



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Farmacia – Programa de Magíster en Ciencias Farmacéuticas

**Caracterización de especies de *Fusarium* aisladas de trigo nacional
respecto a su capacidad micotoxigénica.**

Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias Farmacéuticas

Noemí Elena Caro Jara
Concepción – Chile
2015

Profesor Guía: Mario Vega Herrera
Profesor Co-tutor: Gisela Ríos Gajardo
Dpto. de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Farmacia
Universidad de Concepción

Resumen

La fusariosis de la espiga es una de las enfermedades fúngicas más importantes que afectan los cultivos de trigo a nivel mundial. En Chile, no es común la ocurrencia de esta enfermedad, sin embargo, durante el ciclo agrícola 2012/13 en la provincia de Ñuble, Región del Bio Bio, se observó trigo candeal (*Triticum turgidum*) con sintomatología de fusariosis de la espiga. El objetivo de este trabajo fue aislar e identificar el hongo responsable de esta patología y evaluar si éste posee la capacidad de producir micotoxinas. Además de implementar una metodología analítica adecuada para el análisis de micotoxinas en trigo.

El hongo aislado desde las glumas de las espigas con sintomatología de fusariosis de la espiga fue identificado morfológica y molecularmente como *Fusarium graminearum*. Utilizando un medio de arroz para la producción de micotoxinas *in vitro*, se determinó que el aislamiento de *Fusarium graminearum* tiene la capacidad de producir micotoxinas bajo las condiciones ensayadas. El aislamiento produce 15-ADON > DON > 3-ADON, lo que permite su clasificación en el quimiotipo 15-ADON.

Se implementó una metodología analítica utilizando cromatografía de gas con detector de captura de electrones (GC-ECD) para el análisis de tricotecenos de tipo B (DON, 3-ADON, 15-ADON y NIV). La extracción de las micotoxinas se realizó utilizando acetonitrilo:agua (80:20, v/v). Los extractos se limpiaron utilizando columnas de extracción en fase sólida Bond Elut Mycotoxin. Posteriormente, se derivatizaron los extractos para obtener trimetilsilil derivados, los cuales se analizaron mediante GC-ECD. Con la metodología implementada se obtuvieron valores de recuperación promedio entre 50.1 – 110 % con una desviación estándar relativa inferior a 7 %. Los límites de detección y cuantificación se calcularon utilizando el método de señal:ruido, obteniéndose valores entre 10.0 – 14.5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para el límite de detección y 30.0 – 44.0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para el límite de cuantificación.

Índice

Resumen	2
Índice	3
Abreviaturas.....	10
1. Introducción	12
1.1. Género <i>Fusarium</i>	12
1.1.1. Caracterización morfológica	12
1.1.2. Caracterización molecular	14
1.2. Fusariosis de la espiga	15
1.2.1. Etiología de la enfermedad.....	15
1.2.2. Síntomas, signos y consecuencias de FHB.....	15
1.2.3. Ciclo de vida.....	16
1.3. Micotoxinas producidas por <i>Fusarium</i> spp.	18
1.3.1. Tricotecenos.....	19
1.3.2. Biosíntesis de tricotecenos	22
1.3.3. Quimiotipos de <i>Fusarium graminearum</i>	24
1.4. Métodos de análisis de tricotecenos.....	25
2. Hipótesis de trabajo.....	27
3. Objetivos	27
3.1. Objetivo general.....	27
3.2. Objetivos específicos	27
4. Materiales	28
4.1. Equipos y materiales	28
4.2. Reactivos.....	29
4.3. Medio de cultivo	29
4.4. Soluciones.....	29
4.4.1. Solución tampón.....	29
4.4.2. Solución extractiva	29
4.4.3. Soluciones patrón	30
5. Metodología	31

5.1. Aislamiento y purificación de especies de <i>Fusarium</i> desde trigo	31
5.2. Identificación de las especies aisladas	31
5.2.1. Identificación morfológica	31
5.2.2. Identificación molecular	31
5.3. Implementación de un método cromatográfico para la detección y cuantificación de tricotecenos en trigo	32
5.3.1. Extracción y limpieza	32
5.3.2. Derivatización de las micotoxinas	32
5.3.3. Condiciones cromatográficas	33
5.4. Determinación parámetros analíticos	33
5.4.1. Linealidad	33
5.4.2. Precisión y exactitud	34
5.4.3. Límite de detección y límite de cuantificación	34
5.5. Producción de micotoxinas <i>in vitro</i>	34
5.5.1. Diseño de experimento	34
5.5.2. Contaminación de arroz	35
5.5.3. Detección y cuantificación de las micotoxinas producidas	35
5.6. Tratamiento de datos	36
6. Resultados	37
6.1. Identificación de las especies aisladas	37
6.1.1. Identificación morfológica	37
6.1.2. Identificación molecular	38
6.2. Implementación de un método analítico para la detección y cuantificación de tricotecenos en trigo	40
6.2.1. Micotoxinas estudiadas	40
6.2.2. Temperatura de reacción	41
6.2.3. Elección estándar interno	42
6.3. Determinación parámetros analíticos	43
6.3.1. Linealidad	43
6.3.1.1. Curva de calibración estándar	43
6.3.1.2. Curva de calibración en matriz	44

6.3.2. Precisión y exactitud.....	48
6.3.3. Límite de detección y límite de cuantificación.....	49
6.3.4. Análisis de muestra de trigo afectado con FHB	49
6.4. Producción de micotoxinas <i>in vitro</i>	49
6.4.1. Primer ensayo	49
6.4.2. Segundo ensayo	50
6.4.3. Tercer ensayo.....	61
6.4.4. Confirmación de la identidad de las micotoxinas producidas	71
7. Conclusiones	76
8. Referencias	77
Anexo A.....	84
Anexo B.....	86



Índice de tablas

Tabla 1.1	Micotoxinas producidas por especies de <i>Fusarium</i> asociadas a FHB.....	19
Tabla 1.2	Valores límites de DON establecidos por la Comisión de las Comunidades Europeas (Reglamento (CE) N° 1881/2006).....	22
Tabla 5.1	Condiciones experimentales ensayo producción de micotoxinas <i>in vitro</i>	35
Tabla 6.1	Linealidad de tricotecenos en estándar.....	44
Tabla 6.2	Linealidad de tricotecenos en trigo.....	45
Tabla 6.3	Recuperación y desviación estándar relativa de tricotenenos en trigo sobrecargado	48
Tabla 6.4	Límite de detección y cuantificación de tricotecenos en trigo.	49
Tabla 6.5	Micotoxinas producidas por aislamiento FUS 2013-7 en arroz.	50
Tabla 6.6	Variables estudiadas en el diseño experimental de tipo factorial completo de dos niveles (2^3), segundo ensayo de producción de micotoxinas <i>in vitro</i>	51
Tabla 6.7	Cantidad de deoxinivalenol producido por el aislamiento FUS 2013-7 en el segundo ensayo de producción de micotoxinas <i>in vitro</i>	52
Tabla 6.8	Cantidad de 3-acetildeoxinivalenol producido por el aislamiento FUS 2013-7 en el segundo ensayo de producción de micotoxinas <i>in vitro</i>	52
Tabla 6.9	Cantidad de 15-acetildeoxinivalenol producido por el aislamiento FUS 2013-7 en el segundo ensayo de producción de micotoxinas <i>in vitro</i>	53
Tabla 6.10	Evaluación del modelo PLS tras 2 PLS-componentes, segundo ensayo de producción de micotoxinas <i>in vitro</i>	54
Tabla 6.11	Coeficientes de regresión normalizados (<i>b</i>) para el modelo PLS, segundo ensayo de producción de micotoxinas <i>in vitro</i>	55
Tabla 6.12	Variables estudiadas en el diseño experimental de tipo factorial completo de dos niveles (2^3), tercer ensayo de producción de micotoxinas <i>in vitro</i>	61
Tabla 6.13	Cantidad de deoxinivalenol producido por el aislamiento FUS 2013-7 en el tercer ensayo de producción de micotoxinas <i>in vitro</i>	63
Tabla 6.14	Cantidad de 3-acetildeoxinivalenol producido por el aislamiento FUS 2013-7 en el tercer ensayo de producción de micotoxinas <i>in vitro</i>	63
Tabla 6.15	Cantidad de 15-acetildeoxinivalenol producido por el aislamiento FUS 2013-7 en el tercer ensayo de producción de micotoxinas <i>in vitro</i>	64
Tabla 6.16	Evaluación del modelo PLS tras 3 PLS-componentes, tercer ensayo de producción de micotoxinas <i>in vitro</i>	65

