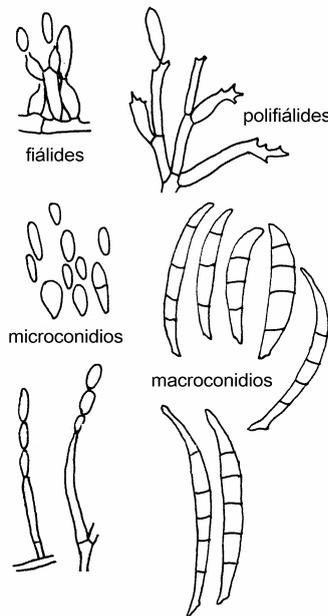


## 6. *FUSARIUM*

### MORFOLOGÍA



La forma y tamaño de las esporas es la característica principal para el reconocimiento de los fusarios. Las esporas están dispersas en el micelio aéreo o en esporodocios o masas limosas (pionotos). Los macroconidios son curvados, pluriseptados, con una célula apical más o menos puntiaguda y en muchas especies con una célula basal en forma de pie. Los microconidios son comúnmente unicelulares, elipsoidales, fusiformes, claviformes, piriformes o subglobosos, similares en ancho a los macroconidios, con una base redondeada o truncada, por lo general formando cabezuelas mucosas, pero en algunas especies en cadenas basípetas. No siempre son producidos ambos tipos de esporas. Los conidióforos del micelio aéreo en algunos casos sólo constan de una célula conidiógena, en otros están ramificados, a veces en verticilos. Las monofiálides producen conidios desde una sola abertura y en las polifiálides surgen las esporas desde más de una abertura en la misma célula (Booth 1971).

La presencia de una célula basal con forma de pie en los macroconidios se considera característica de *Fusarium* pero varios géneros de Coelomycetes también la tienen. A su vez unas pocas especies de *Fusarium* presentan conidios pluriseptados sin esa célula basal y se las llama mesoconidios (Seifert 2001). Algunas especies presentan clamidosporas terminales, laterales o intercalares, a veces formando cadenas. Las células conidiales ocasionalmente se transforman en clamidosporas. Algunas especies forman esclerocios irregulares, de color beige, ocre, pardo o gris oscuro.

Las colonias de los distintos fusarios que crecen moderada a profusamente, tienen diversos colores (blanco, rosado pálido, rojo, anaranjado, púrpura, celeste, verde aceituna o pardo), especialmente en el reverso de la colonia, excepto pardo oscuro o negro. El micelio es ralo o denso, ya sea algodonoso, como un fieltro o con una zona central de funículos, pero en algunos casos es limoso. Hay fusarios con pionotos de color anaranjado. Los pigmentos que difunden en el agar suelen variar de color o tono con el pH. Algunas especies presentan zonas concéntricas de distinta morfología macroscópica debido a la secuencia luz - oscuridad (Seifert 2001).

Los teleomorfos producen peritecios y pertenecen a los géneros *Cosmospora*, *Gibberella*, *Nectria* (*Albonectria*, *Haematonectria*), *Monographella* y *Plectosporium* (Samuels *et al.* 2001). La mayoría de las especies son heterotálicas. Ocasionalmente se suele observar a *N. haematococca* Berk. & Br. (*F. solani*) en los cultivos corrientes y con frecuencia los peritecios de la homotálica *G. zae* (Schw.) Petch (*F. graminearum*) al prolongar la incubación (Booth 1971). Las características micromorfológicas de algunas especies se presentan en las figuras de la clave dada en capítulo 10.

### CULTIVOS

Para aislar el hongo que se encuentra dentro de los vegetales hay que desinfectar la superficie sumergiendo el material durante 5 minutos en lavandina concentrada comercial diluida 1/10. También se suele emplear agua oxigenada 10 volúmenes o etanol 75°. Luego se corta el tejido con un instrumento estéril y se toma con una aguja o gancho un trocito del interior del mismo para depositarlo sobre un medio selectivo (Peptona-Diclorán, Papa-Glucosa-Diclorán) o Papa-Sacarosa (cap. 3). A las

48 hs de incubación a 25°C hay suficiente desarrollo como para hacer un repique, excepto en el caso de los pocos fusarios que requieren una temperatura de 18°C (Thrane *et al.* 1992).

Para la obtención directa de las especies de *Fusarium* en los cereales, se depositan los granos con la superficie desinfectada sobre placas del medio Papa-Glucosa-Diclorán, Papa-Sacarosa o Malta-Glucosa (cap. 3) y se incuba 7 días a 25°C bajo luz diurna indirecta o artificial (Pitt & Hocking 1997).

Cuando hay esporodoquios en la superficie vegetal se coloca una gota de agua estéril sobre los mismos y la suspensión de esporos se toca con el asa para levantar la gota que se extenderá en trazos por una superficie gelificada estéril. Con 30 a 50 aumentos se ubica el esporo y con una aguja se separa el trozo de gel para depositarlo en el medio de cultivo. Si se deja durante una noche para que germinen las esporas, se facilita la observación y el trasplante. De igual manera se suele tratar un cultivo para obtener el desarrollo originado en una sola espóra (Booth 1971).

Tanto para la identificación de las cepas como para la producción de toxinas se requiere un cultivo bien esporulado. Esto se favorece incubando a la luz solar indirecta o bajo un equipo de dos tubos fluorescentes, uno "luz de día" y otro "luz negra", encendidos cada doce horas. Como las cepas de colección suelen esporular poco, conviene sembrarlas en Zapallo (cap.3) u hojas de clavel desinfectadas e insertas en Agar-Agua (Nelson *et al.* 1983) o el medio para esporulación (Seifert 2000).

