



**UNIVERSIDAD DEL AZUAY**  
**FACULTAD DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA**  
**ESCUELA DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS**

**“AISLAMIENTO DE HONGOS PRODUCTORES DE  
MICOTOXINAS PRESENTES EN GRANOS DE CEREALES  
EXPENDIDOS EN LA CIUDAD DE CUENCA Y GRADO  
RESIDUAL EN PRODUCTOS ELABORADOS A PARTIR DE  
DICHOS CEREALES”**

*Trabajo de Graduación previo a la obtención del título de Ingeniero en  
Alimentos*

AUTORES:

GONZALO JAVIER ASTUDILLO OCHOA  
ANIBAL FLORENCIO NACIPUCHA ASTUDILLO

DIRECTORA:

DRA. MARIA ELENA CAZAR

CUENCA - ECUADOR

2010

**DEDICATORIA:**

ANIBAL: el presente trabajo se lo dedico a mis padres, a mi esposa, a mis hijos y hermanos que siempre me brindaron su apoyo y me dieron fuerzas para seguir adelante.

JAVIER: se lo dedico a mis padres, mis hermanas y mi novia que siempre me aconsejaron para seguir adelante y sacar este trabajo.

## **AGRADECIMIENTO**

- A Dios que siempre fue nuestra fortaleza durante el trabajo de graduación
- Nuestro más sincero agradecimiento a la Dra. María Elena Cazar Ramírez por su asesoría científica y técnica, por brindarnos la confianza y amistad desinteresada durante el proyecto realizado, y sobre todo por mostrarnos la calidad de persona que es.
- Agradecemos al personal de laboratorio de la facultad de ciencia y tecnología de la Universidad del Azuay por todo el apoyo brindado.

## RESUMEN

El presente trabajo se realizó con el objetivo de verificar la presencia de hongos productores de micotoxinas en granos de cereal expendidos en diferentes mercados de la ciudad, y su resistencia al tratamiento térmico empleado en la elaboración de productos derivados. Para la obtención y purificación de aislados fungales se utilizaron muestras de granos colectados en mercados locales. Los hongos aislados fueron identificados por técnicas de microscopía. Se separaron varios metabolitos secundarios por métodos cromatográficos. La identificación de micotoxinas se desarrolló comparando los factores de retención cromatográfica usando sistemas de solventes y reveladores descritos en bibliografía. Con esta estrategia se logró identificar siete micotoxinas en los cereales evaluados.

### **ABSTRACT**

The aim of the present work was to isolate mycotoxins producers fungi from cereal grains sold at markets from Cuenca. The persistence of mycotoxins at thermal conditions used in food elaboration processes was assessed. Fungal strains were isolated and purified from grains collected at local markets. Fungi were identified by microscopy techniques. Several secondary metabolites were isolated by chromatographic methods, Mycotoxins identification was performed comparing retention index with different solvent systems and color reagents. The use of this strategy allowed us to identify seven mycotoxins in the grains tested.

## INDICE DE CONTENIDOS

Dedicatoria	ii
Agradecimiento	iii
Resumen	iv
Abstract	v
Índice de Contenidos	vi
Índice de Ilustraciones y cuadros	ix

<b>INTRODUCCION</b>	<b>1</b>
---------------------	----------

### **CAPÍTULO 1: CEREALES**

1.1 Cereales: Concepto y Generalidades	3
1.2 Clasificación de los cereales	5
1.3 Propiedades	6
1.3.1 Valor Nutritivo y Salud	6
1.4 Procesamiento y Factores que inciden en alteración de cereales	7
1.5 Cereales utilizados en la producción de alimentos	9
1.5.1 Maíz	10
1.5.2 Trigo	12
1.6 Derivados más comunes del procesamiento de cereales	14
1.6.1 Harina	14
1.6.2 Pan	14
1.6.3 Pastas Alimenticias	15

**CAPÍTULO 2: MICOTOXINAS**

2.1 Generalidades	17
2.2 Producción de Micotoxinas: rol en el metabolismo fungal	18
2.3 Micotoxinas de Hongos Imperfectos	18
2.3.1 Principales Micotoxinas y su Clasificación	19
2.3.1.1 Aflatoxinas	20
2.3.1.2 Ocratoxinas	21
2.3.1.3 Zearaleona	21
2.3.1.4 Tricotecenos	21
2.4 Contaminación de Alimentos con Micotoxinas	21

**CAPÍTULO 3: MATERIALES Y METODOS**

3.1 Materiales, Reactivos y Equipos	24
3.1.1 Material de laboratorio	24
3.1.2 Equipos	25
3.1.3 Solventes y Reactivos	25
3.1.4 Suministros	25
3.1.5 Muestras de cereales	25
3.2 Metodología	26
3.2.1 Obtención de muestras de cereales contaminados	26
3.2.2 Formulación de medios de cultivo	26
3.2.2.1 Agar papa glucosa (PDA)	26
3.2.2.2 Agar levadura-malta-glucosa (YMG)	27
3.2.3 Aislamiento de especies fungales	27
3.2.3.1 Aislamiento de hongos a partir de granos de cereal	27
3.2.3.2 Aislamiento de hongos a partir de harina	28
3.2.4 Cultivos a Escala Analítica	28
3.2.5 Obtención de extractos	28

3.2.5.1 Obtención de extractos de cultivos a escala	
Analítica	29
3.2.6 Identificación de micotoxinas por cromatografía en	
capa fina	29
3.2.6.1 Cromatografía de muestras a partir del aislamiento	
de Hongos	29
3.2.6.2 Identificación de micotoxinas mediante revelado	
Cromatográfico	31
3.3 Elaboración de productos a partir de cereales en estudio	32
3.3.1 Elaboración de pan de trigo	33
3.3.2 Elaboración de fideos e trigo	34
3.3.3 Elaboración de tortillas de maíz	35

#### **CAPÍTULO 4: RESULTADOS**

4.1 Recolección de muestras de mercados locales	36
4.2 Aislamiento de especies fungales	36
4.3 Obtención de extractos y estudio cromatográfico	37
4.4 Identificación de Micotoxinas por Cromatografía en Capa Fina	39

<b>CONCLUSIONES</b>	43
---------------------	----

<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	45
---------------------	----

## ÍNDICE DE ILUSTRACIONES Y CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Información nutricional del maíz	11
<b>Cuadro 2.</b> Información nutricional del trigo	13
<b>Cuadro 3.</b> Principales micotoxinas y su clasificación	19
<b>Cuadro 4.</b> Algunas micotoxinas presentes en alimentos y sus Efectos en la salud	23
<b>Cuadro 5.</b> Composición para el Agar (PDA	26
<b>Cuadro 6.</b> Composición para el Agar (YMG	27
<b>Cuadro 7.</b> Fases móviles utilizadas en las cromatografías	30
<b>Cuadro 8.</b> Genero de los aislados fungales obtenidos a partir de muestras de cereales	37
<b>Cuadro 9.</b> Formulación de las fases móviles para estudio Cromatografico	38
<b>Cuadro10.</b> Resultados del análisis cromatografico de extractos de hongos, con el uso de reveladores físicos químicos	40
<b>Cuadro11.</b> Comparación de datos experimentales obtenidos en el desarrollo cromatografico de los extractos fungales con datos bibliográficos	41
<b>Cuadro12.</b> Comparación de datos experimentales obtenidos en el desarrollo cromatografico de los extractos fungales con datos bibliográficos	41
<b>Esquema 1.</b> Diagrama de proceso para la elaboración de pan de trigo	33
<b>Esquema 2.</b> Diagrama de proceso para la elaboración de fideos de Trigo	34
<b>Esquema 3.</b> Diagrama de proceso para la elaboración de tortillas de Maíz	35
<b>Figura 1.</b> Muestras de cereales realizados en el trabajo de graduación	9
<b>Figura 2.</b> Estructura de algunas aflotoxinas	20
<b>Figura 3.</b> Productos elaborados por los cereales en estudio	26

<b>Figura 4.</b> Extracción mediante volumen similar de acetato de etilo	29
<b>Figura 5.</b> Perfil cromatografico de extractos obtenidos de los hongos en Estudio	38

Astudillo Ochoa Gonzalo Javier  
Nacipucha Astudillo Anibal Nacipucha  
Trabajo de Graduación  
Dra. María Elena Cazar  
Febrero del 2010

**“AISLAMIENTO DE HONGOS PRODUCTORES DE MICOTOXINAS PRESENTES EN GRANOS DE CEREALES EXPENDIDOS EN LA CIUDAD DE CUENCA Y GRADO RESIDUAL EN PRODUCTOS ELABORADOS A PARTIR DE DICHOS CEREALES”**

**INTRODUCCION**

La mayoría de los cereales y productos derivados tiene un contenido tan bajo de humedad que si se conservan secos se evita fácilmente el crecimiento microbiano. Para una correcta conservación del producto se deben tomar en cuenta los siguientes parámetros: asepsia, calor, temperaturas bajas, conservantes químicos, radiaciones.

Ante la necesidad de tener un producto de óptima calidad y libre de cualquier riesgo de alteración, el control de calidad de alimentos desarrolla análisis microbiológicos, los cuales se enfocan al aseguramiento de calidad de los productos alimenticios, monitoreando posibles contaminaciones microbianas.

Si las condiciones de almacenamiento y preparación son las adecuadas, ni los granos de cereales, ni sus harinas deberían sufrir alteraciones microbianas, ya que no contienen cantidad de agua suficiente para permitir el desarrollo de mohos. Si la humedad aumenta hasta exceder el mínimo necesario para el desarrollo microbiano, los gérmenes se multiplican inmediatamente. Una humedad escasa permite únicamente el desarrollo de mohos. Si es más abundante crecerán también bacterias y levaduras

Aunque la carga microbiana de los granos de cereales no constituye, por sí mismo, un problema, se debe valorar el número y clase de los microorganismos presentes, ya que estos productos se usan en la formulación de otros alimentos. La contaminación microbiana de los granos de cereales y de sus harinas tiene importancia desde el punto de vista de la salud pública y como causa de posibles alteraciones de los alimentos. Este problema, asociado con factores como la humedad y manipulación favorece el crecimiento de mohos, algunos de los cuales producen micotoxinas que son metabolitos tóxicos. La ingestión de alimentos

contaminados con micotoxinas tiene efectos adversos en la salud del hombre y animales.

Los factores más importantes que influyen en la alteración por mohos de los granos almacenados hacen referencia al contenido microbiano, niveles de humedad entre 12 y 13%, lesiones físicas y temperatura. Son numerosos los mohos que pueden afectar a estos productos, las especies más comunes corresponden a *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*, y muchos de estos pueden producir micotoxinas.

Las micotoxinas son metabolitos tóxicos elaborados por mohos en los alimentos. Las micotoxinas contaminan alrededor del 25% de los alimentos disponibles a nivel mundial. Aproximadamente 300 de estos compuestos son conocidos, de los cuales 20 son considerados contaminantes de cultivos utilizados en alimentación humana y animal. Las más comunes son las aflatoxinas de *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* y *A. nonius*. La ingestión de estos alimentos, si la sustancia toxica está en cantidad suficiente, provoca una intoxicación en el hombre o en los animales (Carlile *et al.*, 2001).