Tabla 6.17 Coeficientes de regresión normalizados (*b*) para el modelo PLS, tercer ensayo de producción de micotoxinas *in vitro*.66

Tabla 6.18 Transiciones utilizadas para el análisis en modo MRM.72



Índice de figuras

Figura 1.1 Macroconidia de especies de <i>Fusarium</i>	14
Figura 1.2 Ciclo infeccioso de <i>Fusarium graminearum</i> (<i>Gibberella zeae</i>) en trigo.	18
Figura 1.3 Estructura de tricotecenos de tipo A y B.....	20
Figura 1.4 Ruta biosintética propuesta para los tricotecenos producidas por <i>Fusarium</i>	24
Figura 6.1 Aislamiento FUS 2013-7 en medio PDA.....	37
Figura 6.2 Macroconidia del aislamiento FUS 2013-7.....	38
Figura 6.3 Gel de agarosa ensayo PCR utilizando partidores para <i>F. graminearum</i> y <i>F. pseudograminearum</i>	39
Figura 6.4 Gel de agarosa ensayo PCR utilizando partidores para <i>F. graminearum</i> , <i>F. avenaceum</i> , <i>F. culmorum</i> y <i>F. acuminatum</i>	40
Figura 6.5 Cromatograma de una mezcla de estándar de DON, 3-ADON, NIV, DAS y HT-2 derivatizados con BSA + TMCS + TMSI.	41
Figura 6.6 Comparación temperatura de reacción de derivatización de tricotecenos de tipo B con BSA + TMCS + TMSI.....	42
Figura 6.7 Cromatograma de trigo blanco y trigo sobrecargado con o,p'-DDE, p,p'-DDE y TCTB.....	43
Figura 6.8 Curvas de calibración estándar.....	44
Figura 6.9 Curva de calibración en trigo.	45
Figura 6.10 Comparación curva de calibración estándar y matriz para deoxinivalenol.....	46
Figura 6.11 Comparación curva de calibración estándar y matriz para 3-acetildeoxinivalenol.	46
Figura 6.12 Comparación curva de calibración estándar y matriz para 15-acetildeoxinivalenol.	47
Figura 6.13 Comparación curva de calibración estándar y matriz para nivalenol.	47
Figura 6.14 Efecto de la variable cantidad de agua sobre la producción de micotoxinas <i>in vitro</i>	56
Figura 6.15 Gráficos de interacción T_{inc} vs. Agua.....	56
Figura 6.16 Gráfico de <i>loadings</i> del primer y segundo PLS-componente, segundo ensayo de producción de micotoxinas <i>in vitro</i>	57
Figura 6.17 Gráfico de <i>loadings</i> del primer y segundo PLS-componente con proyecciones para las respuestas (a) 3-ADON; (b) DON; y (c) 15-ADON, segundo ensayo de producción de micotoxinas <i>in vitro</i>	59

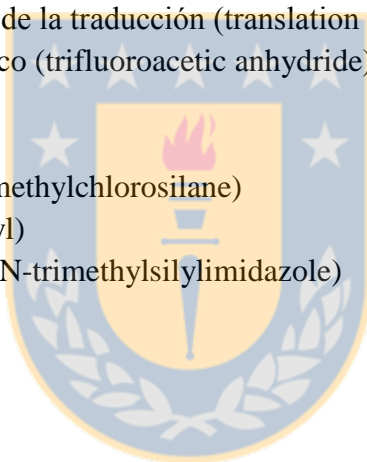
Figura 6.18 Gráfico de coeficientes de regresión normalizados (<i>b</i>) para el modelo PLS, segundo ensayo de producción de micotoxinas <i>in vitro</i>	60
Figura 6.19 Gráfico de coeficientes de regresión normalizados (<i>b</i>) para el modelo PLS, tercer ensayo de producción de micotoxinas <i>in vitro</i>	67
Figura 6.20 Gráficos de efectos principales sobre la producción de micotoxinas <i>in vitro</i> . (a) Efecto del tiempo de incubación; (b) efecto de la temperatura de incubación; y (c) efecto de la cantidad de agua.	68
Figura 6.21 Gráfico de <i>loadings</i> del primer y segundo PLS-componente con proyecciones para las respuestas (a) 15-ADON; (b) 3-ADON; y (c) DON.	70
Figura 6.22 Cromatograma ensayo producción de micotoxinas <i>in vitro</i> incubación a 20 °C, 3 semanas, 40 mL de agua.....	72
Figura 6.23 Cromatogramas de estándar de TCTB y muestra de arroz en modo MRM.....	74
Figura 6.24 Detección de ZEA en muestra ensayo producción de micotoxinas <i>in vitro</i> incubada a 20 °C, 3 semanas, 40 mL agua. Cromatogramas en modo MRM: A) estándar ZEA, B) muestra de arroz. Espectros de masas: C) estándar de ZEA, D) muestra de arroz.....	75



Abreviaturas

15-ADON: 15-acetildeoxinivalenol
3-ADON: 3-acetildeoxinivalenol
4-ANIV: 4-acetilnivalenol (fusarenon-X)
A_A: área del analito
ADN: ácido desoxirribonucleico
A_{IS}: área del estándar interno
ANOVA: análisis de varianza (analysis of variance)
AOAC: asociación de comunidades analíticas (association of analytical communities)
ARN: ácido ribonucleico
BSA: N,O-bis(trimetilsilil)acetamida (N,O-bis(trimethylsilyl)acetamide)
CLA: agar hojas de clavel (carnation leaf-piece agar)
CTAB: bromuro de cetil-trimetil amonio (cetyltrimethyl ammonium bromide)
DAS: diacetoxiscirpenol
dNTP: desoxinucleótidos trifosfato (deoxynucleotide triphosphate)
DON: deoxinivalenol
dSPE: extracción en fase sólida por dispersión (dispersive solid-phase extraction)
ECD: detector de captura de electrones (electron capture detector)
ENN: enantinas
FFD: diseño factorial completo (full factorial design)
FHB: fusariosis de la espiga (fusarium head blight)
FID: detector de ionización de llama (flame ionization detection)
GC: cromatografía de gas
GC-ECD: cromatógrafo de gas con detector de captura de electrones
GC-MS/MS: cromatógrafo de gas con detector de masas
HFBA: anhídrido heptafluorobutírico (heptafluorobutyric anhydride)
HPLC: cromatografía líquida de alta eficiencia (high performance liquid chromatography)
HT-2: toxina HT-2
IGS: región espaciadora intergénica (intergenic spacer region)
ITS: región espaciadora de transcripción interna (internal transcribed spacer región)
MON: moniliformina
MRM: monitorización de reacción múltiple (multiple reaction monitoring)
mtADN: ácido desoxirribonucleico mitocondrial
nd: no detectado
NIV: nivalenol
o,p'-DDE: 2-(2-clorofenil)-2-(4-clorofenil)-1,1-dicloroetileno
p,p'-DDE: 1,1-dicloro-2,2-bis(4-clorofenil)etileno
PCR: reacción en cadena de polimerasa (polymerase chain reaction)