Los cultivos deben estar bien aireados porque el CO<sub>2</sub> suprime la formación de los conidios. La pigmentación puede variar con el pH. Debido a que la manera de formarse los esporos y las características de la célula conidiógena son fundamentales para la identificación de los fusarios, es necesario hacer un microcultivo (cap. 3) (Seifert 2000).

### IDENTIFICACIÓN

Los conceptos de especies fúngicas están basados sobre la morfología, los experimentos de entrecruzamiento o los datos moleculares, o en la integración de dos o tres de estos juicios (Yli-Mattila *et al.* 2002). Aunque los macroconidios son considerados típicos de *Fusarium*, hay otros géneros que forman esporas parecidas, con célula pie o sin ella. Pero la mayoría de estos hongos producen conidiomas de tipo acervular, estromático o picnidial y los fusarios presentan esporodoquios. Por otra parte si los fusarios no producen macroconidios pueden ser confundidos con otros géneros.

Nelson *et al.* (1983) pusieron orden a la taxonomía de esa época empleando un substrato natural para favorecer la conidiogénesis. Desde entonces hubo cambios en la nomenclatura y aparecieron nuevas especies. La "*Fusarium* Interactive Key" de Seifert (2000) permite conocer la proximidad de una cepa a la mayoría de las especies reconocidas. La producción de metabolitos secundarios contribuye también a la identificación. El cruzamiento en las especies que forman estructuras teleomorfas confirma la identificación en las cepas heterotálicas.

### AMBIENTE

Las especies *F. avenaceum*, *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. poae*, *F. semitectum*, *F. sporotrichioides* y *F. tricinctum* se encuentran en cereales, *F. nygamai*, *F. subglutinans* y *F. verticilloides* en maíz, *F. thapsinum* y *F. chlamydosporum* en sorgo, mientras que *F. nygamai* y *F. fujikuroi* se hallan en arroz. En legumbres se observan *F. chlamydosporum* y *F. tumidum*, y en papa *F. solani*. Las especies *F. acuminatum*, *F. equiseti*, *F. oxysporum*, *F. proliferatum*, *F. sambucinum* y *F. solani* se encuentran en diversos substratos (Marasas *et al.* 1984, Samuels *et al.* 2001).

Las especies de *Fusarium* se encuentran en los vegetales antes de la cosecha. Como persisten en los productos almacenados, si la actividad del agua lo permite crecerán causando alteraciones y a veces

produciendo toxinas. Salvo *F. culmorum*, los fusarios no compiten bien con las especies de *Aspergillus* y *Penicillium* (Lacey 1989). El cuadro 6.1. muestra los rangos de temperatura y actividad del agua para el crecimiento de algunas especies.

**Cuadro 6.1.** Temperatura y actividad del agua requeridas para el crecimiento de algunas especies de *Fusarium* (Lacey 1989, Backhouse 2001).

Especies	Ambiente	Temperatura °C	
		rango	óptima
<i>F. acuminatum</i>	helado, frío		
<i>F. avenaceum</i>	frío	-3 a 31	25
<i>F. chlamydosporum</i>	templado, subtropical, tropical		
<i>F. culmorum</i>	frío		
<i>F. equiseti</i>	frío, templado, subtropical		
<i>F. graminearum</i>	templado	...	24 a 26
<i>F. longipes</i>	subtropical, tropical		
<i>F. nygamai</i>	templado, subtropical		
<i>F. oxysporum</i>	frío, templado, subtropical		
<i>F. poae</i>	...	2 a 39	22 a 28
<i>F. sambucinum</i>	helado, frío		
<i>F. semitectum</i>	helado, frío, templado, subtropical		
<i>F. solani</i>	frío, templado, subtropical		
<i>F. tricinctum</i>	...	0 a 35	25
<i>F. verticilloides</i>	templado	2 a 37	22 a 28
Media anual: helado <5°C, frío 5-15°C, templado 15-20°C, subtropical 20-25°C, tropical >25°C.			
Especies	Ambiente	Actividad del agua	
		mínima	óptima
<i>F. avenaceum</i>	medio, húmedo	0,89	0,998
<i>F. culmorum</i>	medio, húmedo	0,87	...
<i>F. graminearum</i>	...	0,89	0,98
<i>F. moniliforme</i>	...	0,87	...
<i>F. oxysporum</i>	seco, medio, húmedo	0,87	...
<i>F. poae</i>	...	0,89	0,998
<i>F. sporotrichioides</i>	...	0,86	...
<i>F. tricinctum</i>	...	0,89	0,998
Precipitación anual: seco 250-500 mm, medio 500-1000 mm, húmedo >1000 mm.			

Algunos fusarios son patógenos de los cereales y pueden formar micotoxinas en los granos aún antes de la cosecha. Otros fusarios pueden crecer en el refrigerador y aquéllos con capacidad competitiva contribuir a la podredumbre de frutas y hortalizas almacenadas. La persistencia de los fusarios en el suelo durante uno a varios años se debe, principalmente, a la presencia de los clamidosporas. Estos requieren para germinar fuentes exógenas de nutrimentos por lo que son muy sensibles al antagonismo, pero su distribución casi universal indica la omnipresencia de los microambientes específicos. La tolerancia de algunos fusarios, tales como *F. oxysporum* y *F. solani*, a una alta presión parcial de CO<sub>2</sub> permite el aislamiento selectivo de los mismos a partir de algunos substratos muy poblados (Griffin 1973).

La velocidad de crecimiento suele variar a la temperatura óptima, pero no la respuesta al pH. El pH óptimo para *F. equiseti* está entre 5,5. y 7,5 y para *F. graminearum* alrededor de 7,2. *F. verticilloides* tolera un amplio rango de pH, desde 3 a 9,5. Estas dos últimas especies crecen bien a 25 y 30°C. La figura 6.1 muestra el efecto del pH y la temperatura sobre el crecimiento de *F. sporotrichioides* (Wheeler *et al.* 1991).