Las micotoxinas son productos del metabolismo secundario de los mohos. Es por esta razón por la que no es suficiente con detectar en un alimento una especie de moho tóxico para considerar el alimento peligroso. Existe una presunción de toxicidad, pero es necesario investigar y determinar la concentración de micotoxinas antes de declarar al alimento impropio para el consumo. Por estas razones, el aislamiento de micotoxinas en cereales y productos derivados es un tema de investigación importante, tanto para los consumidores como para potenciales usos en industrias alimenticias.

En este informe se presentan el trabajo metodológico y los resultados obtenidos, que permitieron dar cumplimiento a los objetivos planteados para el trabajo experimental.

## CAPITULO 1

### CEREALES

#### Introducción

En este capítulo se abordarán todos los conceptos relacionados con los cereales, sus generalidades, clasificación, propiedades y alteraciones de las condiciones normales para el almacenamiento que llevan a la producción de micotoxinas.

#### 1.1 CEREALES: CONCEPTO Y GENERALIDADES

La palabra *cereal* proviene del latín *cereales*, más concretamente de la palabra *cerialia*. Este era el término con el que los antiguos romanos designaban las fiestas en honor de Ceres, diosa de los granos, conocida también como Deméter, tierra madre, pues se la consideraba protectora de la agricultura y de los cereales.

Los cereales son un conjunto de plantas herbáceas cuyos granos o semillas se emplean para la alimentación humana o del ganado, generalmente molidos en forma de harina, pertenecientes a la familia de las gramíneas.

Las gramíneas, constituyen una extensa familia de plantas con flor, la más importante del mundo desde los puntos de vista económico y ecológico. La familia contiene unos 635 géneros y 9.000 especies, y es la cuarta más extensa después de Leguminosas, Orquidáceas y Compuestas. A esta familia también se la conoce con el nombre de Poáceas. (Rico Hernández 2006)

Las gramíneas se caracterizan porque la semilla y el fruto son prácticamente una misma cosa. El grano del cereal, que constituye el elemento comestible, es una semilla formada por varias partes: la cubierta o envoltura externa, compuesta

básicamente por fibras de celulosa que contiene vitamina B 1. En el interior del grano se distingue fundamentalmente dos estructuras: el germen y el núcleo. En el germen o embrión abundan las proteínas de alto valor biológico, contiene grasas insaturadas ricas en ácidos grasos esenciales y vitamina E y B 1 que se pierden en los procesos de refinado para obtener harina blanca.

La parte interna o núcleo amiláceo, está compuesto por almidón y en el caso del trigo, avena y centeno por un complejo proteico denominado gluten que está formado por dos proteínas: gliadina y gluteína, que le dan elasticidad y características panificables a la masa de pan y son responsables de la esponjosidad y textura del buen pan. Cuando el cereal se consume tras quitarle las cubiertas y el germen, se denomina cereal refinado. Cuando se procesa sin quitarle las cubiertas, el producto resultante se denomina integral. (Amos *et al.*, 1979)

La estructura anatómica de todos los cereales es muy similar. Los granos, son relativamente grandes y contienen en su interior la semilla. En algunos casos las cariósides pueden ser vestidas, como es el caso de la avena, cebada, arroz, etc., que presentan una cáscara o cubierta que envuelve el fruto.

Otras variedades como el centeno, maíz, trigo, etc. pierden fácilmente la cáscara en el proceso de trillado (separación del grano y la paja), y a estas especies se las conoce como cariósides desnudas.

El grano o cariósida está compuesto por dos estructuras principales: el pericarpio y la semilla.

El pericarpio es la cubierta del fruto, y forma una parte del salvado. Es la capa que mayor proporción de fibra posee de los cereales. La semilla es la estructura que se encuentra en el interior del pericarpio y también su estructura está formada a base de capas: la testa y el endospermo.

La testa (que es la cubierta de la semilla), la que da el color a los cereales, y el endospermo, que es la capa más interna.

El endospermo de la semilla constituye el tejido nutritivo de los cereales, y además es el lugar de reserva de hidratos de carbono (en forma de almidón) de los cereales, aunque también posee pequeñas cantidades de vitaminas, enzimas, y ácidos grasos.

Dentro de la semilla se encuentra el germen o embrión, constituido por el escutelo, eje embrionario y el epiblasto.

## 1.2 CLASIFICACION DE LOS CERALES

Las especies que caben dentro de esta categoría agronómica pertenecen en su mayoría a la familia Poaceae (gramíneas), cuyo fruto es inseparable de la semilla; sin embargo también se incluye a veces a plantas con semillas semejantes a granos que son de otras familias, como la quinua, el alforfón, el amaranto, el huauzontle o el girasol. Algunos autores llaman a estas últimas especies falsos cereales o pseudocereales.

Las principales especies son:

- El arroz.
- El maíz.
- El trigo.
- La avena.
- El sorgo.
- El centeno.
- La cebada.
- El mijo.

(Loncin *et al.*, 1965)

## 1.3 PROPIEDADES

### 1.3.1 Valor nutritivo y salud

Los cereales y sus derivados son ricos en carbohidratos tanto de absorción rápida (tras la ingestión pasan a la sangre en poco tiempo) como de absorción lenta (fibra). El contenido de la fibra varía según el proceso industrial de preparación. El contenido proteico es muy variable, entre un 6 y un 16% del peso, dependiendo del tipo de cereal y del procesamiento industrial. La composición en aminoácidos de las proteínas de los cereales depende de la especie y variedad; en general son pobres en aminoácidos esenciales, por lo que se las cataloga de proteínas de moderada calidad biológica. Por tanto, cuando se combinan con legumbres, o con proteínas de origen animal (queso, pescado, etc.) se obtienen proteínas de elevado valor biológico.

El contenido en grasas de los cereales naturales es muy bajo; algo más el del maíz cuyo contenido en grasa es del 4% aproximadamente y por ello se utiliza para obtener aceite.

Los granos de los cereales contienen muy poca agua, de ahí su facilidad de conservación.

Los cereales contienen minerales como el calcio, fósforo (aunque la presencia de ácido fólico interfiere parcialmente su absorción), hierro y en menor cantidad potasio. Contienen también todas las vitaminas del complejo B. Carecen de vitamina A (excepto el maíz amarillo que contiene carotenos). La vitamina E está en el germen que se pierde con la molienda del grano y la vitamina B 1, es abundante en el salvado. De todas formas, la mayor parte de los cereales de uso más común sobre todo infantil como los copos de cereales del desayuno y diversa bollería están enriquecidos artificialmente con vitaminas

Los cereales son un alimento fundamentalmente energético, en cuya composición destaca la presencia de hidratos de carbono, gran cantidad de fibra (los integrales o enteros), y proporciones moderadas de proteínas y lípidos. (Norman N Potter. Ph D 1973)

El componente mayoritario son los hidratos de carbono, representados en su mayor parte por almidón, y en menor medida en celulosa, hemicelulosa, pentosanos, dextrinas y azúcares simples.

El almidón, principal nutriente de los cereales, se digiere y absorbe con lentitud, asegurando así una liberación constante de glucosa en la sangre. Por eso son alimentos que se pueden incluir en las dietas para personas que padecen diabetes, ya que su ingestión no provoca picos de glucemia. Además, debido a su riqueza en hidratos de carbono no complejos, los cereales pueden ser considerados alimentos esenciales en la alimentación humana.

Los cereales también poseen grandes cantidades de fibra alimentaria, siempre y cuando no se elimine el salvado. Entre los diversos beneficios que aporta la fibra de la dieta, cabe destacar que la fibra soluble estabiliza los niveles de glucemia, efecto muy importante para los diabéticos. Además la fibra contribuye a la reducción de peso, por lo que los alimentos ricos en fibra están muy indicados en las dietas de adelgazamiento. (Jean Claude Cheftel 1979)

#### **1.4 PROCESAMIENTO Y FACTORES QUE INCIDEN EN LA ALTERACIÓN DE CEREALES**

El procesamiento de los cereales afecta a la composición química y al valor nutricional de los productos preparados. Los nutrientes están distribuidos de modo heterogéneo en los distintos componentes del grano (germen, endospermo, revestimiento de la semilla y distintas capas que lo recubren), lo cual incide en las propiedades nutricionales de los productos elaborados. Los efectos más importantes del procesamiento sobre el valor nutricional de los cereales están relacionados con:

- La separación y extracción de partes del grano, dejando sólo una fracción de éste para el producto. Cualquier pérdida en el volumen origina una pérdida de nutrientes.

- Las partes del grano que se desechan pueden contener una concentración de ciertos nutrientes (aumentando, entre otros aspectos, la proporción de nutrientes por peso).
- El procesamiento en sí mismo puede traer consigo cambios en los nutrientes (la germinación, la fermentación, el sancochado).
- La separación de las capas exteriores del grano, a pesar de que causa la pérdida de algunos nutrientes, puede resultar provechosa. Por ejemplo, la tanina se concentra en las capas exteriores del sorgo, por lo que su eliminación es esencial desde el punto de vista nutricional. Al convertir el arroz integral en arroz blanco se obtiene un producto más fácil de preparar.

La contaminación microbiana de los granos de cereales y de sus harinas tiene importancia desde el punto de vista de la salud pública y como causa de posibles alteraciones de los alimentos. Los granos de cereales no suelen someterse a tratamientos que puedan reducir su flora microbiana, por lo que, con toda probabilidad, contienen mohos, levaduras y bacterias que crecerán si la humedad alcanza un nivel suficiente. Los factores más importantes que influyen en la alteración por mohos de los granos almacenados hacen referencia al contenido microbiano, niveles de humedad entre 12 y 13%, lesiones físicas y temperatura. (Marcel Loncin *et al.*, 1965)

Si las condiciones de almacenaje y procesamiento lo permiten, la proliferación microbiana puede darse en cereales y productos derivados. Estos productos se convierten en el sustrato adecuado para el crecimiento de bacterias y hongos. Entre las bacterias que pueden encontrarse en la harina de trigo se cuentan esporas de *Bacillus*, coliformes y unos pocos representantes de los géneros *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Alcaligenes* y *Serratia*. Los mohos contaminantes de cereales pertenecen mayoritariamente a los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*, aunque se encuentran eventualmente hongos del género *Alternaria*, *Cladosporium* y otros.