PDA: agar papa dextrosa (potato dextrose agar)
PFPA: anhídrido pentafluoropropiónico (pentafluoropropionic anhydride)
PLSR: regresión por cuadrados parciales mínimos (partial least squares regression)
ppm: partes por millón
 Q^2 : bondad de predicción
r: coeficiente de correlación
 R^2 : bondad del modelo
RSD: desviación estándar relativa (relative standard deviation)
SD: desviación estándar (standard deviation)
SNA: spezieller nährstoffarmer agar
SPE: extracción en fase sólida (solid-phase extraction)
T-2: toxina T-2
TCTA: tricotecenos de tipo A (type A trichothecenes)
TCTB: tricotecenos de tipo B (type B trichothecenes)
TEF- 1 α : factor de elongación de la traducción (translation elongation factor)
TFAA: anhídrido trifluoroacético (trifluoroacetic anhydride)
 T_{inc} : temperatura de incubación
 t_{inc} : tiempo de incubación
TMCS: trimetilclorosilano (trimethylchlorosilane)
TMS: trimetilsilil (trimethylsilyl)
TMSI: N-trimetilsililimidazol (N-trimethylsilylimidazole)
ZEA: zearalenona



1. Introducción

1.1. Género *Fusarium*

El género *Fusarium*, perteneciente a los ascomicetos, fue descrito por primera vez por Link en 1809. Desde entonces, el número de especies de *Fusarium* ha variado de nueve a más de mil. Sin embargo, de acuerdo a los conceptos actuales el número de especies de *Fusarium* reconocidas es superior a setenta. Los miembros de este género son numerosos y se pueden encontrar como patógenos, endófitos y saprófitos en plantas y suelos de todo el mundo [1]. La amplia distribución de las especies de *Fusarium* se puede atribuir a la capacidad de estos hongos para crecer en una amplia gama de sustratos y a sus eficientes mecanismos de dispersión [2]. Los hongos pertenecientes al género *Fusarium* producen una serie de metabolitos secundarios, o micotoxinas, que son tóxicos para los humanos y animales. Estos hongos, causan una serie de enfermedades que afectan la agricultura y horticultura en todas partes del mundo. Varias de estas enfermedades, como por ejemplo la fusariosis de la espiga en trigo, han tenido impactos económicos y sociológicos casi devastadores en los agricultores y las comunidades que dependen de estos cultivos para su subsistencia. Este impacto económico, debido a la producción de enfermedades en plantas y la producción de micotoxinas, convierten al género *Fusarium* en un importante foco de investigación [1].

1.1.1. Caracterización morfológica

La clasificación morfológica en el género *Fusarium* se basa en las características macro y microscópicas del cultivo. El tipo de micelio aéreo, pigmentación y tasa de crecimiento de la colonia, así como la presencia o ausencia de esporodoquios, esclerocios o estroma en diferentes medios, se consideran características secundarias de identificación. En los medios de agar más comúnmente utilizados, las colonias presentan un crecimiento rápido que suele ocupar toda la placa (8 – 9 cm de diámetro en una semana). El color que desarrollan depende de la especie y puede ser blanquecino, crema, anaranjado, rosa, rojizo, púrpura, etc, estas coloraciones pueden variar según los diferentes medios de cultivo. El micelio aéreo suele ser abundante y de aspecto algodonoso [2].

Entre los medios de agar más utilizados para la identificación de especies de *Fusarium* se encuentran: agar hojas de clavel (CLA), spezieller nährstoffarmer agar (SNA), y agar papa dextrosa (PDA). El empleo de CLA favorece la producción de conidias por sobre el crecimiento de micelio. Al utilizar este medio de cultivo, las macroconidias se producen principalmente en los esporodoquios y tienen un tamaño y forma más uniforme, razón por la cual se consideran más adecuadas para realizar la identificación morfológica. El medio SNA es de gran utilidad para la evaluación de microconidias y clamidosporas, ya que estas últimas se forman más rápido en éste medio que en un medio de CLA. El medio de PDA se usa mayormente para evaluar la morfología, pigmentación y velocidad de crecimiento de la

colonia, ya que, debido a su alto contenido de carbohidratos, generalmente favorece el crecimiento en detrimento de la esporulación [2, 3].

Las especies del género *Fusarium* pueden producir tres tipos de esporas asexuales denominadas macroconidias, microconidias y clamidosporas. Algunas especies producen los tres tipos de esporas, mientras que otras especies no, por tanto estas estructuras son claves para la caracterización de las especies (son características primarias de identificación).

La macroconidia es la spora principal en la caracterización, ya que su forma y tamaño varía de acuerdo a cada especie miembro del género *Fusarium*. Estas esporas son curvadas, pluriseptadas con una célula apical bien diferenciada, que puede ser redondeada, puntiaguda, filamentosa o en forma de gancho y poseen una célula basal en forma de pie (figura 1.1). Las macroconidias son producidas en estructuras especializadas llamadas esporodoquios, pero también se pueden producir en el micelio aéreo, siendo las producidas en los esporodoquios las más útiles para la identificación, debido a que poseen tamaño y forma regulares y características para cada especie del género. En la identificación morfológica del género *Fusarium*, la presencia de macroconidias fusoides con una célula basal en forma de pie se acepta como carácter definitorio a nivel de género [2, 3].

Las microconidias pueden ser unicelulares o bicelulares, en el proceso de identificación a nivel de especie se considera la presencia o ausencia de estas microconidias, ya que no todas las especies del género *Fusarium* producen microconidias. Por ejemplo, *Fusarium sporotrichioides* presenta microconidias piriformes o elipsoidales, mientras que *Fusarium graminearum* carece de estas esporas. Si están presentes las microconidias, se considera el tamaño, la forma, el modo de formación, si están solas, en cadenas o en falsas cabezas. Estas esporas se forman en el micelio aéreo y dependiendo de la especie se pueden producir en fiálides con un solo poro llamadas monofiálides o en fiálides con más de un poro, llamadas polifiálides [3].

Las clamidosporas son una importante estructura de supervivencia, estas pueden estar solas, en pares, en grupos o en cadenas. Es una spora de pared gruesa, la pared externa puede ser rugosa o lisa. Estas esporas, se pueden encontrar en el micelio aéreo o incrustadas en el agar, debido a esto, la localización de las clamidosporas es importante en la identificación de la especie. Generalmente, se requiere un mayor tiempo para su producción (superior a seis semanas) y puede que no se produzcan en grandes cantidades. En algunos casos, se requiere el uso de un medio de cultivo más especializado, como el medio agar suelo, para la observación de estas esporas [3].

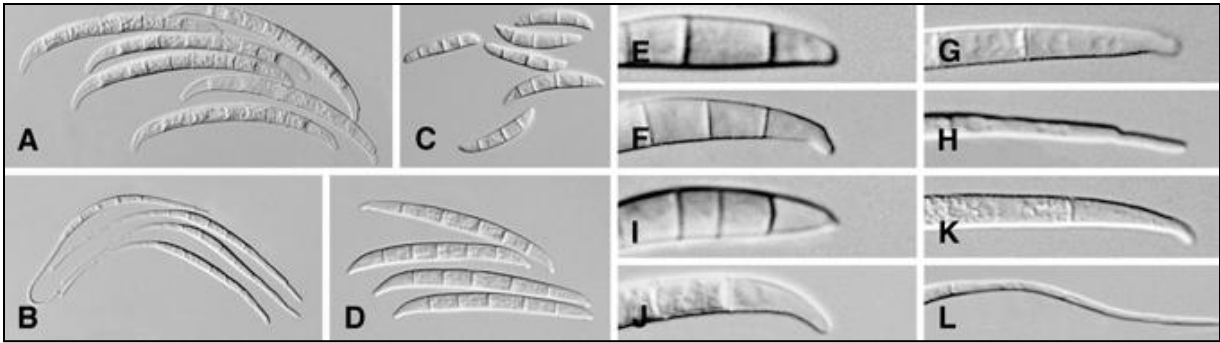


Figura 1.1: Macroconidia de especies de *Fusarium*. A-D) variación de la forma y longitud de las macroconidias. E-H) variación de la célula basal de la macroconidia. I-L) variación de la célula apical de la macroconidia (Modificado desde Summerell et al., 2003 [4]).