**MICOTOXINAS**

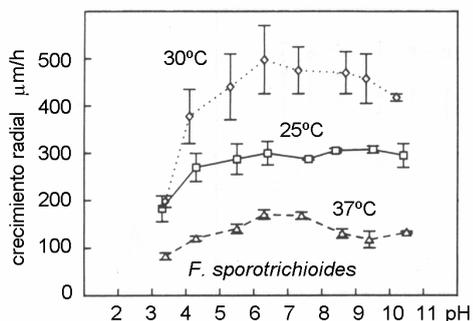


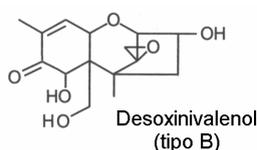
Figura 6.1. Efecto del pH y la temperatura sobre la velocidad de crecimiento de la colonia.

Los metabolitos secundarios son útiles en la taxonomía de los fusarios. Se los suele detectar aplicando sobre la placa cromatográfica de silicagel G, un pequeño cilindro del cultivo en agar YES o un grano del cultivo en arroz húmedo (cap. 4) mantenido alternadamente a 25 y 5°C (Vidal *et al.* 1984), extrayendo *in situ* con una gota de metanol y corriendo con tolueno-acetato de etilo-ácido fórmico 90% (5+4+1) (Paterson & Bridge 1994). Por ejemplo, *F. avenaceum* y *F. tricinctum* producen antibiótico Y, *F. culmorum* forma fusarina C y zearalenona, *F. equiseti* fusarocromanona y zearalenona, mientras que el cultivo de *F. poae* tiene fusarina C (Thrane 2001).

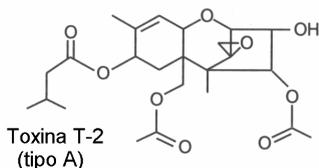
La detección de los hongos micotoxinogénicos mediante PCR requiere la disponibilidad de secuencias de ADN específicas para la producción de una toxina en particular. Es una herramienta para útil para pruebas rápidas (Edwards *et al.* 2002). Los anticuerpos monoclonales permiten la investigación y cuantificación de toxina T-2, desoxinivalenol, zearalenona y fumonisinas mediante la técnica de ELISA (Nicholson 2001).

**TRICOTECENOS**

Constituyen una familia de sustancias naturales estructuralmente relacionada, producidas por muchos fusarios y hongos relacionados (*Trichothecium*, *Cephalosporium*, *Myrothecium*, *Trichoderma*, *Stachybotrys*, *Cylindrocarpon*) (Beremand & McCormick 1992). Son tóxicos potentes de las células eucarióticas y causan lesiones dérmicas, alteraciones de la respuesta inmunológica e inhibición de la síntesis de macromoléculas. Tienen una acción letal en dosis altas. Se dividen en dos grupos, uno está formado por los derivados alcohólicos del núcleo tricoteceno y sus ésteres simples, mientras que los ésteres macrocíclicos constituyen el otro grupo más complejo (Takitani *et al.* 1979).



De acuerdo a las diferencias en el núcleo tricoteceno los ésteres simples se dividen en: A) los que presentan fluorescencia celeste por acción del H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y no reaccionan con AlCl<sub>3</sub>, y B) los que adquieren fluorescencia celeste con AlCl<sub>3</sub> (Eppley 1975). La figura 6.2 muestra las fórmulas de los principales tricotecenos.



Las especies de fusarios productoras de tricotecenos son *F. sambucinum*, *F. venenatum*, *F. camptoceras*, *F. poae*, *F. sporotrichioides*, *F. acuminatum*, *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. crookwellense*, *F. equiseti*, además algunas cepas de *F. lateritium* y del complejo *F. solani* (Desjardins & Proctor 2001).

Figura 6.2. Tricotecenos. Los tricotecenos inhiben la síntesis de proteínas, dañan las membranas celulares de los glóbulos rojos y tienen un efecto inmunosupresor. El rechazo del alimento por los cerdos se debe al efecto neurotóxico del desoxinivalenol (tipo B), también llamado vomitoxina. Una sola dosis de 250 µg/kg mantiene su acción hasta ocho días después de ingerida. Los humanos son tan sensibles como los cerdos mientras que, los bovinos pueden tolerar esta toxina debido a que los microorganismos del rumen la transforman disminuyendo la toxicidad del forraje con menos de 5 mg de desoxinivalenol/kg. (Miller *et al.* 2001). En cambio, la toxina T-2 (tipo A) causa hemorragias espectaculares, como las observadas en cerdos que consumieron cayotes amohosados (Carrillo 1990). La toxicosis en humanos fue observada en varias regiones de Asia (Edwards *et al.* 2002).

La dosis oral letal ( $DL_{50}$ ) de toxina T-2 y diacetoxiscirpenol para ratas es 5,2 y 7,3 mg/kg de peso corporal, respectivamente. Dicha dosis de fusarenona-X, 3-acetil-desoxinivalenol, nivalenol y desoxinivalenol, para ratones, es 4,5; 34, 38,9 y 46 mg/kg de peso corporal respectivamente. El rango de los residuos de toxina T-2 en carne y vísceras vacunas es 8,8-18,5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  y en leche 11,4  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , para animales que consumían forraje con 31 mg/kg (WHO 1990). El nivel máximo admisible de toxina T-2 y HT-2 es 100 y 25-100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , mientras que el de desoxinivalenol es 5-10 mg/kg (Sanchis *et al.* 2000).

La estabilidad de los tricotecenos al calor es notable, después de un calentamiento de 30 minutos a 150°C se degrada solamente un 10% de la toxina T-2. También hay una reducción gradual del contenido de desoxinivalenol a -20°C, llegando al 17% en 18 meses (Shepherd & Gilbert 1986).