El número de colonias bacterianas varían ampliamente de unos pocos cientos de gramo a millones. La mayoría de las muestras de harina blanca de trigo procedentes del comercio al por menor contienen de unos pocos cientos a unos pocos miles de bacterias por gramo, y un promedio de unas 20 a 30 esporas de bacilos por gramo y de 50 a 100 esporas de mohos. Las harinas preparadas suelen

dar contajes más altos (una media de 8000 a 12000 por gramo) y todavía más alto en las harinas integrales, que contienen también la parte externa del grano y no han sido blanqueadas. (Jean Claude Cheftel 1979)

### 1.5 CEREALES UTILIZADOS EN LA PRODUCCIÓN DE ALIMENTOS

En la actualidad, la mayor parte de la producción de cereal, salvo el arroz y en menor medida el maíz, se destina al proceso de molturación para la obtención de harinas y derivados. También se emplea una pequeña parte en la alimentación de ganado.

De todos los cereales, únicamente el trigo y el centeno poseen propiedades panificables. En el caso del trigo, la proporción que presentan las proteínas, permite la formación de una red continua y elástica que retiene el gas carbónico producido durante la fermentación, permitiendo así la extensión de la masa. Sin embargo, la cantidad y calidad de gluten que contiene el centeno no permite la formación de una masa adecuada para este fin, ya que es poco elástica y retiene menos cantidad de gas durante la fermentación.

Así su aptitud para la panificación se debe a otros componentes, (azúcares, que captan el agua durante el amasado hasta producir una masa adecuada para el horneado.



Figura 1: muestras de cereales analizados en el trabajo de investigación.

### 1.5.1 Maíz

Nombre común de una gramínea muy cultivada como alimento y como forraje para el ganado. El nombre proviene de las Antillas, pero en México, los nahuas lo denominaron *centli* (a la mazorca) o *tlaolli* (al grano). Con el trigo y el arroz, el maíz es uno de los cereales más cultivados del mundo

El maíz forma un tallo erguido y macizo, una peculiaridad que diferencia a esta planta de casi todas las demás gramíneas, que lo tienen hueco. La altura es muy variable, y oscila entre poco más de 60 cm en ciertas variedades enanas y 6 m o más; la media es de 2,4 m. Las hojas, alternas, son largas y estrechas. El tallo principal termina en una inflorescencia masculina; ésta es una panícula formada por numerosas flores pequeñas llamadas espículas, cada una con tres anteras pequeñas que producen los granos de polen o gametos masculinos. La inflorescencia femenina es una estructura única llamada mazorca, que agrupa hasta un millar de semillas dispuestas sobre un núcleo duro. La mazorca crece envuelta en unas hojas modificadas o brácteas; las fibras sedosas o pelos que brotan de la parte superior de la panocha son los estilos prolongados, unidos cada uno de ellos a un ovario individual. El polen de la panícula masculina, arrastrado por el viento, cae sobre estos estilos, donde germina y avanza hasta llegar al ovario; cada ovario fertilizado crece hasta transformarse en un grano de maíz.

Su alto contenido en hidratos de carbono de fácil digestión, lo convierten en un alimento ideal para los niños y los deportistas. Su harina es idónea cuando existen problemas de alergia o intolerancia al gluten. Las sedas o estigmas de maíz son utilizadas como infusiones diuréticas, excelentes en la hipertensión, en la retención de líquidos o cuando queremos aumentar la producción de orina como en las infecciones urinarias. Su aporte en fibra, favorece la digestión y reduce el colesterol. El maíz contiene betacaroteno, compuesto antioxidante, relacionado con la prevención del cáncer. Además es una fuente de vitaminas del grupo B, específicamente B1, B3 y B9, las cuales actúan ante el sistema nervioso.

A continuación se presenta información relevante en relación al contenido nutricional del maíz.

INFORMACION NUTRICIONAL		VITAMINAS	
Calorías	123	Acido Folico	0,20mg/kg
Hidratos de carbono	83,8g	Acido p amino benzoico	
Proteínas	10,3g	Acido pantotenico	5 mg/kg
Fibra	2,3g	Biotina	0,06 mg/kg
Grasa	4,5g	Colina	537 mg/kg
<b>AMINOACIDOS</b>		Inositol	
Acido Aspartico	7g	Niacina	23 mg/kg
Acido Glutamico	17,90g	Piridoxina	7 mg/kg
Alanina	7,9g	Riboflavina	1 mg/kg
Arginina	3,7g	Tiamina	4 mg/kg
Cistina	1,7g	Vitamina A	4,1 mg/kg
Fenilalanina	4,6g	Vitamina B <sub>12</sub>	
Glicina	3,20g	Vitamina E	3 mg/kg
Histidina	2,50g	<b>MINERALES</b>	
Isoleucina	3,40g	Calcio (por 100)	0,03
Leucina	12,20g	Cobre (mg/kg)	10,5
Lisina	2,60g	Fosforo (por 100)	0,32
Metionina	1,40g	Hierro(mg/kg)	30,0
Prolina	8,30g	Magnesio (por 100)	0,17
Serina	3,20g	Manganeso(mg/kg)	20,0
Tirosina	2,80g	Potasio(por 100)	0,35
Treonina	2,90g	Silicio(por 100)	0,02
Triptofano	2,20g	sodio(por 100)	0,01
valina	4,60g	Zinc(mg/kg)	10,4

Cuadro 1: Información nutricional del maíz (Primo Yufera. Alimentos Química Agrícola Madrid. Alhanbra. 1981)

### 1.5.2 Trigo

El trigo es el nombre común de los cereales de un género de la familia de las Gramíneas cultivado como alimento desde tiempos prehistóricos por los pueblos de las regiones templadas; ahora es el cereal más importante de dichas regiones.

El trigo es una planta anual alta, de 1,2 m por término medio. Las hojas, parecidas a las de otras gramíneas, brotan muy pronto y van seguidas por tallos gráciles rematados por las espigas de grano. Las especies de trigo se clasifican en función del número de cromosomas de las células vegetativas. Se reconocen tres series: diploide o carraón, con 14 cromosomas; tetraploide o escanda con 28 cromosomas, y hexaploide, con 42 cromosomas. Las especies de trigo se hibridan con bastante frecuencia en el medio natural.

El trigo se constituye en un alimento rico en hidratos de carbono que ayuda a obtener mucha energía. Su riqueza en fibra le hace ideal para tratar el estreñimiento o divertículos. Es ideal para personas nerviosas o en período de estudios por su aporte en vitaminas B. Su contenido en lignanos (fitoestrógenos) reduce la posibilidad de sufrir cáncer de pecho, útero o próstata.

El trigo tiene propiedades antioxidantes ya que es una buena fuente de selenio y vitamina E que protegen a nuestras células frente a los radicales libres. Es muy recomendado en las enfermedades cardíacas por su riqueza en vitamina E que ayuda a que el colesterol no se oxide y bloquee las arterias (Rico Hernández 2006).

A continuación se presenta la información nutricional del trigo (por 100 g. crudo)

INFORMACIÓN NUTRICIONAL		VITAMINAS	
Calorías	305	Acido Folico	0,56 mg/kg
Hidratos de carbono	82,3g	Acido p amino benzoico	5,1 mg/kg
Proteínas	13,4g	Acido pantotenico	9,1 mg/kg
Fibra	2,4g	Biotina	0,06 mg/kg
Grasas	2,4g	Colina	300 mg/kg
<b>AMINOACIDOS</b>		Inositol	
Acido Aspartico	3,7g	Niacina	48,3 mg/kg
Acido glutamico	20g	Piridoxina	4,7 mg/kg
Alanina	4,2g	Riboflavina	3,1 mg/kg
Arginina	10,6g	Tiamina	7,9 mg/kg
Cistina	1,5g	Vitamina A	
Fenilalanina	2,6g	Vitamina B <sub>12</sub>	
Glicina	6,1g	Vitamina E	4,3 mg/kg
Histidina	4,1g	<b>MINERALES</b>	
Isoleucina	2,9g	Calcio (por 100)	0,04
Leucina	5,1g	Cobre (mg/kg)	5,1
Lisina	3,7g	Fosforo (por 100)	0,34
Metionina	1,2g	Hierro(mg/kg)	44,0
Prolina	9g	Magnesio (por 100)	0,18
Serina	5,3g	Manganeso(mg/kg)	38,0
Tirosina	1,7g	Potasio(por 100)	0,41
Treonina	2,4g	Silicio(por 100)	
Triptofano	1,1g	sodio(por 100)	0,03
Valina	4,2g	Zinc(mg/kg)	24

Cuadro2: cuadro nutricional del trigo (Primo Yufera. Alimentos Quimica Agricola. Alhambra. Madrid. 1981)

## 1.6 DERIVADOS MÁS COMUNES DEL PROCESAMIENTO DE CEREALES

### 1.6.1 Harina

Es una sustancia pulverulenta que se obtiene tras moler de forma muy fina granos de trigo. Los productos molidos que se extraen de otros granos, como el centeno, el trigo sarraceno, el arroz y el maíz, así como los obtenidos de plantas como la patata irlandesa, reciben también el nombre de harinas, pero el uso inespecífico del término hace referencia a la harina elaborada a partir del trigo común o del pan, *Triticum aestivum* o *vulgare*.

La harina contiene entre un 65 y un 70% de almidón, pero su valor nutritivo fundamental está en su contenido, de un 9 a un 14%, de proteínas; las principales son la gliadina y la gluteína, que constituyen aproximadamente un 80% del contenido en gluten. La celulosa, las grasas y el azúcar representan menos de un 4 por ciento.

Las características generales de los cereales, como el peso por unidad de volumen, el tamaño del grano, su grosor y la ausencia de manchas e impurezas, afectan a la calidad de la harina obtenida, que puede detectarse inspeccionándola. No obstante, el mejor modo de medir el valor comercial de la harina es el estudio de propiedades más específicas, como el contenido en humedad, la acidez, el contenido en proteínas, la capacidad de absorción de agua, el grado de granulación, el color, el contenido en grasas y la capacidad expansiva del gluten. (Billington 1979)

### 1.6.2 Pan

El pan es un alimento básico que se elabora cociendo una mezcla de harina o grano molido, agua o leche, y varios ingredientes más. La harina puede ser de trigo (el grano más utilizado), centeno, cebada, maíz, arroz, patatas o papas y soja.

Dependiendo de los ingredientes utilizados, el pan puede ser con levadura o ácimo. El primero se hace combinando un agente que produce la fermentación y subida del

pan, en general levadura, con el resto de los ingredientes, normalmente azúcar, sal y grasa, además de la harina y el líquido. La levadura actúa en el proceso de fermentación, generando diminutas burbujas de un gas, dióxido de carbono, en la mezcla o masa, incrementando su volumen y haciéndola ligera y porosa.

El pan, el componente más consumido dentro del grupo, tiene un 30% aproximadamente de agua y un alto contenido de hidratos de carbono complejos en forma de almidón (58% en el pan blanco y 49% en el integral). El rendimiento energético es de unas 260 y 230 kcal/100 g en el pan blanco y en integral, respectivamente.

Contienen un 8% de proteína (en el pan de trigo es el gluten, proteína rica en metionina) con el pequeño inconveniente, como otros cereales, de que la lisina (un aminoácido esencial que se encuentra abundantemente en las leguminosas) y el triptófano se encuentran en pequeñas cantidades son los aminoácidos limitantes, disminuyendo su valor biológico. Sin embargo, si los cereales se consumen con otros alimentos como carnes, leche, huevos o leguminosas se produce el fenómeno de suplementación, mejorando notablemente la calidad de la proteína.