1.1.2. Caracterización molecular

Varias pruebas de diagnóstico molecular han sido desarrolladas para la identificación y detección de hongos del género *Fusarium*. La mayoría de estos métodos se basan en la técnica de reacción en cadena de polimerasa (PCR) con partidores específicos. Básicamente, se utiliza el ADN como código de barras para la identificación de un aislamiento de un hongo desconocido utilizando una corta secuencia de ADN que permite asignarlo a una especie específica o a un grupo de especies.

Las regiones de ADN utilizadas para la identificación se pueden dividir, a grandes rasgos, en regiones de ADN nuclear y mitocondrial. Las regiones espaciadoras de transcripción interna (ITS), factores de elongación de la traducción (TEF-1 α), calmodulina, gen de β -tubulina, gen de *cyp51A* que codifica una 14a-metilasa y la región espaciadora intergénica (IGS) se utilizan a menudo para desarrollar partidores específicos destinados a la detección de especies de *Fusarium*. Por otra parte, el ADN mitocondrial (mtADN) se ha utilizado como marcador molecular para identificar la variación genética de las especies de *Fusarium*, debido a su longitud relativamente corta. Además, sus regiones conservadas y variables pueden facilitar la identificación de especies estrechamente relacionadas [5].

Basándose en la divergencia de la secuencia ITS, Mishra et al. diseñaron partidores específicos para la identificación de *Fusarium avenaceum*, *F. culmorum*, *F. equiseti*, *F. oxysporum* y *F. sambucinum* [6]. De igual forma, los partidores específicos Pgx1-F/Pgx1-R y Pgx2-F/Pgx2-R permiten identificar las especies *F. verticillioides* y *F. proliferatum* [7].

El análisis de polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción (RFLP) es una técnica que utiliza enzimas de restricción para digerir las secuencias de ADN amplificadas mediante PCR. Estas enzimas reconocen una determinada secuencia de ADN y cortan la molécula en los puntos donde se encuentra dicha secuencia. Esta técnica también se puede utilizar para identificar especies del género *Fusarium*. Por ejemplo, Llorens et al. lograron diferenciar seis

especies de *Fusarium*, además de observar variaciones intraespecífica entre aislamientos de *F. oxysporum* [8].

El estudio de las regiones IGS ha permitido obtener partidores específicos para la identificación de las especies *F. verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. graminearum*, especies del complejo *G. fujikuroi*, *F. culmorum*, *F. equiseti*, *F. sporotrichioides* y *F. poae* [9, 10].

Utilizando el gen *cyp51A* que codifica una 14a-metilasa Yin et al. diseñaron un método basado en PCR que permite la identificación de *F. asiaticum* y *F. graminearum* [11]. El factor de elongación de la traducción (TEF-1 α) es ampliamente utilizado y es ideal para la separación entre especies estrechamente relacionadas [12-14]. Aoki y O'Donnell prefirieron el uso de TEF-1 α por sobre β -tubulina para diseñar un partidore específico para *F. pseudograminearum*, debido a la mayor variabilidad de TEF-1 α [15]. El empleo de TEF-1 α también ha permitido identificar cepas de *F. proliferatum* y *F. verticillioides* que no amplificaron utilizando partidores específicos para esas especies, diseñados en base a secuencias parciales de calmodulina. Demostrando que los partidores especie-específicos utilizados, no son específicos para todas las cepas de *F. proliferatum* y *F. verticillioides* [16].

1.2. Fusariosis de la espiga

1.2.1. Etiología de la enfermedad

La fusariosis de la espiga (*Fusarium head blight* [FHB] para su sigla en inglés) se ha convertido en una de las enfermedades más importantes en la producción de trigo y otros cereales a nivel mundial. Esta enfermedad, puede ser causada por varias especies de hongos pertenecientes básicamente a dos géneros: *Microdochium* y *Fusarium*. Dentro del género *Microdochium*, sólo *Microdochium nivale*, con dos sub-especies *M. nivale nivale* y *M. nivale majus*, es capaz de causar fusariosis de la espiga. Mientras que en el género *Fusarium*, la enfermedad se encuentra asociada a varias especies, entre las cuales destacan *Fusarium graminearum* (teleomorfo: *Gibberella zeae*), *Fusarium culmorum*, *Fusarium poae*, *Fusarium avenaceum* y *Fusarium sporotrichioides*, siendo, frecuentemente, *F. graminearum* la especie predominante un muchas de las regiones afectadas [17-19].

1.2.2. Síntomas, signos y consecuencias de FHB

En los cultivos de trigo, los primeros síntomas de fusariosis de la espiga se producen poco después de la floración. La enfermedad se evidencia por el blanqueamiento prematuro de las espigas, la decoloración puede ocurrir en una o más espiguillas o en la espiga completa [20]. Los primeros síntomas de la enfermedad generalmente son visibles en la mitad de la espiga, región donde comienza la floración, pero, como se mencionó anteriormente, estos pueden ocurrir en cualquier parte de la espiga [21]. Estas espigas decoloradas son fácilmente visibles

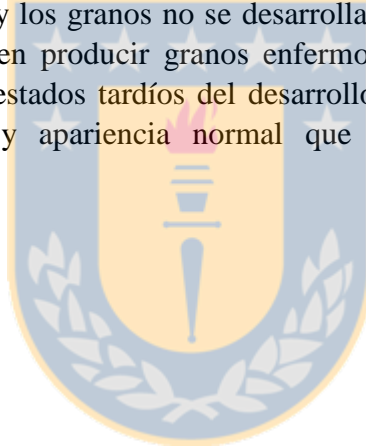
entre las espigas no infectadas que presentan una coloración verde propia del trigo en desarrollo. El tallo (pedúnculo) que se encuentra inmediatamente debajo de la espiga también puede ser afectado, cuando esto ocurre, el pedúnculo adquiere un color café. Si se presentan condiciones ambientales de humedad prolongada se puede observar la presencia de esporodocios de color rosado/naranja en las espiguillas y glumas infectadas [22]. Los granos de trigo afectados son pequeños, livianos, arrugados y a veces pueden estar cubiertos con un micelio de color rosa o blanquecino. En algunas ocasiones, se pueden observar anillos o manchas ovaladas de color marrón y centro claro en la parte posterior del grano y en la superficie externa de la gluma [17].

La fusariosis de la espiga, provoca pérdidas económicas directas debido a la reducción del rendimiento y calidad del grano (granos abortados o arrugados, decolorados y livianos en la prueba de peso). La calidad nutritiva y tecnológica de los granos también puede estar disminuida, por ejemplo, la molienda, horneado, propiedades para elaboración de pastas y el valor nutritivo pueden estar alterados debido a que el hongo destruye los gránulos de almidón, pared celular y proteínas del endospermo. Esta enfermedad, también puede provocar pérdidas indirectas debido a la contaminación de los granos con micotoxinas lo que genera un rechazo o reducción de categoría en su comercialización. Por ejemplo, granos destinados al consumo humano pueden ser reducidos a grano para alimentación animal o incluso pueden ser inadecuados para ambos propósitos si las toxinas producidas por los hongos se acumulan alcanzando niveles inaceptables para el consumo humano y animal [19, 23, 24]. Las micotoxinas presentes en los cultivos afectados por esta enfermedad, son producidas por hongos del género *Fusarium* ya que, se cree que las especies de *Microdochium nivale* no son productoras de micotoxinas. Las toxinas producidas por *Fusarium*, no se pueden eliminar después de la cosecha mediante los procedimientos clásicos de transformación ya que, en general, estas toxinas son química y térmicamente estables. Por tanto, se pueden encontrar en la materia prima (granos) y en los productos transformados (harina, pan) e incluso en productos provenientes de animales alimentados con granos contaminados (carne, leche, huevos) [17].