El aislamiento de las toxinas de una muestra contaminada se puede hacer con acetonitrilo (Betina 1985), metanol (Takitani *et al.* 1979) o sus mezclas con agua (Romer 1986) y los lípidos pueden ser eliminados de los extractos con n-hexano o iso-octano. El empleo de metanol-agua (3+1) permite una mejor extracción de desoxinivalenol y nivalenol, pero tiene más compuestos interferentes que con el sistema acetonitrilo-agua (3+1) (Tanaka 1985).

La columna limpiadora puede contener florisil (silicato de magnesio activado) (Tanaka 1985), sílicagel-florisil (Takitani *et al.* 1979) o carbón activado-alúmina. Según el sistema solvente que se use, las otras micotoxinas tales como aflatoxinas, ocratoxinas y zearalenonas, son absorbidas por el carbón de la columna purificadora pero no los tricotecenos. Es bajo el nivel de recuperación de algunos tricotecenos con cloroformo (Romer 1986).

Los eluatos se cromatografían en una capa fina de sílicagel. Si no se eliminaron los lípidos previamente, una vez sembrado el extracto en la placa cromatográfica se puede hacer una corrida con n-hexano, iso-octano o con n-hexano-benceno (1+3) para arrastrar los contaminantes al frente de la misma, mientras las toxinas quedan en la línea de base y pueden ser desplazadas luego por otro sistema solvente. Los valores de  $R_f$  (factor de retención) varían según el tipo de gel de sílice, el espesor de la capa y el grado de actividad de la misma. Por este motivo se coloca un testigo dentro y fuera de la muestra para referencia (Betina 1985).

El método siguiente permite cuantificar la presencia de desoxinivalenol en trigo (AOAC 1995).

- *Extracción.* Añadir 200 mL de acetonitrilo-agua (84+16) a 50 g de granos y agitar enérgicamente durante 30 minutos. Filtrar y recoger 20 mL en un vaso.
- *Purificación.* Preparar una columna con 1,5 g de una mezcla de tierra de diatomeas previamente lavada con ácido, carbón activado y alúmina neutra activada (3+7+5). Aplicar succión y tapar con lana de vidrio. Agregar 20 mL del filtrado y cuando alcance el ápice del relleno, añadir los 10 mL de acetonitrilo-agua (86+14) con los que se enjuagó el vaso, continuando la succión hasta que el flujo se detenga. Recoger los eluatos.
- *Concentración.* Evaporar el solvente y retomar en 3 mL de acetato de etilo. Pasar a un tubo con tapa. Enjuagar con tres porciones de 1,5 mL de acetato de etilo y agregarlas al tubo. Evaporar a sequedad el contenido del tubo.
- *Cromatografía.* Disolver el extracto en 100  $\mu\text{L}$  de cloroformo-acetonitrilo (4+1) y aplicar alícuotas de 5 y 10  $\mu\text{L}$  junto a 1, 2, 5, 10 y 20  $\mu\text{L}$  del testigo (20 ng desoxinivalenol/ $\mu\text{L}$ ) sobre la placa de gel de sílice G-60. Desarrollar con cloroformo-acetona-isopropanol (8+1+1). Evaporar bajo campana de extracción de vapores durante 10 minutos.
- *Revelado.* Rociar con solución hidroalcohólica (1+1) de cloruro de aluminio hidratado al 20%. Mirar bajo luz UV para detectar interferencias. Calentar la placa en estufa a 120°C durante 7 minutos y observar la mancha celeste de desoxinivalenol a un  $R_f$  aproximado de 0,6.

- *Fluorodensitometría.* Se realiza a 366 nm, con un filtro de corte a 400 nm. Los valores de dos lecturas deben coincidir dentro la capacidad de reproducción de datos del equipo. El ozono producido por la lámpara de xenón puede apagar las manchas de desoxinivalenol.

El siguiente procedimiento analítico permite conocer la magnitud de la contaminación por tricotecenos en diversos sustratos (Martin et al. 1986, Romer 1986, Takitani et al. 1979).

- *Extracción, purificación, concentración y cromatografía.* Como en el caso anterior usando también testigos de toxina T2 y diacetoxiscirpenol, pero correr con tolueno - acetato de etilo- ácido fórmico 90% (5+4+1 volúmenes) o cloroformo - acetona (3+2 volúmenes).
- *Revelado.* Tratar con solución de cloruro de aluminio y observar bajo UV larga. Los tricotecenos tipo B presentan fluorescencia celeste. Rociar con una mezcla de 1 parte de ácido cromotrópico al 10% p/v en agua y 5 partes de ácido sulfúrico-agua (5+3). Calentar 5 minutos a 110°C y observar con luz visible y UV larga. Las manchas de tricotecenos tipo A se apagan pero los tipo A adquieren fluorescencia celeste. El diacetoxiscirpenol se ve blanco con UV corta. Con luz visible desoxinivalenol es gris, diacetoxiscirpenol pardo, T-2 y otros tricotecenos púrpura. Usando el sistema cloroformo-acetona, los Rf aproximados de T-2, diacetoxiscirpenol, HT-2, desoxinivalenol y nivalenol son 0,52; 0,50; 0,21; 0,20 y 0,03 respectivamente, mientras que con el otro sistema solvente los valores son 0,43; 0,39; 0,28, 0,18 y 0,05 en el mismo orden (Baxter 1983, Betina 1985).
- *Cuantificación.* Colocar la placa en un densitómetro o analizar la fotografía digital con el programa adecuado, para calcular la concentración en µg de toxinas por kg de muestra.