### **1. 6. 3 Pastas Alimenticias**

Las pastas se elaboran a partir de sémola de trigo duro. Son productos desecados que resultan de mezclar convenientemente esta semolina con un 20–30% de agua. Las propiedades nutritivas del trigo duro, su textura, dureza y riqueza de proteínas, lo convierten en el cereal óptimo para la elaboración de la pasta.

Actualmente otros muchos alimentos, además del trigo, vienen a formar parte de los ingredientes de la pasta. Las llamadas "pastas compuestas" están elaboradas con huevo, leche o un variado abanico de verduras y hortalizas como espinacas, zanahorias o tomates. También se comercializan las "pastas rellenas", a las que se ha incorporado convenientemente un preparado de carne, pescado, verduras o queso, entre otros alimentos.

Este producto, siendo bien aceptado y muy apreciado por diferentes consumidores, puede ser susceptible de ser contaminado, pudiendo estar implicado en la aparición

de brotes de toxiinfección alimentaria si las manipulaciones sufridas o las condiciones de conservación no son las adecuadas. (Clarke, 1995)

## CAPITULO II

### MICOTOXINAS

#### Introducción

En este capítulo se abordarán los conceptos, generalidades relacionados con las micotoxinas, su clasificación, propiedades y alteraciones que pueden causar en el ser humano por su ingesta en productos contaminados por micotoxinas.

#### 2.1 Generalidades

El término “micotoxinas” fue introducido en 1962 por Forgacs y Carll, quienes lo definieron como la «intoxicación del huésped como consecuencia de la entrada al cuerpo de una sustancia tóxica de origen fúngico» (López, 1983).

No todos los mohos elaboran micotoxinas, no todos son toxigenicos. De las casi doscientas especies consideradas toxigenicas existen cepas que producen micotoxinas y cepas que no las producen o producen poca cantidad. Por otro lado, el tipo de sustrato y las condiciones ambientales juegan un papel importante en el nivel de producción.

Las micotoxinas son metabolitos secundarios fúngicos capaces de desencadenar diversas alteraciones y cuadros patológicos en el hombre y los animales. Son moléculas relativamente pequeñas (PM < 700), con una estructura química y actividad biológica muy diversa. Estos compuestos suelen ser genotípicamente específicos para un grupo de especies de un mismo género. El mismo compuesto, no obstante, puede ser también elaborado por hongos pertenecientes a géneros distintos. En general, cuanto más compleja es la ruta biosintética de una micotoxina, menor será el número de especies fúngicas capaces de elaborarla. (Peraica *et al.*, 1999)

La ingestión de estos alimentos, si la sustancia toxica esta en cantidad suficiente, provoca una intoxicación en el hombre o en los animales. (Moreau., 1992)

## 2.2 Producción de micotoxinas: rol en el metabolismo fungal

Los hongos son microorganismos de gran interés por su capacidad de producir un amplio espectro de metabolitos secundarios. La identificación de estos compuestos atrae el interés científico desde varios puntos: algunos de estos compuestos han encontrado aplicaciones en el área médica, agrícola e industrial (Calvo *et al.*, 2002). En el campo de la industria alimenticia, muchos de estos productos son producidos por hongos contaminantes, y se convierten en un factor de riesgo en el consumo de alimentos.

En el crecimiento y diferenciación celular de los hongos, se dan procesos biosintéticos que generan metabolitos primarios y secundarios. Los metabolitos fúngicos primarios son aquellas moléculas sintetizadas por el hongo para la formación de biomasa. Cuando el crecimiento del hongo termina o es interrumpido por la depleción de algún nutriente esencial, los procesos de síntesis del hongo se encaminan hacia la producción de metabolitos secundarios. Este grupo de sustancias incluye pigmentos, antibióticos y micotoxinas, los cuales son producidos en gran cantidad durante la fase estacionaria del hongo (Lacey., 1989). Los metabolitos secundarios son aquellas moléculas que no son esenciales para el crecimiento vegetativo. Estos compuestos están asociados a las fases de diferenciación y esporulación (Carlile *et al.*, 2004).

Los factores más importantes implicados en el crecimiento del hongo y la producción de micotoxinas son la humedad relativa, humedad del grano, disponibilidad del agua en el grano (actividad del agua), temperatura de almacenamiento, ventilación y niveles de oxígeno atmosférico, integridad de la cutícula del grano y presencia de material extraño en el grano (Lacey, 1989)

## 2.3 MICOTOXINAS DE HONGOS IMPERFECTOS

Los hongos imperfectos contaminan a los alimentos en las fases de procesamiento y almacenamiento. En este estudio la información presentada se enfocará a este tipo de especies fungales. Las especies *Fusarium*, *Penicillium* y *Aspergillium* son capaces de sintetizar una gran variedad de estos compuestos, estimándose su producción en quince o más por género.

### 2.3.1 Principales micotoxinas y su clasificación

Las micotoxinas más estudiadas y al mismo tiempo, con una acción conocida en mamíferos, peces y cereales son: aflatoxinas, ocratoxina A, patulina, ácido peniciclínico, citrinina, zearanelona, alcaloides de ergot y tricotecenos. Su efecto ya conocido hace que su presencia en los alimentos y en los piensos pueda ser importante.

El siguiente cuadro resume los principales metabolitos tóxicos producidos por hongos comunes en la contaminación de los alimentos.

Género	Especie	Principales micotoxinas
<i>Aspergillus</i>	<i>flavus</i> <i>parasiticus</i> <i>fumigatus</i>  <i>ochraceus</i>	Aflatoxinas B, M, G; ácido kojico Aflatoxinas B, M Gliotoxina, fumagillina, ácido helvólico, fumitremorgina A, asfemolisina Ocratoxina A
<i>Fusarium</i>	<i>tricenectum</i> <i>roseum</i> <i>moniliforme</i> <i>graminearum</i>	Tricoteceno 2 Tricoteceno 2 Zearalenona Vomitoxina
<i>Penicillium</i>	<i>chrisogenum</i> <i>viridicatum</i> <i>expansum</i>	Acido penicílico Citrinina, patulina patulina
<i>Claviceps</i>	<i>purpurea</i>	Alcaloides de ergot

Cuadro 3: Principales micotoxinas producidas por hongos de géneros *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium* (Aziz *et al.*, 1998; Dowd, 1989; Kamei y Watanabe, 2005; Carlile *et al.*, 2004)

### 2.3.1.1 Aflatoxinas

El nombre de aflatoxina deriva de la abreviación taxonómica de *Aspergillus* (A) y de la especie *flavus*, ya que se comprobó que el hongo *Aspergillus flavus* era el contaminante común en todas las muestras sospechosas. Las aflatoxinas son metabolitos tóxicos secundarios que químicamente corresponden a derivados isocumarínicos, producidas por los hongos *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*.

Las aflatoxinas más importantes y más estudiadas se han clasificado en los tipos: B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub> según su fluorescencia de color azul o verde en presencia de luz ultravioleta a 365 nm. Existen además, los derivados B<sub>2a</sub> y G<sub>2a</sub>. La capacidad de producción de aflatoxinas está condicionada por el tipo de hongo, las características del sustrato y las condiciones externas tales como humedad, temperatura y luz.

Las aflatoxinas son agentes tóxicos extremadamente activos, siendo el hígado el más afectado. Se ha demostrado una estrecha relación entre la ingesta de aflatoxinas y la aparición de cáncer al hígado. Se considera a la aflatoxina B<sub>1</sub> como el más poderoso agente cancerígeno conocido.

(Lowell, 1992).

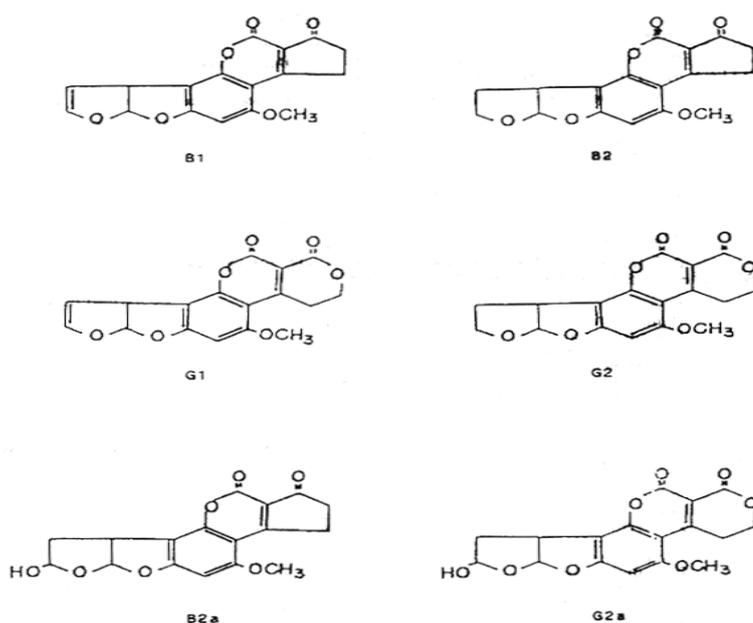


Figura 2: Estructuras de algunas aflatoxinas

### 2.3.1.2 Ocratoxinas

Las ocratoxinas fueron descubiertas en 1965, son metabolitos producidos por las especies de hongos *Aspergillus* y *Penicillium*, especies comunes en el maíz y en forrajes secos, siendo la ocratoxina A el compuesto más tóxico de este grupo. Las ocratoxinas son micotoxinas caracterizadas que están recibiendo una especial atención en todo el mundo por su marcado carácter nefrotóxico.

### 2.3.1.3 Zearalenona

La zearalenona o toxina T-2 es una micotoxina estrogénica, puede estar presente en cereales comunes, como el maíz, el trigo o la cebada. La producen especies del género *Fusarium*, de las que las más importantes son *Fusarium graminearum* y *Fusarium culmorum*.

### 2.3.1.4 Tricotecenos

Bajo este nombre se agrupan más de 75 micotoxinas producidas sobre todo por especies del género *Fusarium*, pero también por otras variedades de mohos, como *Stachybotrys*, *Trichothecium*, *Myrothecium*, etc.

Estas micotoxinas han sido la causa de importantes intoxicaciones de animales e incluso humanas. (Moreau, 1992)

## 2.4 CONTAMINACIÓN DE ALIMENTOS CON MICOTOXINAS

Las micotoxinas son un grupo muy amplio de metabolitos secundarios de origen fúngico caracterizados por presentar una elevada toxicidad tanto para el hombre como para los animales, toxicidad que puede variar desde el desarrollo de actividades carcinógenas, teratógenas o mutágenas, hasta la producción de desórdenes de tipo hormonal o inmunosupresor, dependiendo de la micotoxina.

