *	1,17496	,036	-10,4698	-,6502
	3,50	2,04000	1,17496	,328	-2,8698	6,9498
3,50	0,00	-7,60000 *	1,17496	,015	-12,5098	-2,6902
	2,50	-2,04000	1,17496	,328	-6,9498	2,8698

*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

***Fusarium graminearum* / Deoxinivalenol**

Ácido cafeico						
(I) Concentración [mM]	(J) Concentración [mM]	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
0,00	7,00	,15000	,82158	,982	-3,2832	3,5832
	10,00	-7,25000 [*]	,82158	,006	-10,6832	-3,8168
7,00	0,00	-,15000	,82158	,982	-3,5832	3,2832
	10,00	-7,40000 [*]	,82158	,006	-10,8332	-3,9668
10,00	0,00	7,25000 [*]	,82158	,006	3,8168	10,6832
	7,00	7,40000 [*]	,82158	,006	3,9668	10,8332

*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

***Fusarium graminearum* / Deoxinivalenol**

Ácido clorogénico						
(I) Concentración [mM]	(J) Concentración [mM]	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
0,00	7,00	-8,75000	2,19886	,057	-17,9384	,4384
	10,00	-9,25000 [*]	2,19886	,049	-18,4384	-,0616
7,00	0,00	8,75000	2,19886	,057	-,4384	17,9384
	10,00	-,50000	2,19886	,972	-9,6884	8,6884
10,00	0,00	9,25000 [*]	2,19886	,049	,0616	18,4384
	7,00	,50000	2,19886	,972	-8,6884	9,6884

*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

***Fusarium graminearum* / Deoxinivalenol**

Ácido ferúlico						
(I) Concentración [mM]	(J) Concentración [mM]	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
0,00	2,50	-7,75000 *	1,29164	,019	-13,1474	-2,3526
	3,00	-2,75000	1,29164	,231	-8,1474	2,6474
2,50	0,00	7,75000 *	1,29164	,019	2,3526	13,1474
	3,00	5,00000	1,29164	,061	-,3974	10,3974
3,00	0,00	2,75000	1,29164	,231	-2,6474	8,1474
	2,50	-5,00000	1,29164	,061	-10,3974	,3974

*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

***Fusarium graminearum* / Deoxinivalenol**

Ácido <i>p</i> -cumárico						
(I) Concentración [mM]	(J) Concentración [mM]	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
0,00	4,00	-9,75000 *	,57879	,001	-12,1686	-7,3314
	5,00	,25000	,57879	,905	-2,1686	2,6686
4,00	0,00	9,75000 *	,57879	,001	7,3314	12,1686
	5,00	10,00000 *	,57879	,001	7,5814	12,4186
5,00	0,00	-,25000	,57879	,905	-2,6686	2,1686
	4,00	-10,00000 *	,57879	,001	-12,4186	-7,5814

*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

Fusarium graminearum* / Zearalenona*Ácido cafeico**

(I) Concentración [mM]	(J) Concentración [mM]	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
0,00	7,00	-,79000	,46801	,343	-2,7457	1,1657
	10,00	-5,94500 *	,46801	,002	-7,9007	-3,9893
7,00	0,00	,79000	,46801	,343	-1,1657	2,7457
	10,00	-5,15500 *	,46801	,003	-7,1107	-3,1993
10,00	0,00	5,94500 *	,46801	,002	3,9893	7,9007
	7,00	5,15500 *	,46801	,003	3,1993	7,1107

*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

Fusarium graminearum* / Zearalenona*Ácido clorogénico**

(I) Concentración [mM]	(J) Concentración [mM]	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
0,00	7,00	-6,44500 *	,86183	,010	-10,0463	-2,8437
	10,00	,26500	,86183	,950	-3,3363	3,8663
7,00	0,00	6,44500 *	,86183	,010	2,8437	10,0463
	10,00	6,71000 *	,86183	,009	3,1087	10,3113
10,00	0,00	-,26500	,86183	,950	-3,8663	3,3363
	7,00	-6,71000 *	,86183	,009	-10,3113	-3,1087

*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

Fusarium graminearum / Zearalenona

Ácido ferúlico						
(I) Concentración [mM]	(J) Concentración [mM]	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
0,00	2,50	-3,84500 [*]	,68825	,023	-6,7210	-,9690
	3,00	-2,65500	,68825	,061	-5,5310	,2210
2,50	0,00	3,84500 [*]	,68825	,023	,9690	6,7210
	3,00	1,19000	,68825	,330	-1,6860	4,0660
3,00	0,00	2,65500	,68825	,061	-,2210	5,5310
	2,50	-1,19000	,68825	,330	-4,0660	1,6860

*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.