#### ZEARALENONA

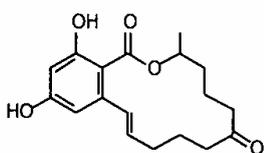


Figura 6.3. Zearalenona

Es un compuesto con una estructura estrechamente relacionada a metabolitos estrogénicos (fig. 6.3) producida, muchas veces junto con los tricotecenos, por especies que colonizan los granos: *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. crookwellense*, *F. heterosporum* y *F. equiseti*. Es débilmente fitotóxica y produce hiperestrogenismo y problemas reproductivos en el ganado y animales de experimentación. Se muestra mutagénica empleando *Bacillus subtilis* en el test de Ames. Algunos derivados son usados comercialmente para favorecer el crecimiento del ganado (Desjardins & Proctor 2001). La dosis oral letal media (DL<sub>50</sub>) para lauchas es 2 mg/g de peso corporal y para ratas 4 mg/g (Eriksen et al. 2000).

Cantidades insignificantes de residuos de zearalenona y sus metabolitos son transmitidos a la leche de rumiantes y los huevos, pero en músculo de ovinos que pastan en campos muy contaminados alcanzó hasta 500 ng/kg y la bilis llegó a presentar 3 µg/mL (Hagler et al. 2001). También suele hallarse en legumbres, frutas y pasturas. El nivel máximo admisible de zearalenona oscila entre 30 y 1.000 µg/kg de cereales, legumbres y nueces según los países (Sanchis et al. 2000). La ingesta diaria promedio de la toxina proveniente de cereales y legumbres, fue estimada en 1,5 µg/día para la dieta de Europa y 3,5 µg/día para la de Oriente Medio. La ingesta diaria tolerable máxima ha sido establecida en 0,5 µg/kg de peso corporal (Eriksen et al. 2000).

El acetonitrilo, con una pequeña proporción de agua, es un buen solvente selectivo para separar zearalenona de las interferencias presentes en los sustratos naturales y se suele agregar cloruro de potasio para evitar la formación de emulsiones. Los lípidos se quitan con iso-octano porque permite una partición adecuada para la recuperación de las micotoxinas. El extracto puede ser purificado transfiriendo, por partición, las toxinas a cloroformo (Stoloff et al. 1971). La zearalenona también se extrae con metanol-agua (6+4) o cloroformo-agua (9+1). Otra manera de purificar el extracto es a través de una columna de sulfato de sodio anhidro-silicagel. Los lípidos se eliminan lavando con hexano y la toxina se eluye con benceno-acetona (95+5) (Eppley 1974).

La cromatografía en capa fina se lleva a cabo con diversas mezclas solventes. Los sistemas que contienen ácido fórmico interfieren en la detección con violeta intenso B (Gimeno 1983). La zearalenona tiene una fluorescencia verde azulada bajo UV corta y no es visible bajo UV larga excepto a grandes concentraciones. Luego de rociar con tricloruro de aluminio y calentar, se ve como una mancha fluorescente celeste a 366 nm (Eppley 1974).

A continuación se detalla una técnica analítica para apreciar el grado de contaminación por zearalenona en maíz (AOAC 1995).

- *Extracción:* Mezclar 50 g de muestra homogeneizada y molida con 25 mL de agua, 25 g de tierra de diatomeas y 250 mL de cloroformo. Agitar 30 minutos y filtrar. Recoger 50 mL de filtrado.
- *Purificación:* Preparar una columna con 5 g de sulfato de sodio anhidro abajo, 10 g de gel de sílice (0,063-0,2 mm) y 15 g de sulfato de sodio anhidro arriba, con la ayuda de cloroformo. Drenar hasta el tope de la columna y agregar los 50 mL de filtrado. Agregar con 150 mL de hexano, luego 150 mL de benceno y descartar los eluatos. Eluir con 250 mL de benceno-acetona (95+5). Evaporar el solvente y transferir lavando 4 veces con hexano y una con 10 mL de acetonitrilo, a una ampolla de decantación. Dejar separar las fases, recuperar la inferior y lavar la superior (hexano) con 5 mL de acetonitrilo. Reunir las fases acetonitrilo y evaporar el solvente. Pasar el residuo a un tubo con tapa disolviendo con cloroformo. Evaporar a sequedad.
- *Cromatografía en capa fina:* Disolver el residuo con 500  $\mu$ L de benceno. Sembrar 4, 6, 8 y 10  $\mu$ L de extracto, 3, 5 y 7  $\mu$ L de testigo en placa de silicagel G secada 1 hora a 110°C, además 5  $\mu$ L de testigo sobre los 10  $\mu$ L del extracto. Correr con cloroformo-etanol (95+5) o benceno-ácido acético (95+5). La zearalenona aparece a un Rf aproximado de 0,5 bajo UV corta.
- *Revelada:* Rociar con tricloruro de aluminio al 20% en etanol 50% y observar bajo UV larga, calentar a 120°C durante 5 minutos, enfriar y observar la fluorescencia celeste bajo UV larga.
- *Cuantificación:* Colocar la placa en un fluorodensitómetro y calcular la concentración de  $\mu$ g de la toxina por kg de muestra.
- *Testigo:* Contiene 50  $\mu$ g zearalenona/mL benceno. La absorción máxima en benceno ocurre a 317 nm con un coeficiente de absorción molar de 6.060. Los máximos de absorción en metanol se observan a 314, 274 y 236 nm, con unos coeficientes de absorción molar de 6.000, 13.900 y 30.000, respectivamente. El peso molecular es 318.

## FUMONISINAS

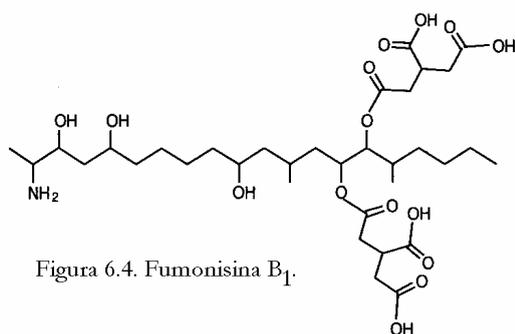


Figura 6.4. Fumonisinina B<sub>1</sub>.