Las aflatoxinas son las micotoxinas que han sido más profundamente estudiadas en todo el mundo. Se han realizado diversos estudios sobre la presencia de estas toxinas en maíz destinado al consumo animal o humano, así como sobre la influencia en el procesamiento en la presencia de estas micotoxinas en tortillas preparadas a partir de harina de maíz contaminado.

La producción de micotoxinas en alimentos de consumo humano o animal constituye un peligro potencial para la salud y la producción. El cuadro clínico-patológico producido por la intoxicación con micotoxinas se conoce como micotoxicosis.

Las micotoxinas son producidas por hongos en cultivos aun no cosechados y durante la cosecha, el transporte y/o almacenamiento de granos. Hongos fitopatógenos, en particular los pertenecientes al genero *Fusarium*, tienden a atacar las plantas en crecimiento a nivel de campo y a causar contaminación con micotoxinas en granos aún no cosechados. En contraste, los hongos saprofiticos (*Aspergillus* spp., *Penicillium* spp) atacan los granos durante su transporte y/o almacenamiento e inducen la formación de micotoxinas en granos cosechados. Alimentos completos para animales (concentrados) o granos almacenados para consumo humano o animal (maíz, arroz, frijol, maní, etc.) adquieren micotoxinas durante su almacenamiento si las condiciones de temperatura y humedad son favorables al crecimiento del hongo toxigénico.

Debido a que la formación de micotoxinas depende de las condiciones ambientales, la presencia en un lote de granos de un hongo capaz de producir micotoxinas, no implica de manera necesaria la contaminación con micotoxinas; de igual forma, la ausencia de hongos viables en un lote de granos no implica la ausencia de micotoxinas. Por esta razón, la estimación del nivel de contaminación con micotoxinas en un lote de alimento no se basa en la identificación y el recuento de hongos, sino que debe partir del análisis químico de las micotoxinas.

No es suficiente con detectar en un alimento una especie de moho toxico para considerarlo peligroso. Existe una presunción de toxicidad, pero es necesario investigar y determinar la concentración de micotoxinas que hay en el alimento antes de declararlo impropio para el consumo. (Gonzalo J. Díaz. 1995).

<b>Ocratoxinas</b>	<b>Patulina</b>	<b>Zearalenona</b>	<b>Citrinina</b>	<b>Tricotecenos</b>
<b>En alimentos</b>	<b>En alimentos</b>	<b>En alimentos</b>	<b>En alimentos</b>	<b>En alimentos</b>
Cereales Verduras Legumbres Quesos Carnes	Cereales Frutas Quesos	Cereales y subproductos	Cereales Frutas	Cereales
<b>Efectos</b>	<b>Efectos</b>	<b>Efectos</b>	<b>Efectos</b>	<b>Efectos</b>
Nefrotóxico Necrosis hepática Inmunosupresor	Afecciones pulmonares Lesiones de hígado Lesiones de riñón	Estrogénico Afecciones sistema reproductor	Nefrotóxico Inmunosupresor	Afecciones digestivas Afecciones de la piel Afecciones del sistema circulatorio

Cuadro 4: Algunas micotoxinas presentes en alimentos y sus efectos en la salud.

## **CAPITULO III**

### **MATERIALES Y METODOS**

#### **Introducción**

En este capítulo se aborda la descripción de la metodología experimental utilizada en el desarrollo de este trabajo. Los métodos de selección del grano de cereal, obtención y purificación de aislados fungales, desarrollo de sistemas cromatográficos para la separación de metabolitos secundarios son descritos. Además, se presentan los procesos tecnológicos para la obtención de productos derivados del grano de cereal.

#### **3.1 MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS**

##### **3.1.1 Material de laboratorio**

Vasos de precipitación

Cajas petri

Probetas

Erlenmeyers de diferentes capacidades

Tubos de ensayo

Botellas Schott de diferentes dimensiones

Balones de aforo de diferentes dimensiones

Embudos de separación de diferentes volúmenes

Pipetas serológicas y automáticas

Embudos simples

Tiras reactivas para medición de glucosa

### **3.1.2 Equipos**

Rota vapor Buchi

Incubadora Memmert

Balanza analítica Ohaus

Autoclave de laboratorio

Vortex Genie

Cámara de seguridad biológica CSB 120 nivel de bioseguridad II

Licuada industrial Bartec

### **3.1.3 Solventes y reactivos**

Acetato de etilo

Acetona

Cloroformo

Metanol técnico destilado

Acido clorhídrico

Agar base

Glucosa

Extracto de levadura

### **3.1.4 Suministros**

Extracto de malta

Puré de papa

### **3.1.5 Muestras de Cereales**

Granos de maíz y trigo obtenidos en tres mercados de la ciudad de Cuenca.

## 3.2 METODOLOGIA

### 3.2.1 Obtención de muestras de cereales contaminados.

Para evaluar las posibles alteraciones tóxicas de los cereales en estudio, se seleccionaron dos tipos de cereales: trigo y maíz. Las muestras se obtuvieron en tres mercados de la ciudad de Cuenca. Se adquirieron treinta libras de cada especie, las cuales fueron utilizados en el análisis experimental y en los procesos tecnológicos.



Figura 3: Productos elaborados con los cereales en estudio

### 3.2.2. Formulación de medios de cultivo

#### 3.2.2.1 Agar Papa Glucosa (PDA)

Componente	Cantidad (para 1L de medio)
Puré de papa deshidratada	20g
Glucosa	20g
Agar base	15g

Cuadro 5: composición para el agar (PDA)

### 3.2.2.2. Agar levadura-malta-glucosa (YMG)

Componente	Cantidad (para 1L de medio)
Extracto de malta	25g
Extracto de levadura	10g
Glucosa	10g
Agar base	37,5g

Cuadro 6: composición para el agar (YMG)

Los componentes fueron disueltos con agitación, y su pH fue ajustado a 5.5 con la adición de una solución de HCl 1N. La esterilización se llevó a cabo en autoclave por 15 min. a 121° C y 2 atm de presión

### 3.2.3 Aislamiento de especies fungales

La obtención de mohos productores de micotoxinas se realizó a partir de muestras de grano de cereal y harina preparada con el material vegetal. Para el efecto se utilizaron dos metodologías:

3.2.3.1 Aislamiento de hongos a partir de granos de cereal Para la obtención de hongos a partir de granos de cereal se adaptó la metodología utilizada para aislar hongos endófitos de material vegetal (Hormazabal, 2004). Los granos de cereal, previamente desinfectados, se seccionaron a la mitad y se colocaron en la superficie de placas petri con los medios de cultivo seleccionados. Luego de una incubación a 25°C por 5 a 7 días, se observó el crecimiento de micelio fungal, el cual fue repicado sucesivamente a placas, hasta la obtención de aislados puros.

Estos aislados fueron mantenidos en medios formulados a base de puré de papa y extracto de malta. Posteriormente, los mohos aislados fueron identificados a nivel de género por técnicas microbiológicas.

**3.2.3.2 Aislamiento de hongos a partir de harina** La obtención de aislados fungales a partir de harina se desarrolló modificando la técnica utilizada para obtener hongos a partir de muestras de suelo (Cazar, 2006). Se pesó 1 gramo del cereal pulverizado, disolviéndose en 9 mL de agua destilada estéril. Esta solución fue utilizada para realizar una dilución seriada en un rango de concentración de  $10^{-1}$  hasta  $10^{-4}$  g/mL. Se transfirió asépticamente 1 mL de estas soluciones a la superficie de placas petri preparadas con los medios de cultivo descritos en la sección 3.2.2. Las placas inoculadas fueron incubadas a 25°C por 5 a 7 días, donde se observó el crecimiento de microorganismos. Los aislados obtenidos fueron repicados sucesivamente para su purificación, y mantenidos en los medios YMG y PDA hasta su identificación a nivel de género.

#### **3.2.4 Cultivos a escala analítica**

Los aislados fungales obtenidos fueron cultivados en matraces erlenmeyer de 250 mL conteniendo 125 mL de medio líquido YMG; formulado con extracto de levadura, glucosa y extracto de malta, en las mismas proporciones descritas en 3.2.2.2, sin adición de agar. Los matraces fueron inoculados con cultivos puros de los hongos a evaluar, en condiciones asépticas. El crecimiento se llevó a cabo en un baño maría de agitación orbital a 25°C y 120 rpm. Durante el crecimiento de los hongos se monitoreó el consumo de glucosa. Al verificarse el agotamiento de la fuente de carbono, el micelio se separó del líquido de cultivo por filtración (Stadler y Anke, 1994)

#### **3.2.5 Obtención de extractos**

Para aislar los productos del metabolismo secundario fungal, se obtuvieron extractos a partir del líquido de cultivo de los hongos crecidos a escala analítica y de los productos preparados a partir de los cereales en estudio. Los métodos empleados se describen a continuación:

3.2.5.1 Obtención de extractos de cultivos a escala analítica El líquido de cultivo, separado previamente del micelio del hongo en estudio, fue extraído con un volumen similar de acetato de etilo. La separación de las fases se verificó en un embudo de separación, mediante el cual se colectó la fase orgánica y se descartó la fase acuosa. El extracto orgánico fue obtenido previa evaporación del solvente, mediante destilación a presión reducida, en un Rotavapor.



Figura 4: extracción mediante volumen similar de acetato de etilo.

La metodología descrita fue utilizada para obtener extractos a partir de los productos obtenidos con los cereales estudiados. Se pesaron 50 g de los productos, previamente pulverizados, sumergiéndolos en 120 mL de acetato de etilo. La extracción se desarrolló por contacto del solvente con el producto, por 24 horas a resguardo de la luz solar. Posteriormente, se filtró y descartó el sólido, y la fase líquida fue concentrada en Rotavapor.

### 3.2.6 Identificación de micotoxinas por cromatografía en capa fina (CCF)

Los extractos obtenidos fueron sometidos a cromatografías en capa fina con solventes que permitieron su separación. Las manchas representativas se caracterizaron mediante el cálculo de  $R_f$  (factor de retención).

### 3.2.6.1 Cromatografía de muestras a partir del aislamiento de hongos

Para el desarrollo de cromatografías con los extractos obtenidos según metodología descrita en 3.2.5, se siguió el protocolo que se describe a continuación:

- Los extractos fueron redisoluertos con acetato de etilo, para facilitar su siembra en el soporte cromatográfico.
- Se prepararon diversas fases móviles para observar la migración de los compuestos en la fase estacionaria. Las mezclas de solventes que fueron utilizadas para discriminar la presencia de micotoxinas se presentan en el siguiente cuadro:

Mezcla	Proporción
AcOEt: MeOH	8:2
Cloroformo:Acetona	8:2
Cloroformo:Acetona	6,6:3,3
Cloroformo:AcOEt	6:4
Cloroformo:Metanol	1:1
Cloroformo:Metanol	7:3

Cuadro 7: fases móviles utilizadas en las cromatografías

- La placa cromatográfica se cortó en las dimensiones adecuadas para el trabajo, señalando los puntos de siembra donde se aplican las muestras.
- Mediante una pipeta se tomaron las muestras y fueron colocadas en cada señal. El proceso se realizó en repetidas ocasiones para concentrar la siembra de los extractos.
- Paralelamente, se preparó la cámara cromatográfica, con la fase móvil seleccionada para la separación cromatográfica.
- La placa cromatográfica fue colocada en la cámara, y su desarrollo fue revisado hasta que el solvente recorra aproximadamente las tres cuartas partes del soporte.