1.2.3. Ciclo de vida

Como se señaló anteriormente, *Fusarium graminearum* es el principal agente causal de fusariosis de la espiga en trigo. En la figura 1.2 se esquematiza el proceso mediante el cual este hongo coloniza las espigas de trigo para producir la enfermedad. *Fusarium graminearum* es un hongo que tiene la capacidad de desarrollarse saprofiticamente sobre los residuos de plantas infectadas que permanecen en el suelo después de la cosecha. Sobre estos residuos, el hongo produce macroconidias (esporas asexuales) que son diseminadas a corta distancia principalmente por aspersión en episodios de lluvia. Cuando se presentan condiciones ambientales cálidas y de alta humedad, el hongo puede desarrollar su estado sexuado (*Gibberella zeae*), formando peritecios que contienen ascosporas (esporas sexuales) en su

interior. Estas ascosporas son expulsadas desde los peritecios y se diseminan, principalmente, por el viento. Ambos tipos de esporas, macroconidias y ascosporas, se pueden depositar sobre las espigas de trigo e iniciar el proceso de infección, el periodo de mayor susceptibilidad de las espigas de trigo a la infección es durante la antesis (floración). Una vez que las esporas se depositan sobre las espiguillas, comienzan a germinar. Para esto, el hongo requiere condiciones de humedad (película de agua sobre el tejido vegetal) y temperatura (20 – 30 °C) favorables para el crecimiento de las hifas. Dadas estas condiciones, la hifa puede penetrar los tejidos de la gluma a través de aberturas naturales como los estomas o entrar en las flores a través de los estigmas y eventualmente invadir el ovario. Luego de esta etapa de infección inicial, el hongo se puede diseminar a las espiguillas superiores o inferiores de una misma espiga, a través del raquis y bajo condiciones favorables puede causar daños severos en un corto periodo de tiempo [22, 25, 26]. Se ha observado que los tricotecenos desempeñan un rol importante para promover la diseminación del hongo a través del nudo del raquis en el trigo, permitiendo el paso de las hifas desde las espiguillas hacia el raquis [27]. Si la infección ocurre en etapas tempranas del desarrollo del grano, inicios de la floración, el hongo puede colonizar y destruir las flores y los granos no se desarrollan. Si las espiguillas son infectadas en etapas posteriores se pueden producir granos enfermos, arrugados y de menor tamaño. Mientras que la infección en estados tardíos del desarrollo del grano, estado pastoso, puede originar granos de tamaño y apariencia normal que pueden estar contaminados con micotoxinas [28].



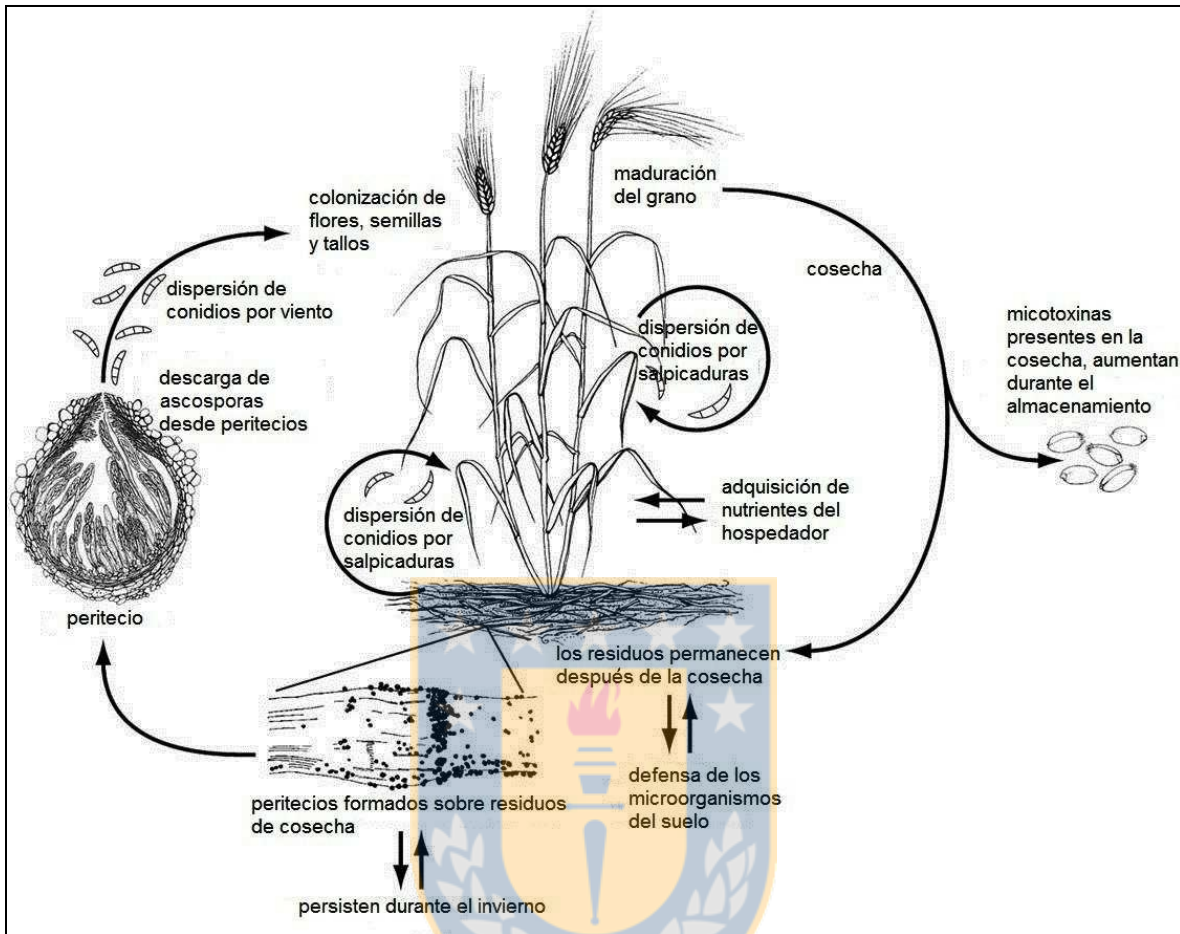


Figura 1.2: Ciclo infeccioso de *Fusarium graminearum* (*Gibberella zeae*) en trigo (Modificado desde Trail, 2009 [29]).

1.3. Micotoxinas producidas por *Fusarium* spp.

Los hongos producen un amplio número de metabolitos que no son esenciales para la vida, pero que pueden proporcionar al hongo una ventaja ecológica en ciertos ambientes. Estos metabolitos se denominan metabolitos secundarios y dentro de este grupo se encuentran las micotoxinas. Estas micotoxinas pueden acumularse en las plantas de cultivos infectados y, después de la ingestión, pueden conducir al desarrollo de enfermedades (micotoxicosis) en humanos y animales [30]. Las micotoxinas pueden encontrarse en la cadena alimenticia por contaminación directa o indirecta. Directamente a través de alimentos de origen vegetal, como por ejemplo los granos de cereales contaminados, o indirectamente a través de alimentos de origen animal como la carne, leche y huevos, provenientes de animales alimentados con granos contaminados [31-33].

Dentro del grupo de micotoxinas producidas por el género *Fusarium*, destacan como contaminantes de cereales y productos a base de cereales los tricotecenos (principalmente en trigo, maíz, cebada, avena y centeno), zearalenona (maíz, trigo) y fumonisinas (maíz). Sin embargo, estos hongos también producen otro tipo de micotoxinas que se encuentran en el grupo de las denominadas micotoxinas emergentes, tales como, fusaproliferina, beauveracina, aniantinas y moniliformina, las cuales han sido más recientemente descubiertas y menos estudiadas. Las micotoxinas producidas por *Fusarium* spp. se pueden dividir, principalmente, en tricotecenos y no tricotecenos (tabla 1.1), siendo los tricotecenos los de mayor interés [34, 35].