Son fitotoxinas y además micotoxinas que interfieren en el metabolismo de los esfingolípidos, asociadas al cáncer esofágico humano y la leucoencefalomalacia equina y el edema pulmonar porcino. Son producidas por *F. proliferatum*, *F. verticilloides*, *F. nygamai*, *F. fujikuroi* y algunas cepas de *F. napiforme*, *F. thapsinum*, *F. sacchari*, *F. dlamini*, *F. subglutinans*, *F. anthophilum* y del complejo *F. oxysporum* (Desjardins & Proctor 2001).

El isómero que predomina es la fumonisina B<sub>1</sub> (figura 6.4) mientras que las B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub> y B<sub>4</sub> se encuentran en menor cantidad. Otras cuatro series de fumonisinas (A, AK, C, P) están relacionadas estructuralmente a la serie B, y suelen encontrarse en baja cantidad en los cultivos de *F. verticilloides* (Desjardins & Proctor 2001). Su estructura se asemeja a la esfingosina, un fosfolípido de las membranas celulares, de la que es un competidor metabólico (Edwards *et al.* 2002). La fumonisina B<sub>1</sub> interactúa con

la aflatoxina B<sub>1</sub> acelerando el proceso de generación de cáncer hepático en animales de experimentación (Gelderblom *et al.* 2002)

El maíz es la principal fuente alimenticia contaminada por estas toxinas (Pascale *et al.* 2002). La molienda seca del maíz distribuye la fumonisina entre al afrecho, el germen y la sémola. Las fumonisinas también pueden estar en el maíz agregado al mosto de cerveza, pues son estables a los tratamientos por calor y la fermentación alcohólica. El tratamiento alcalino durante la "nixtamalización" y los azúcares reductores disminuye la toxicidad (Marasas *et al.* 2001).

Se recomendaron concentraciones máximas de 5, 10 y 50 mg de fumonisina B<sub>1</sub>/kg de forraje para equinos, porcinos y vacunos o aves. La concentración permitida en maíz para consumo humano en Suiza es 1 mg/kg (Sanchis *et al.* 2000). La dosis diaria tolerable máxima provisional es 2 µg de fumonisinas/kg de peso corporal (Marasas *et al.* 2000). La ingesta media diaria en Argentina es 0,2 µg de fumonisinas/kg de peso corporal (Bolger *et al.* 2001).

Una técnica analítica es la siguiente (Rottinghaus *et al.* 1992).

- *Extracción:* Mezclar 50 g de muestra homogeneizada y molida con 100 mL de acetonitrilo - agua (1 + 1), agitar durante 30 minutos y filtrar.
- *Purificación:* Pasar 2 mL de filtrado mezclado con 5 mL de solución de cloruro de potasio al 1% en agua por una columna C<sub>18</sub>, previamente tratada con 5 mL de metanol y 5 mL de solución cloruro de potasio. Lavar con 5 mL de solución de cloruro de potasio y 2 mL de acetonitrilo - solución de cloruro de potasio (1 + 9). Eluir con 4 mL de acetonitrilo - agua (7 + 3).
- *Concentración:* Evaporar a sequedad el eluido bajo una corriente de aire, disolver el residuo con 100 µL del solvente de extracción.
- *Cromatografía:* Sembrar 5, 10 y 10 µL en una placa de sílicagel normal secando con corriente de aire, una siembra simultáneamente con 10 µL de testigo (100 ng de fumonisina B<sub>1</sub>). Correr con cloroformo - metanol - ácido acético (60 + 35 + 10).
- *Revelado:* Rociar con p-anisaldehído al 0,5% en metanol - ácido sulfúrico - ácido acético (85 + 5 + 10). Calentar a 110°C durante 5 minutos y fumonisina B<sub>1</sub> aparecerá de color rojo a un R<sub>f</sub> aproximado de 0,32 (Ackermann 1991). El límite de detección es 1 mg/kg.

Otro método fue usado en un estudio colaborativo (FAO/IAEA 2000) donde la extracción se hizo agitando 20 g de maíz con 100 mL de metanol-agua (3 + 1) durante una hora, sin molienda ni homogenización. Luego de ajustar a pH 6,0 - 6,1 se pasó 10 mL de filtrado por un cartucho SAX intercambiador de aniones, aunque también se puede usar una columna de inmuno afinidad. Las fumonisinas fueron eluidas con una solución de ácido acético al 0,5% en metanol (Shephard *et al.* 1990). Luego de evaporar a sequedad, se redisolvieron en metanol y obtuvieron los compuestos derivados con fluorescamina antes de hacer la corrida en una placa de fase reversa. El límite de visualización fue 0,4 mg/kg.

#### OTRAS TOXINAS

Moniliformina (fig.6.5) es una micotoxina con estructura ciclobuteno, formada por *F. napiforme*, *F. thapsinum*, *F. nygamai*, *F. proliferatum*, *F. subglutinans*, *F. fujikuroi*, *F. anthophilum*, *F. beomiforme*, *F. acuminatum*, *F. avenaceum*, *F. semitectum*, *F. equiseti*, complejo *F. oxysporum* y algunas cepas de *F. verticilloides* (Desjardins & Proctor 2001). Es cardiotoxica y una dosis de 1 µg/kg de peso corporal causa falla cardíaca en pollos parrilleros. Es la causa de una enfermedad endémica en China (Edwards *et al.* 2002).

Fusaproliferina (fig. 6.5) es un terpenoide tóxico para los animales de experimentación producido por *F. proliferatum* y *F. subglutinans*. Es muy teratogénico de los embriones de pollos (Pascale *et al.* 2002).