- Al término de la elusión, el soporte fue secado al ambiente y observado en cámara de luz ultravioleta ( $\lambda = 315 \text{ nm}$ ). En estas condiciones se señalaron las manchas características de micotoxinas.

### 3.2.6.2: Identificación de micotoxinas mediante revelado cromatográfico

Las placas cromatográficas obtenidas como se describe en 3.2.6.1 fueron sometidas a procesos de revelado físico y químico con el fin de establecer la presencia de micotoxinas. Las estrategias utilizadas se describen a continuación:

- Revelado físico La placa cromatográfica, previamente desarrollada en la fase móvil adecuada, es secada al ambiente y observada en una cámara provista de una lámpara UV de  $\lambda = 365 \text{ nm}$ . La presencia de manchas azules en diferentes intensidades evidencian la presencia de micotoxinas (Aziz *et al.*, 1998).
- Revelado químico: Los compuestos adsorbidos en los soportes cromatográficos pueden desarrollar reacciones químicas con reactivos específicos. El resultado de esta reacción es el desarrollo de color en la placa cromatográfica, siendo esta estrategia de gran ayuda para identificar compuestos incoloros o que no revelan a UV<sub>365 nm</sub>. Los reactivos utilizados con este propósito fueron:
  1. Cloruro de Hierro III: Solución acuosa al 1%
  2. KOH: Solución etanólica al 1%
  3. Amoníaco: Solución etanólica al 5% (Proksa *et al.*, 1994)

Las soluciones de revelado químico fueron colocadas en la CCF con la ayuda de un aspersor a la placa cromatográfica previamente sometida a calor (105° por 5 minutos). Se registraron los cambios de color en las manchas observadas a UV<sub>365 nm</sub> y el desarrollo de nuevas manchas. Además se calcularon los factores de retención de las manchas cromatográficas (Rf), de acuerdo a la siguiente expresión:

$$R_f = \frac{Z_x}{Z_f - Z_o}$$

Donde:  $R_f$ : factor de retención

$Z_x$ : distancia recorrida de la muestra desde el origen

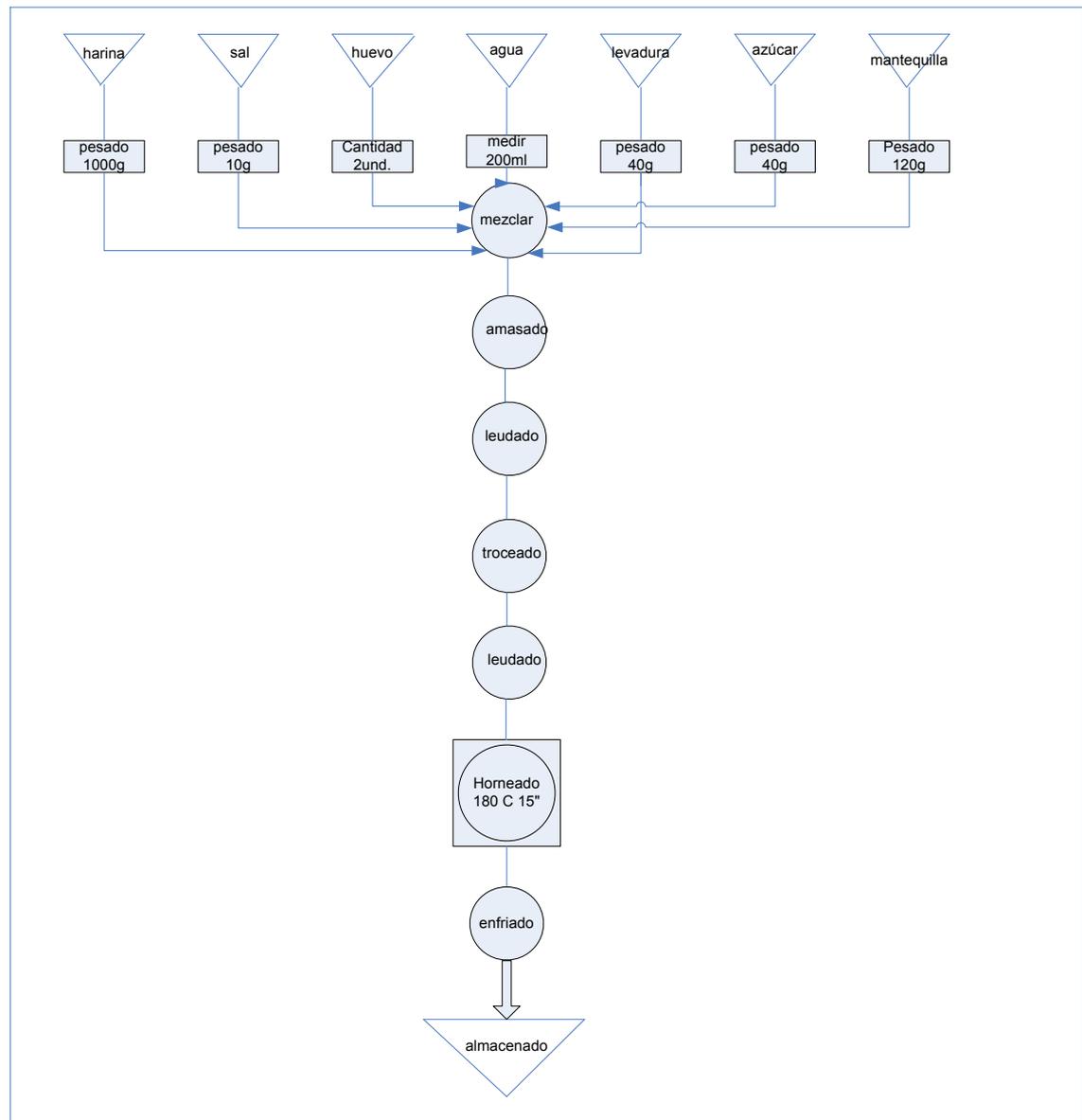
$Z_f - Z_o$ : distancia recorrida por la fase móvil desde el origen  
hasta el frente del solvente

### 3.3 Elaboración de productos a partir de los cereales en estudio

Con los cereales estudiados se elaboraron tres productos: pan de trigo, fideos de trigo y tortillas de maíz

### 3.3.1 Elaboración de pan de trigo

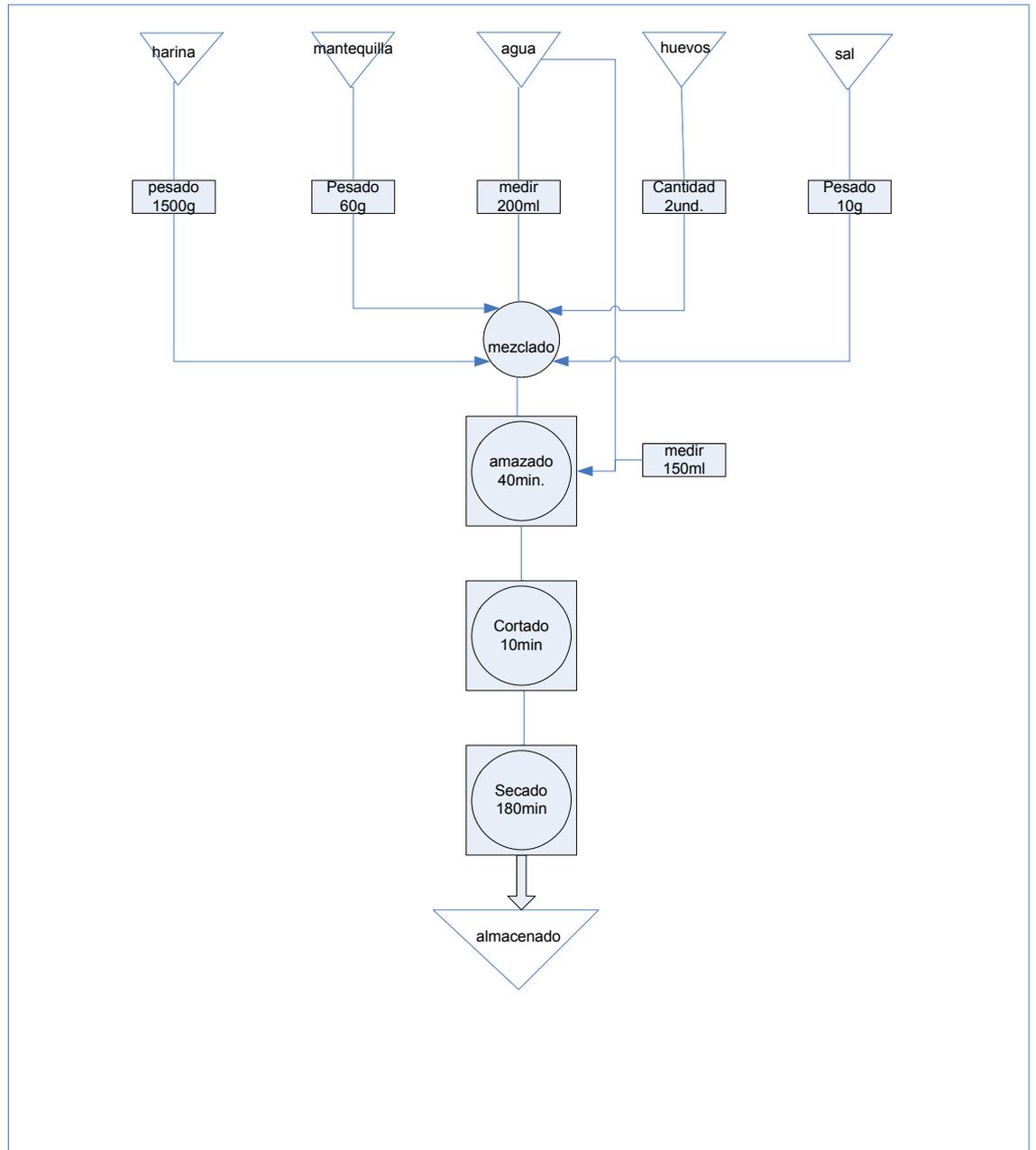
La elaboración del pan de trigo se realizó, como lo describe el siguiente diagrama de proceso.



Esquema 1: Diagrama de proceso para elaboración de pan de trigo.