Tabla 1.1: Micotoxinas producidas por especies de *Fusarium* asociadas a FHB.

<i>Fusarium</i> spp	Micotoxinas
<i>F. graminearum</i>	Deoxinivalenol ^a (DON), nivalenol ^a (NIV), zearalenona ^b (ZEA)
<i>F. culmorum</i>	DON ^a , NIV ^a , ZEA ^b
<i>F. avenaceum</i>	Moniliformina ^b (MON), eniantinas ^b (ENN)
<i>F. tricinctum</i>	MON ^b
<i>F. poae</i>	NIV ^a , ENN ^b , Diacetoxiscirpenol ^a (DAS)
<i>F. langsethiae</i>	Toxina HT-2 ^a , toxina T-2 ^a , ENN ^b , DAS ^a
<i>F. sporotrichioides</i>	Toxina HT-2 ^a , toxina T-2 ^a , ENN ^b , DAS ^a

^a: Tricoteceno

^b: No tricoteceno

1.3.1. Tricotecenos

Los tricotecenos son sesquiterpenos tricíclicos no volátiles que contienen un doble enlace entre los carbonos 9 y 10 y un anillo 12,13-epóxido, razón por la cual su estructura base se denomina 12,13-epoxitricotec-9-eno. De acuerdo a su estructura química, los tricotecenos se dividen en cuatro tipos (A – D). Tipo A incluye compuestos que tienen como sustituyente en el carbono 8 un grupo hidroxilo, hidrógeno o un éster, a este grupo pertenecen la toxina T-2, toxina HT-2, neosolaniol y diacetoxiscirpenol. Los tricotecenos de tipo B contienen un grupo carbonilo en el carbono 8, a este grupo pertenecen las micotoxinas deoxinivalenol, 3-acetildeoxinivalenol, 15-acetildeoxinivalenol, nivalenol y fusarenon-X. Los tricotecenos de tipo C, como por ejemplo crotocin, contienen un segundo anillo epóxido entre los carbonos 7 y 8 ó 9 y 10. Los tricotecenos de tipo D son un grupo diverso que presentan un anillo macrocíclico entre el carbono 4 y el carbono 15, a este grupo pertenecen roridin A, verrucarín A, satratoxina H. Los tricotecenos de tipo C y D no son producidos por hongos pertenecientes al género *Fusarium* y por tanto, no se encuentran asociados con FHB. En la figura 1.3 se presenta la estructura de los tricotecenos de tipo A y B los cuales se encuentran estrechamente relacionados con la FHB al ser producidos por hongos del género *Fusarium* [30, 36-38].

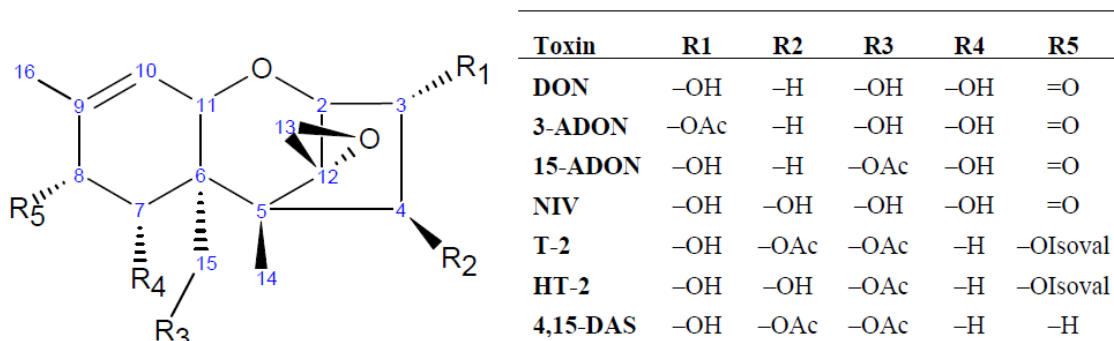


Figura 1.3: Estructura de tricotecenos de tipo A y B. Ejemplo de tricotecenos de tipo A T-2, HT-2, 4,15-DAS. Ejemplo de tricotecenos de tipo B DON, 3-ADON, 15-ADON NIV. OAc = grupo acetilo; OIsoval = grupo isovalerato (Modificado desde Foroud, 2009 [37]).

Los tricotecenos son compuestos incoloros, mayormente cristalinos. Debido a los grupos sustituyentes presentes en la molécula, los tricotecenos de tipo A son solubles en solventes medianamente polares tales como cloroformo, éter dietílico, acetato de etilo y acetona, mientras que los tricotecenos de tipo B requieren solventes de mayor polaridad para ser solubilizados, razón por la cual se utilizan comúnmente mezclas de solventes como metanol:agua o acetonitrilo:agua [39]. Los tricotecenos son estables al calentamiento y no se degradan durante el procesamiento normal de alimentos o tratamiento en autoclave. Además, son estables a pH neutro y ácido, por consiguiente, no se hidrolizan en el estómago después de su ingesta [33].

La toxicidad de los tricotecenos se atribuye a su capacidad para inhibir la síntesis de proteínas al inhibir la actividad de la enzima peptidil transferasa ubicada en la subunidad ribosomal 60S [37]. El grupo 12,13-epóxido es esencial para inhibir la síntesis proteica, mientras que la reducción del doble enlace entre los carbonos 9 y 10 reduce su toxicidad [40].

La ingesta de DON se ha asociado con alteraciones del sistema intestinal, inmune, endocrino y nervioso, lo que conduce, en casos de exposición aguda, a enfermedades que se caracterizan por vómitos, anorexia, dolor abdominal, diarrea, dolor de cabeza y mareos [34]. La administración crónica de DON en animales, provoca pérdida de peso, anorexia y deficiencia nutricional. Se ha observado que, en cerdos, la presencia de DON a una concentración de 1 – 2 ppm causa un rechazo parcial de la alimentación, mientras que la presencia de 12 ppm genera un rechazo total del alimento. La administración de DON también puede aumentar el tamaño del hígado, disminuir los niveles de albúmina, disminuir el hematocrito y provocar disminución de los niveles séricos de calcio y fósforo. Otros síntomas son la disminución del tamaño de la tiroides, aumento de los niveles de tiroxina y trastornos inmune, tales como inmunosupresión o inmunoestimulación (dependiendo de la dosis y frecuencia de exposición). El DON también tiene un efecto neurotóxico en cerdos, provocando un síndrome de anorexia

por la alteración de la concentración de neurotransmisores en el hipotálamo, cerebelo y la corteza frontal [32].

El NIV generalmente coexiste con el DON en la naturaleza. Esta micotoxina provoca rechazo de alimento, disminución en la ganancia de peso, aumento de los niveles séricos de IgA, también puede alterar parámetros bioquímicos séricos y la metabolización hepática de drogas [34]. El NIV provoca necrosis de las células proliferativas, debido a esto, es especialmente tóxico para los tejidos que tienen una activa división celular tales como órganos linfoides y mucosa intestinal [33].