Fusarocromanona causa la formación anormal del cartílago en aves y es producida solamente por *F. equiseti* (fig. 6.5). También afecta a la función inmunológica (Bryden *et al.* 2001).

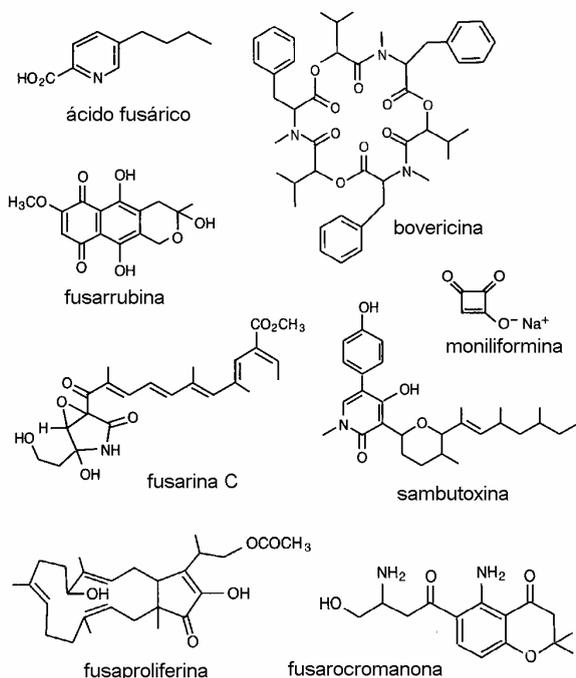


Figura 6.5. Otros metabolitos secundarios.

Las eniantinas son péptidos cíclicos, por ejemplo bovericina (fig. 6.5), con toxicidad para un amplio rango de organismos. Sambutoxina (fig. 6.5) es generada por algunas cepas fitopatógenas de *F. sambucinum* identificadas actualmente como *F. venenatum*. Las nafazarinas, por ejemplo fusarribina (fig. 6.5), son naftoquinonas hidroxiladas con actividad fitotóxica. La fusarina C (fig.6.5) es mutagénica y la forman *F. proliferatum*, *F. verticilloides*, *F. sambucinum*, *F. poae*, *F. sporotrichioides*, *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. crookwellense*, *F. avenaceum* y *F. tricinctum*. El ácido fusárico (fig.6.5) es fitotóxico y producido por *F. napiforme*, *F. thapsinum*, *F. nygamai*, *F. proliferatum*, *F. subglutinans*, *F. fujikuroi*, *F. verticilloides*, *F. sacchari*, complejo *F. oxysporum*, *F. sambucinum*, *F. crookwellense*, *F. heterosporum* y complejo *F. solani* (Desjardins & Proctor 2001)

## REFERENCIAS

- Ackermann T. 1991. Fast thin-layer chromatography systems for fumonisin isolation and identification. *Journal of Applied Toxicology* 11: 451.
- AOAC International. 1995. *Official Methods of Analysis*. 16<sup>o</sup> ed. P. Cunniff, editor. Gaithersburg, MD.
- Backhouse D, Burgess LW, Summerell BA. 2001. Biogeography of *Fusarium*. pp. 122-137 en: *Fusarium*. Summerell BA *et al.*, eds. APS Press. St. Paul, Minnesota.
- Baxter JA. 1983. Use of chromotropic acid for improved thin layer chromatographic visualization of trichothecene mycotoxins. *Journal of Chromatography* 261: 130 – 133.
- Beremand MN, McCormick SP. 1992. Biosynthesis and regulation of trichothecene production by *Fusarium* species. pp. 359-384 en: *Handbook of Applied Mycology*. Vol.5. Bhatnagar D *et al.*, eds. Marcel Dekker. New York.
- Betina V. 1985. Thin-layer chromatography of mycotoxins. *Journal of Chromatography* 334: 21 - 276.
- Bolger M *et al.* 2001. Fumonisin. JECFA 47. (<http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v47je03.htm>)
- Booth C. 1971. *The Genus Fusarium*. CMI. Kew, Surrey. pp. 19-31.
- Bryden WL *et al.* 2001. Other significant *Fusarium* mycotoxins. pp. 360-392 en: *Fusarium*. Summerell BA *et al.*, eds. APS Press. St. Paul, Minnesota.
- Carrillo L. 1990. Micotoxinas de *Fusarium* spp. en frutos deteriorados de *Cucurbita ficifolia*. *Revista Argentina de Microbiología* 22: 212 – 215.
- Desjardins AE, Proctor RH. 2001. Biochemistry and genetics of *Fusarium* toxins. pp. 122 - 137 en: *Fusarium*. Summerell BA *et al.*, eds. APS Press. St. Paul, Minnesota.
- Edwards SG *et al.* 2002. PCR-based detection and quantification of mycotoxigenic fungi. *Mycological Research* 106: 1005-1025.
- Eppley RM. 1974. Survey of corn for *Fusarium* toxins. *Journal of the AOAC* 54: 91 - 97.