### 3.3.2 Elaboración de fideos de trigo

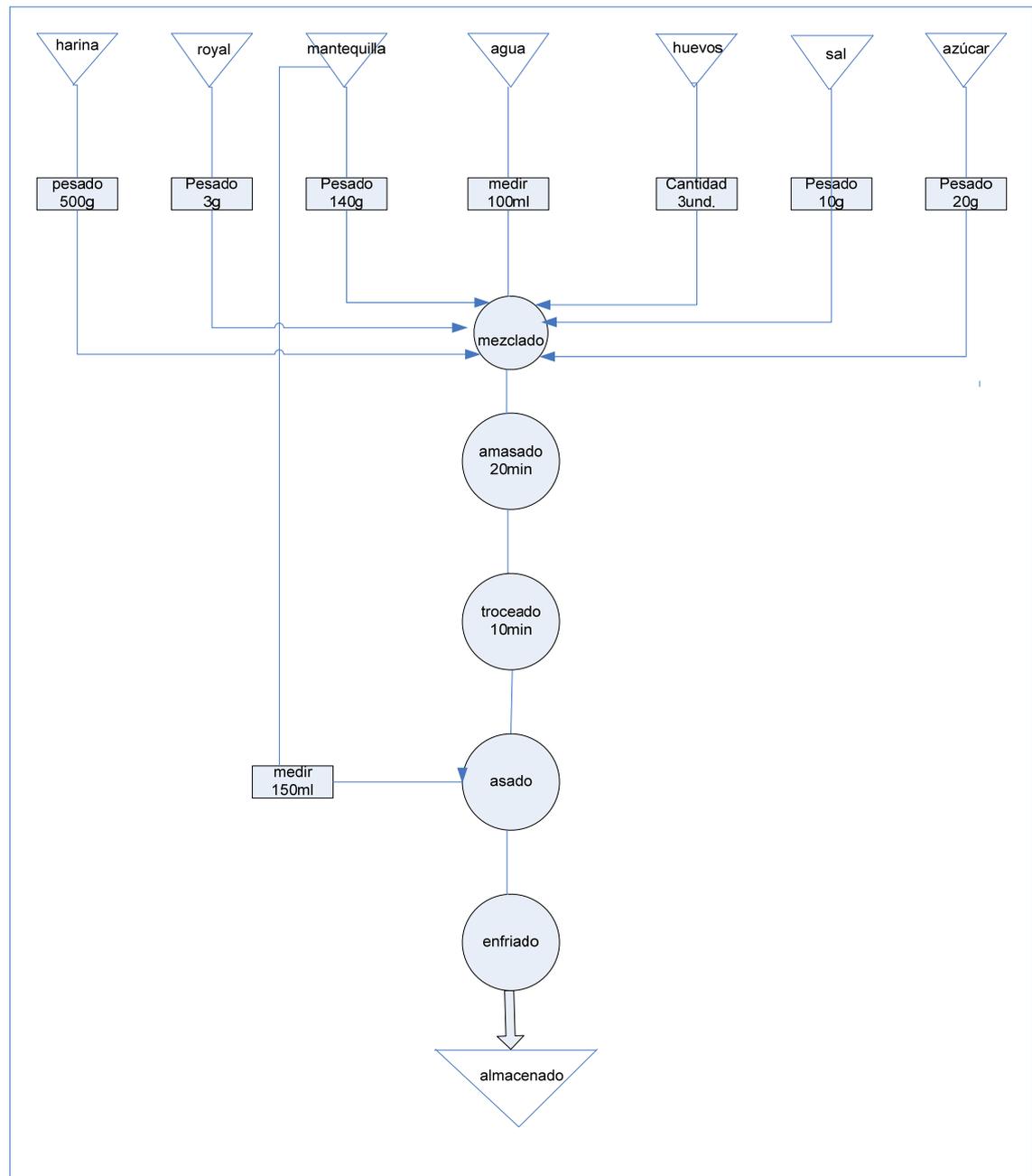
La elaboración de los fideos de trigo se realizó, según lo indicado en el siguiente diagrama de proceso.



Esquema 2: Diagrama de proceso para elaboración de pan de trigo.

### 3.3.3 Elaboración de tortillas de maíz

La elaboración de las tortillas de maíz se realizó, como se describe en el siguiente diagrama de proceso.



Esquema 3: Diagrama de proceso para elaboración de pan de trigo.

## **CAPITULO IV**

### **RESULTADOS**

#### **4.1 Recolección de muestras en mercados locales.**

Para obtener las muestras de cereales como materia prima para el aislamiento de especies fungales, se seleccionaron tres mercados locales, los cuales tienen bodegas para el almacenamiento de granos. Esta condición fue considerada para coleccionar muestras con posible contaminación. Las muestras fueron codificadas en función a los mercados de origen:

- A. Mercado "Tres de Noviembre".
- B. Mercado "Doce de Abril"
- C. Mercado Mayorista "El Arenal".

La mayor cantidad de aislados fungales fue obtenida de las muestras provenientes del mercado "Tres de Noviembre". Los hongos obtenidos fueron aislados mayoritariamente de grano y harina de maíz.

#### **4.2 Aislamiento de especies fungales**

Se obtuvieron 13 especies fungales, obtenidas mediante las metodologías descritas en 3.2.3 (ver Materiales y Métodos). Los aislados fueron mantenidos en los medios de cultivo descritos en 3.2.2. Mediante el uso de claves morfológicas, se llegó a establecer el género de las especies obtenidas (Barnett y Hunter, 1972). Los resultados del aislamiento e identificación de hongos provenientes de muestras de cereales se presentan a continuación.

Nro Aislado	Muestra	Origen	Género
1	grano	Maíz A	<i>Aspergillus</i>
2	grano	Maíz B	<i>Blastomyces</i>
3	grano	Maíz C	<i>Aspergillus</i>
4	grano	Trigo A	<i>Stachylidium</i>
5	harina	Trigo A	<i>Mammaria</i>
6	grano	Maíz B	<i>Blastomyces</i>
7	harina	Trigo A	<i>Mammaria</i>
8	grano	Maíz A	<i>Stachylidium, Aspergillus</i>
9	harina	Trigo A	<i>Periconia</i>
10	harina	Maíz A	<i>Aspergillus</i>
11	grano	Maíz C	<i>Aspergillus</i>
12	grano	Maíz A	<i>Aspergillus</i>
13	harina	Maíz A	<i>Stachylidium, Aspergillus</i>

Cuadro 8: Género de los aislados fungales obtenidos a partir de muestras de cereales.

El género más frecuente identificado en los aislados fungales fue *Aspergillus*, cuya morfología coincidió con las estructuras reproductivas observadas en los aislados. Otros géneros frecuentes fueron *Stachylidium*, *Blastomyces* y *Mammaria*.

#### 4.3 Obtención de extractos y estudio cromatográfico.

La metodología de cultivo a escala analítica, descrita en 3.2.4 permitió la obtención de trece extractos. El cultivo a escala analítica fue desarrollado en 8 días en promedio para los hongos analizados. El aislado 8, proveniente de muestra de maíz, tomó para agotar la fuente de carbono, 23 días. Este es el único aislado que se desvió del comportamiento observado para el resto de hongos.

Los extractos totales fueron sometidos a cromatografía en capa fina, con el fin de establecer la complejidad de las mezclas en función de la composición de los extractos. Para el efecto se utilizaron fases móviles formuladas a partir de mezclas

de Acetato de Etilo, cloroformo, metanol, acetona. La formulación de las diferentes fases móviles se reporta en el siguiente cuadro:

Componentes	Proporción
Acetato de Etilo:Metanol	8:2
Cloroformo:Acetona	8:2
Cloroformo:Acetona	6,6:3,3
Cloroformo:Acetato de Etilo	6:4
Cloroformo:Metanol	1:1
Cloroformo:Metanol	7:3

Cuadro 9: Formulación de las fases móviles para estudio cromatográfico.

En función de la resolución del perfil cromatográfico de los extractos evaluados, la fase móvil más utilizada en este estudio fue Cloroformo: Metanol 1:1. En este sistema se logró apreciar la mejor separación de los componentes de los extractos obtenidos. El perfil cromatográfico en esta fase móvil se presenta en la siguiente figura:

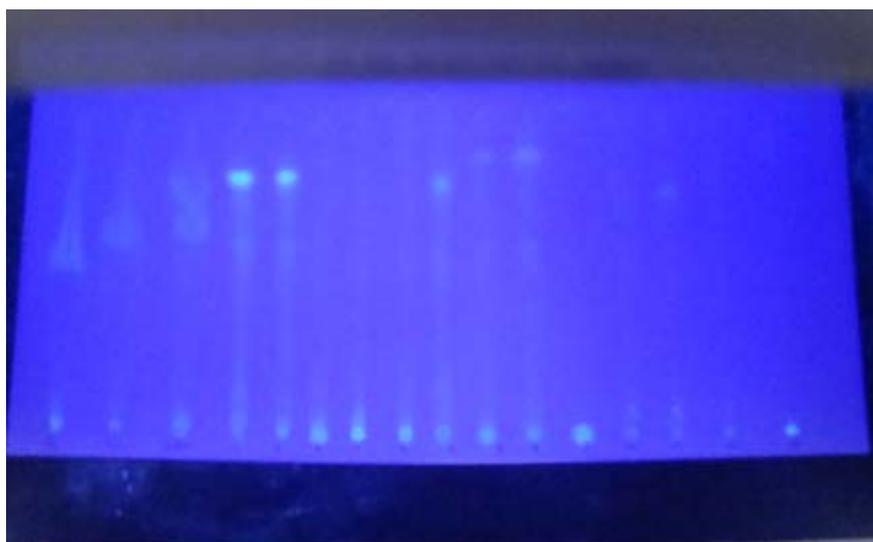


Figura 5: Perfil cromatográfico de extractos obtenidos de los hongos en estudio

#### 4.4 Identificación de micotoxinas por Cromatografía en Capa fina

Para la identificación del perfil de micotoxinas de los extractos en estudio, se utilizaron técnicas de derivatización, con el fin de observar compuestos incoloros adsorbidos en el soporte cromatográfico.

Como trabajo inicial, se registró el perfil cromatográfico observado a una  $\lambda = 365$  nm. Las micotoxinas presentes en los extractos muestran colores en gamas de azul y verde al ser observadas en estas condiciones (Aziz *et al.*, 1998). Esta información se complementa con el uso de reactivos de revelado, los cuales se combinan con las sustancias adsorbidas en CCF y pueden mostrar sustancias con diferentes grupos funcionales y características de absorción (Poole, 2003).

Proksa *et al.*, 1994, presentan una metodología aplicable a la detección de metabolitos secundarios del género *Penicillium*. En este trabajo se combina la observación de CCF a diferentes longitudes de onda con el uso de revelados químicos con Cloruro de Hierro III, hidróxido de potasio etanólico, amoníaco etanólico, y se sugiere esta estrategia para la detección rápida de micotoxinas.

Además, se registran los factores de retención ( $R_f$ ) de los compuestos observados por estas técnicas. La información obtenida al replicar esta metodología se presenta en el siguiente cuadro.