La toxina T-2 es uno de los tricotecenos que presenta mayor toxicidad aguda. El principal efecto de esta toxina es la inhibición de la síntesis de proteínas y, a altas concentraciones, es inhibidor de la síntesis de ADN y ARN. La toxina T-2 provoca una amplia gama de efectos tóxicos en los animales, tales como pérdida de peso, emesis, diarrea, letargo, inhibición de la inmunidad, necrosis, daño de los tejidos cartilagosos, disminución de células sanguíneas y recuento de leucocitos, hemorragia, disminución de la glucosa plasmática y cambios patológicos en el hígado y estómago [34]. Además de presentar un efecto extremadamente tóxico sobre la piel y las membranas mucosas. Se ha observado que, en cerdos, la toxina T-2 provoca disminución de en la ingesta de alimentos y en la ganancia de peso, además de la aparición de lesiones orales. En vacas lecheras provoca un rechazo de alimento, baja producción de leche, gastroenteritis, sangrado intestinal y, en algunos casos, muerte. En ambos tipos de animales, esta toxina puede provocar inmunosupresión [32]. El sistema inmune es el principal blanco de T-2, ya que la exposición a esta toxina se asocia con leucopenia y depleción de células en los órganos linfoides, inhibición de la eritropoyesis en la médula ósea y el bazo. Además, la toxina T-2 reduce la respuesta proliferativa de linfocitos y altera el proceso de maduración de las células dendríticas, lo que sugiere su potencia inmunosupresora [32-34]. La toxicidad de HT-2 ha sido menos investigada, probablemente, debido a que in vivo T-2 es rápidamente metabolizada a HT-2, por lo que se asume que los datos de toxicidad in vivo de T-2 incluyen a la toxina HT-2 [32].

El deoxinivalenol es menos tóxico que la toxina T-2, sin embargo el DON es producido por hongos que tienen una mayor distribución geográfica en comparación con los productores de T-2. Por tanto, debido a su amplia distribución y a su potencial para generar pérdidas económicas, el DON es más regulado que la toxina T-2, a pesar de que las intoxicaciones en humanos o animales con DON tienen una menor probabilidad de ocasionar la muerte que las provocadas por T-2 [1]. La legislación chilena, en el Reglamento Sanitario de los Alimentos, establece un límite máximo para el DON de $750 \mu\text{g kg}^{-1}$ en cereales y sus derivados [41]. En la tabla 1.2 se presentan los límites máximos de DON establecidos por la Comunidad Europea [42].

Tabla 1.2: Valores límites de DON establecidos por la Comisión de las Comunidades Europeas (Reglamento (CE) N° 1881/2006).

Productos alimenticios	Contenidos máximos ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Cereales no elaborados que no sean trigo duro, avena y maíz.	1250
Trigo duro y avena no elaborados.	1750
Maíz no elaborado.	1750
Cereales destinados al consumo humano directo, harina de cereales, salvado y germen como producto final comercializado para el consumo humano directo.	750
Pasta (seca).	750
Pan (incluidos pequeños productos de panadería), pasteles, galletas, aperitivos de cereales y cereales para desayuno.	500
Alimentos elaborados a base de cereales y alimentos infantiles para lactantes y niños de corta edad.	200

1.3.2. Biosíntesis de tricotecenos

Las enzimas involucradas en la biosíntesis de tricotecenos y las proteínas reguladoras de este proceso, son codificadas por 15 genes, genes *Tri*, que residen en tres locus diferentes: un grupo de 12 genes denominado “grupo *Tri*”, un grupo de dos genes *Tri1 – Tri16* localizado en otro locus y un gen *Tri101* ubicado en un locus diferente [43]. La variación en el quimiotipo de tricoteceno producido, está determinada por la variación de la expresión y funcionalidad de estos genes *Tri*.

Todos los tricotecenos son derivados del farnesil pirofosfato el cual es sometido a procesos de ciclación, isomerización, oxidación y acetilación controlados por enzimas codificadas por los genes *Tri* [44]. El primer paso de la biosíntesis de tricotecenos es la ciclación del farnesil pirofosfato para obtener una estructura denominada tricodieno, esta reacción es catalizada por la enzima tricodieno sintasa la cual es codificada por el gen *Tri5*. Luego *Tri4*, que codifica un citocromo P450 monooxigenasa multifuncional, cataliza los cuatro pasos siguientes: hidroxilación en C-2, seguido de epoxidación en 12,13, seguido de hidroxilación en C-11 e hidroxilación en C-3 [45]. El producto final denominado isotricotriol, es sometido a dos pasos

de isomerización no enzimática, incluyendo una ciclación que produce un enlace C-O entre el oxígeno de C-2 y el C-11, obteniéndose la molécula denominada isotricodermol. Esta molécula es acetilada en C-3 por acción de una enzima 3-O-acetiltransferasa codificada por *Tri101*, e hidroxilada en C-15 por acción de una enzima C-15 hidroxilasa codificada por *Tri11*. Posteriormente, la molécula es acetilada en C-15 por acción de una enzima 15-O-acetiltransferasa codificada por *Tri3*, generando una molécula denominada calonectrin. Todos estos pasos son comunes en la síntesis de tricotecenos de tipo A y tricotecenos de tipo B (figura 1.4) [37, 46].

Desde este paso en adelante, se producen diferencias producto de la actividad de los genes *Tri13*, *Tri7*, *Tri1* y *Tri8*, principalmente. La producción de tricotecenos de tipo A o de tricotecenos de tipo B está determinada por variaciones en la actividad de las enzimas citocromo P450 codificadas por *Tri1*. En *Fusarium sporotrichioides*, las enzimas codificadas por *Tri1* catalizan la hidroxilación de C-8 para producir tricotecenos de tipo A (como la toxina T-2), los cuales carecen de un hidroxilo en C-7. Sin embargo, en *Fusarium graminearum* las enzimas codificadas por *Tri1* catalizan la hidroxilación de C-7 y C-8, generando 7-hidroxi, 8-ceto-tricotecenos como DON y NIV (tricotecenos de tipo B) [47].

En *Fusarium graminearum*, el gen *Tri13* es fundamental para determinar la producción de NIV o DON. Este gen codifica una enzima C-4 hidroxilasa, responsable de la oxigenación en C-4 durante la producción de NIV. Mientras que en un *Fusarium graminearum* productor de DON este gen presenta varias mutaciones que provocan su inactividad, por tanto, en DON (y sus acetilados) el C-4 no se encuentra hidroxilado. El gen *Tri7* también se encuentra inactivo en *F. graminearum* productor de DON, pero se encuentra activo en *F. graminearum* productor de NIV, donde codifica una enzima encargada de la acetilación del grupo hidroxilo en el C-4 de NIV para generar el derivado acetilado 4-ANIV (Fusarenon-X). Es importante destacar que los genes *Tri13* y *Tri7* también son funcionales en *Fusarium sporotrichioides* y desempeñan las funciones descritas anteriormente durante la producción de la toxina T-2 [48-50].

Finalmente, se ha observado que la actividad de *Tri8* es fundamental para determinar la producción de 3-ADON o 15-ADON. En los *F. graminearum* productores de 3-ADON, el gen *Tri8* codifica una enzima que cataliza la deacetilación del carbono 15 del intermediario 3,15-diacetildeoxinivalenol, generando como producto 3-ADON. Mientras que en un *F. graminearum* productor de 15-ADON el gen *Tri8* codifica una enzima que cataliza la deacetilación del carbono 3 de 3,15-diacetildeoxinivalenol, generando 15-ADON [44].