- Eppley RM. 1975. Methods for the detection of trichothecenes. *Journal of the AOAC* 58: 906 - 908.
- Eriksen GS *et al.* 2000. Safety evaluation of certain food additives and contaminants: Zearalenone. World Health Organization, Ginebra.
- FAO/IEA. 2000. Evaluation of methods of analysis for determining mycotoxin contamination of food and feed. Report. Viena.
- Gelderblom WCA *et al.* 2002. Interaction of fumonisin B<sub>1</sub> and aflatoxin B<sub>1</sub> in a short-term carcinogenesis model in rat liver. *Toxicology* 171: 161-173.
- Gimeno A. 1983. Rapid thin-layer chromatographic determination of zearalenone in corn, sorghum and wheat. *Journal of the AOAC* 66: 565 - 569.
- Griffin DM. 1973. *Ecology of Soil Fungi*. Chapman & Hall, Londres. pp. 57, 90, 135.
- Hagler WM *et al.* 2001. Zearalenone: mycotoxin or mycoestrogen? pp. 321-331 en: *Fusarium*. Summerell BA *et al.*, eds. APS Press. St. Paul, Minnesota.
- Lacey J. 1989. Pre- and post-harvest ecology of fungi causing spoilage of foods and other stored products. *Journal of Applied Bacteriology, Symposium Supplement*: 11S - 25S.
- Marasas WFO *et al.* 1984. *Toxigenic Fusarium Species*. The Pennsylvania State University Press. University Park and London.
- Marasas WFO *et al.* 2000. Fumonisin B<sub>1</sub>. *Environmental Health Criteria* 219. World Health Organization, Ginebra.
- Marasas WFO *et al.* 2001. Fumonisin - Occurrence, toxicology, metabolism and risk assessment. pp. 332 - 359 en: *Fusarium*. Summerell BA *et al.*, eds. APS Press. St. Paul, Minnesota.
- Martin PJ *et al.* 1986. Chromatography of trichothecene mycotoxins. *Journal of Liquid Chromatography* 9: 1591 - 1602.
- Miller JD *et al.* 2001. Desoxynivalenol: a 25 year perspective on a trichothecene of agricultural importance. pp. 310 - 320 en: *Fusarium*. Summerell BA *et al.*, eds. APS Press. St. Paul, Minnesota.
- Nicholson P. 2001. Molecular assays as aids in the detection, diagnosis and quantification of *Fusarium* species in plants. pp. 176-192 en: *Fusarium*. Summerell BA *et al.*, eds. APS Press. St. Paul, Minnesota.
- Nelson PE *et al.* 1983. *Fusarium species. An illustrated manual for identification*. The Pennsylvania State University Press, University Park.
- Pascale M *et al.* 2002. Accumulation of fumonisins, beauvericin and fusaproliferin in maize hybrids inoculated under field conditions with *Fusarium proliferatum*. *Mycological Research* 106: 1026-1030.
- Paterson RRM, Bridge PD. 1994. *Biochemical Techniques for Filamentous Fungi*. CAB International. Wallingford, Oxon. pp. 52- 56.
- Pitt JI, Hocking AD. 1997. *Fungi and Food Spoilage*. Blackie Academic & Professional, Londres. pp. 107-143
- Romer TR. 1986. Use of small charcoal/alumina cleanup columns in determination of trichothecene mycotoxins in foods and feeds. *Journal of the AOAC* 69: 699 - 703.
- Rottinghaus GE *et al.* 1992. A rapid, sensitive thin layer chromatography procedure for the detection of fumonisin. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 4: 326 - 329.
- Samuels GJ *et al.* 2001. Perithecial species of *Fusarium*. pp. 122-137 en: *Fusarium*. Summerell BA *et al.*, eds. APS Press, St. Paul.
- Sanchis V *et al.* 2000. Control de micotoxinas emergentes. Situación legislativa. *Revista Iberoamericana de Micología* 17: S69 - S75.
- Seifert K. 2000. FusKey. Agriculture and Agri-Food Canada. (<http://res.agr.ca/brd/fusarium/>)
- Seifert K. 2001. *Fusarium* and anamorph generic concepts. pp. 15 - 28 en: *Fusarium*. Summerell BA *et al.*, eds. APS Press. St. Paul, Minnesota.
- Shephard GS *et al.* 1990. Quantitative determination of fumonisins B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> by HPLC with fluorescence detection. *Journal of Liquid Chromatography* 13: 2077 - 2087.
- Shepherd MJ, Gilbert J. 1986. *Fusarium* mycotoxin in cereals and other stored products. *International Biodeterioration* 22 supplement: 61 - 67.
- Stoloff L *et al.* 1971. A multimycotoxin detection method for aflatoxins, ochratoxins, zearalenone, sterigmatocystin and patulin. *Journal of the AOAC* 54: 91 - 97.
- Swanson BG. 1987. Mycotoxins on fruits and vegetables. *Acta Horticulturae* 207: 49 - 61.
- Takitani S *et al.* 1979. Spectrodensitometric determination of trichothecene mycotoxins with 4 (p-

- nitrobenzyl) piridine on silicagel thin layer chromatography. *Journal of Chromatography* 172: 335 - 342.
- Tanaka T. 1985. Improved methodology for the simultaneous detection of the trichothecene mycotoxins deoxynivalenol and nivalenol in cereals. *Food Additives and Contaminants* 2: 125 - 137.
  - Thrane U *et al.* 1992. Improved methods for detection and identification of toxigenic *Fusarium* species. pp. 285-291 en: *Modern Methods in Food Mycology*. Samson RA *et al.*, eds. Elsevier. Amsterdam.
  - Thrane U. 2001. Developments in the taxonomy of *Fusarium* species based on secondary metabolites. pp. 29-49 en: *Fusarium*. Summerell BA *et al.*, eds. APS Press. St. Paul.
  - Vidal D *et al.* 1984. Influence de la température sur la production de diacétoxyscirpenol et sur la sporulation d'une culture liquide de *Fusarium sambucinum*. *Comptes Rendus Société de Biologie* 178: 518 - 525.
  - Wheeler KA *et al.* 1991. Influence of pH on the growth of some toxigenic species of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium*. *International Journal of Food Microbiology* 12: 141-150.
  - WHO. 1990. Selected Mycotoxins: Ochratoxins, Trichothecenes, Ergot. *Environmental Health Criteria* 105. Ginebra.
  - Yli-Mattila T *et al.* 2002. Molecular, morphological and phylogenetic analysis of the *F. avenaceum* / *F. arthrosporoides* / *F. tricinctum* species complex – a polyphasic approach. *Mycol. Res.* 106: 655 - 669.