Extracto	Rf de manchas observadas				
	Sin revelar	UV <sub>365 nm</sub>	FeCl <sub>3</sub>	KOH/EtOH	NH <sub>3</sub> /EtOH
1	0,76	0,70 ; 0,58	nd	0,67A	nd
2	0,80	0,72 ; 0,58	nd	nd	nd
3	0,83	nd	0,67A	nd	nd
4	0,84	nd	nd	nd	nd
5	0,82	0,80	0,82An 0,32An	nd	nd
6	0,80	0,71	nd	nd	nd
7	0,81	0,76	nd	nd	nd
8	0,82	0,73	0,82An	0,44A ; 0,73A	nd
9	0,85	Nd	nd	nd	nd
10	0,79	0,48	nd	nd	nd
11	0,81 ; 0,75	0,81AN; 0,67; 0,5	nd	nd	nd
12	0,85Az	Nd	nd	nd	nd
13	0,88	Nd	nd	nd	nd

Cuadro 10: Resultados del análisis cromatográfico de extractos de hongos, con el uso de reveladores físicos y químicos. A = amarillo; Az=azul; An = anaranjado, nd = no detectable

Los resultados presentados en el cuadro 10 fueron comparados con los datos de desarrollo de CCF para identificación de micotoxinas, de los trabajos de Proksa *et al.*, 1994; y Aziz *et al.*, 1998. De acuerdo a esta comparación es posible identificar las siguientes micotoxinas en los extractos obtenidos.

<b>Micotoxina</b>	<b>Extracto</b>	<b>Rf y revelador según bibliografía</b>	<b>Rf y revelador según estudio</b>
Aflatoxinas	12	n/r, color azul UV <sub>365 nm</sub>	0.85; color azul UV <sub>365 nm</sub>
Acido vermiculínico	2,6,7 y 10	0.80; negativo a UV <sub>365 nm</sub>	0.79 a 0.81; negativo a UV <sub>365 nm</sub>
Vermilutina	13	0.88; negativo a UV <sub>365 nm</sub>	0.88; negativo a UV <sub>365 nm</sub>
Mitorubrinol	5	Amarillo, FeCl <sub>3</sub>	Amarillo, FeCl <sub>3</sub>
Dehidroalternusina	5 y 8	Anaranjado, FeCl <sub>3</sub>	Anaranjado, FeCl <sub>3</sub>

Cuadro 11: Comparación de datos experimentales obtenidos en el desarrollo cromatográfico de los extractos fungales con datos bibliográficos.

Las cromatografías desarrolladas con los extractos de los productos preparados a partir de los cereales en estudio, nos permitieron comparar los datos cromatográficos con los generados a partir de los extractos fungales. Esta comparación nos permite aproximarnos a las micotoxinas que estarían presentes en los productos elaborados. Los resultados se muestran en el siguiente cuadro;

<b>Micotoxina</b>	<b>Producto</b>	<b>Rf y revelador según bibliografía</b>	<b>Rf y revelador según estudio</b>
Mitorubrinol	Tortilla	0.41, color azul UV <sub>365 nm</sub> , Amarillo, FeCl <sub>3</sub>	0.41, color azul UV <sub>365nm</sub> , Amarillo, FeCl <sub>3</sub>
Acido vermiculíco	Fideos	0,63; negativo a UV <sub>365 nm</sub> , color café en KOH/EtOH	0,55; negativo a UV <sub>365 nm</sub> , color café en KOH/EtOH
Acido fumiculósico	Pan	0.44, color azul UV <sub>365 nm</sub> , amarillo en KOH/EtOH	0.44, color azul UV <sub>365 nm</sub> , amarillo en KOH/EtOH

Cuadro 11: Comparación de datos experimentales obtenidos en el desarrollo cromatográfico de los productos, los extractos fungales y datos bibliográficos.

Las micotoxinas identificadas en esta aproximación son mitorubrinol, ácido vermicúlico y ácido fumiculósico. Se descarta la presencia de aflatoxinas en los productos terminados.

La detección de estos metabolitos secundarios se fundamenta en un método cualitativo. Para verificar el nivel de estos compuestos en los alimentos es necesario desarrollar análisis más específicos que involucren técnicas cromatográficas analíticas, como HPLC (Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia) y GC-MS (Cromatografía Gaseosa acoplada a detección de Masas).

## CONCLUSIONES

El desarrollo del presente trabajo de investigación nos permite formular las siguientes conclusiones:

1. El metabolismo secundario fungal es el responsable de la producción de micotoxinas, las cuales pueden llegar a contaminar productos elaborados a partir de materias primas que han estado contaminadas por hongos.
2. La detección de micotoxinas en alimentos puede desarrollarse mediante una estrategia que combina técnicas biotecnológicas, como el cultivo de hongos a escala preparativa, con métodos cromatográficos asociados a estrategias de revelado y detección de compuestos adsorbidos en soportes de cromatografía.
3. Mediante la aplicación de estrategias químicas y biotecnológicas, hemos logrado identificar las principales micotoxinas presentes en hongos aislados a partir de trigo y maíz. Se logró identificar a aflatoxinas, ácido vermicólico, vermilitina, mitorubrinol y dehidroalternusina.
4. Los productos elaborados a partir de harina obtenida con los granos contaminados, al ser sometidos al análisis de presencia de micotoxinas, evidencian la presencia de mitorubrinol y ácido vermicólico en tortilla y fideos. El proceso de elaboración de estos productos no involucra la exposición a altas temperaturas. Este factor puede incidir en el mantenimiento de las micotoxinas hasta obtener el producto terminado.
5. Los datos cromatográficos obtenidos evidencian la presencia de ácido fumiculósico en el pan, a pesar de que esta micotoxina no fue identificada en los extractos estudiados. Es posible que, con los procesos térmicos, las micotoxinas identificadas en la materia prima se hayan degradado, cambiando sus características cromatográficas hasta hacerlas comparables a las del ácido fumiculósico.

6. El presente trabajo de investigación desarrolla una nueva estrategia para la identificación de micotoxinas en alimentos, presentando una alternativa de bajo costo y viable a las condiciones de trabajo y equipamiento de los Laboratorios de la Escuela de Ingeniería de Alimentos de la Universidad del Azuay. No obstante, para la identificación y cuantificación de estas sustancias, es necesario implementar estrategias de aislamiento de productos naturales y aplicar métodos cromatográficos analíticos como HPLC y GC-MS.

## BIBLIOGRAFÍA

### Referencias Bibliográficas

AMOS A.J., Billington A.E., Evans G., Gane R., Paine F.A., Manual de la industria de los alimentos. Zaragoza España. Editorial Acribia. (1993).

Cazar M.E., Fungicidas y bactericidas de microorganismos de suelo. Tesis para optar al Grado de Doctor en Ciencias, mención Investigación y Desarrollo de Productos Naturales. Chile. Universidad de Talca,. (2006).

Claude J., Cheftel H., Introducción a la bioquímica y tecnología de los alimentos, Zaragoza España, Editorial Acribia Vol. 1., (1979)

Dergal Salvador. Química de los Alimentos, México, Editorial Alhambra Mexicana S.A, (1993).

Desrosier Norman, Conservación de Alimentos, México México, Compañía Editorial Continental. (2004).

ERICK L., Conservación Química de los Alimentos. Zaragoza España. Editorial Acribia (1981).

Frazeer W.C., Westhoff D. C., Microbiología de los alimentos, Zaragoza España. Editorial Acribia S.A. (1958).

Hormazabal E. Fungicidas y bactericidas de micoendófitos presentes en gimnospermas nativas de Chile. Tesis para optar al Grado de Doctor en Ciencias, mención Investigación y Desarrollo de Productos Naturales. Chile. Universidad de Talca. (2004).

Larrañaga, Carballo, Rodrigues, Fernández. Control e higiene de los alimentos, Madrid España. Editorial Acribia S.A (1978).

Loncin M, Técnica de la ingeniería alimentaría. Madrid. Editorial Dossat, S.A. (1965).

Maier H.G., Métodos modernos de análisis de alimentos, Zaragoza España. Editorial Acribia S.A, (1975).

Moreau L., Borugeois L., Mescle M., Microbiología alimentaría. Zaragoza España. Editorial Acribia S.A. (1994).

Mossel Moreno García, Microbiología de los alimentos, España Zaragoza, Editorial Dossat, S.A. 1981.

Poole, C. The Essence of Chromatography. Elsevier. (2003).

Potter N., La ciencia de los alimentos, México Compañía Editorial Continental. (1973)

Primo Yufera, Alimentos Química Agrícola, v3, Alhambra, Madrid 1981.

Roberts D., Hooper W., Greenwood M., Microbiología práctica de los alimentos, España, Editorial Acribia. (1994)

## Referencias Electronicas

Aziz N., Youssef Y., El-Fouly M., Moussa L., Contamination of some common medicinal plants samples and spices by fungi and their mycotoxines. Washinton United States. *Botanical Bulletin of Academian Sinica*, **39**, pp. 279 – 285. (1998). <http://www.springerlink.com/content/6r23302u184n1110/fulltext.pdf>

Calvo A., Bokm J., Keller N., Relationship between Secondary Metabolism and Fungal Development. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **66** (3) pag. 447 – 459 (2002). <http://www.aspergillus.org.uk/secure/articles/pdfs/17276068.pdf>

Carlile M., Watkinson S., Gooday G., The Fungi. United States, Segunda Edición. Elsevier Academic Press, pp. 440 – 442 (2001) <http://www.130.88.242.202/medicine/Aspergillus/articlesoverflow/15612624.pdf>

Clarke R., Annex 4 – Micronutrient fortification of food: Technology and Quality Control. FAO Food and Nutrition Papers – 60,(1995). <http://www.fao.org/docrep/W2840E/w2840e0b.htm>

Downd P. Toxicity of naturally occurring levels of the Penicillium mycotoxines Citrinin, Ochratoxin A and Penicillic Acid to the corn earworm, *Heliothis zea*, and the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) *Environmental Entomology, Botanical Bulletin of Academian Sinica* **18**, pag. 24 -29 (1998). <http://www.epa.gov/oppt/biotech/pubs/pdf/fra008.pdf>

Kamei K., Watanabe A. Aspergillus mycotoxines and their effects on the host. *Medical Mycology Supplement* **43**, pag. S95 –S99. (2005). <http://www.epa.gov/espp/litstatus/effects/redleg-frog/mancozeb-maneb/appendix-h.pdf>

Proksa B., Adamcová J., Fuksa J. Detection and assay of secondary metabolites of *Penicillium vermiculatum* DANG. *Journal of Chromatography A*, **665**, pp. 185 – 190. (1994). <http://www.chem.sk/spravy/scu-2006e.pdf> -

Stadler M., Anke H., New nematicidal and antimicrobial compounds from the basidiomycete *Cheimonophyllum candidissimum* (Berk Curt.) SING. I. Producing organism, fermentation, isolation and biological activities. United States. *The Journal of Antibiotics*, **47**, pag. 1284 -1289 (1994). <ftp://tesis.bbt.ull.es/ccppytec/cp194.pdf>