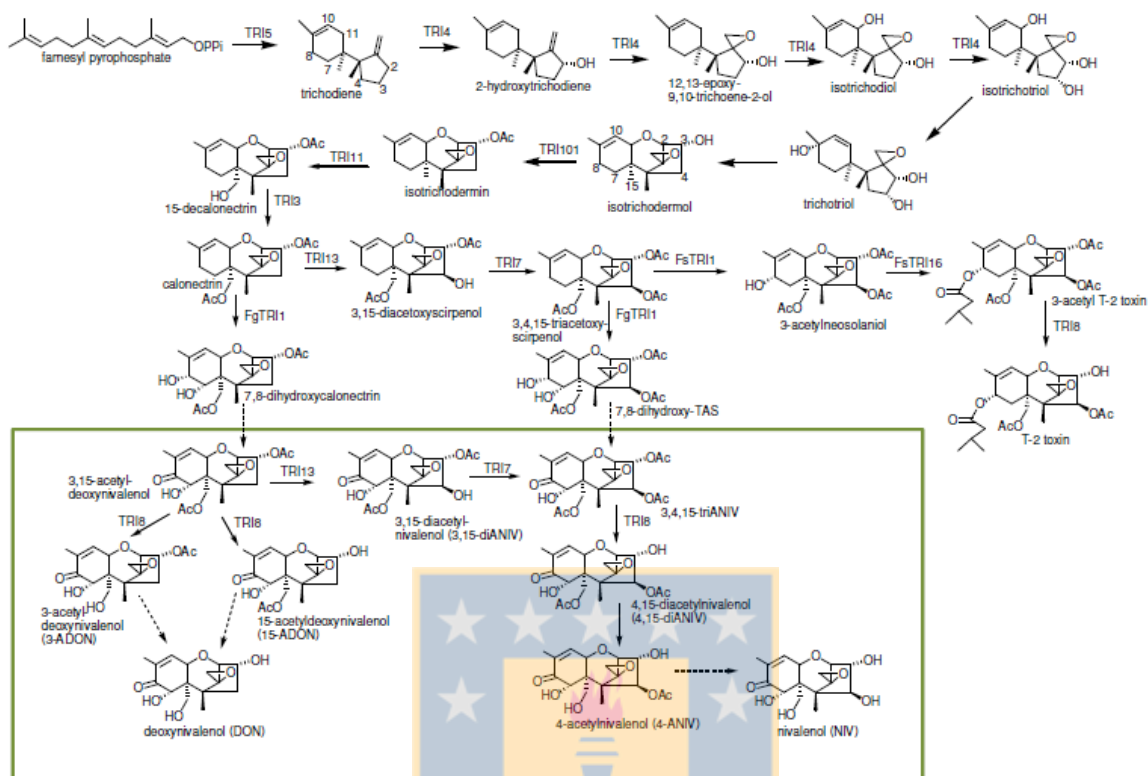


Figura 1.4: Ruta biosintética propuesta para los tricotecenos producidos por *Fusarium*. Los genes codificadores de enzimas se indican al lado de cada línea que señala una etapa de la síntesis. Las líneas segmentadas indican las etapas en las cuales aún no se ha asignado un gen. El recuadro verde identifica los tricotecenos de tipo B (McCormick, 2011 [30]).

1.3.3. Quimiotipos de *Fusarium graminearum*

Basándose en el tipo de micotoxina producida por *Fusarium graminearum*, se pueden distinguir tres quimiotipos: (1) quimiotipo 3-ADON cuando se produce principalmente DON + 3-ADON (también denominado quimiotipo *Ia*); (2) quimiotipo 15-ADON cuando se produce principalmente DON + 15-ADON (también denominado quimiotipo *Ib*); y (3) quimiotipo NIV cuando se produce principalmente NIV + 4-ANIV (también denominado quimiotipo *II*) [51]. Estos quimiotipos se determinan mediante análisis químicos, pero también se pueden determinar mediante análisis de secuencias de ADN, en tal caso se deben denominar genotipos [52]. El potencial toxigénico de *F. graminearum* varía a nivel mundial. En Francia, Alemania, Italia, Luxemburgo y Turquía se ha encontrado con mayor frecuencia el quimiotipo 15-ADON. Estudios realizados en diferentes regiones de Rusia y países adyacentes han mostrado un predominio de aislados de *F. graminearum* productores de 3-ADON en el norte de Europa. También se ha encontrado prevalencia del quimiotipo 3-ADON en

Escandinavia, Finlandia y el noroeste de Rusia, mientras que el quimiotipo 15-ADON es más común en el sur de Europa y China [53]. En América del Norte se ha encontrado un predominio del quimiotipo 15-ADON, sin embargo en estos últimos años, se ha observado un aumento en la incidencia del quimiotipo 3-ADON [54, 55]. En América de Sur, países como Brasil, Uruguay y Argentina señalan un predominio del quimiotipo 15-ADON en trigo [56-58].

1.4. Métodos de análisis de tricotecenos

Los procedimientos de muestreo tienen un efecto significativo en la exactitud de los datos analíticos generados, ya que no todas las micotoxinas se distribuyen de manera uniforme en un lote. Previo al análisis de las muestras, éstas se deben moler y homogeneizar completamente, para tener una muestra representativa. Posteriormente, se toma una sub-muestra para realizar el análisis. En general, un tamaño de muestra pequeño, aumentará la variación de los resultados. Debido a esto, para disminuir las posibilidades de tomar decisiones incorrectas ante un control reglamentario; se debe aumentar el tamaño de la muestra y sub-muestra, asegurar una distribución uniforme del tamaño de partícula y analizar una cantidad suficiente de alícuotas [59].

La mayoría de las técnicas analíticas utilizadas en la determinación de tricotecenos requiere de un proceso de extracción de los analitos desde la matriz, seguido de una fase de limpieza del extracto y finalmente, la etapa de detección y cuantificación de las micotoxinas.

En el análisis de cereales y alimento para animales el tamaño de muestra se encuentra, generalmente, en el rango de 20 a 50 gramos. Dependiendo de la polaridad de los tricotecenos analizados y del proceso de limpieza utilizado, se han empleado diversas combinaciones de solventes para la extracción de estas micotoxinas desde granos, alimentos y otras muestras sólidas. Habitualmente, se utilizan 5 mL de solvente por gramo de muestra. La mayoría de los tricotecenos de tipo A y tipo B se extraen con mezclas de metanol/agua o acetonitrilo/agua, en distintas proporciones. Sin embargo, se ha observado una clara tendencia hacia el uso de mezclas de acetonitrilo/agua porque proporcionan extractos más limpios. La incorporación de agua en el solvente de extracción, promueve el hinchamiento de los granos, ayudando a la liberación de las micotoxinas. Debido a la alta polaridad del DON muchos métodos inmunoquímicos reportan el uso de agua desionizada para su extracción. El tiempo de extracción varía dependiendo de la técnica utilizada para mezclar la muestra con el solvente de extracción [59, 60].

Luego del proceso de extracción, la solución obtenida se debe someter a un proceso de limpieza para remover las sustancias que pueden interferir con la detección del analito. Este proceso de limpieza, generalmente es necesario para los métodos analíticos de confirmación, mientras que los métodos de *screening* (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzima (ELISAs), dispositivos de flujo lateral (LFDs) y biosensores) pueden carecer de dicho

procedimiento [59]. Las columnas de extracción en fase sólida (SPE) corresponden a uno de los métodos más utilizados para la limpieza de extractos. Estas columnas están rellenas con adsorbentes que retienen las impurezas del extracto o retienen las micotoxinas, en este último caso se necesita un paso posterior para la elusión de las micotoxinas desde la columna. Entre las SPE empleadas, destaca el uso de las columnas MycoSep que son ampliamente utilizadas para el análisis de tricotecenos de tipo A y tipo B [61-64]. Los extractos también se pueden limpiar utilizando columnas de inmunoafinidad las cuales están rellenas de un gel que soporta anticuerpos específicos para las micotoxinas. Esta metodología proporciona extractos muy limpios debido a la gran especificidad de la unión anticuerpo-analito. Existen columnas de inmunoafinidad para DON [65-67], para las toxinas T-2 y HT-2 [68-70] y para el análisis simultáneo de DON, ZEA, T-2 y HT-2 [71, 72] y de DON + NIV [73]. En estos últimos años, con el uso de metodologías que adicionan sales durante el proceso extractivo (QuEChERS (quick, easy, cheap, effective, rugged and safe)) ha aumentado el uso de la extracción en fase sólida por dispersión (dSPE). Esta metodología utiliza los adsorbentes a granel, los cuales se adicionan directamente al extracto [74, 75].

Para la detección y cuantificación de las micotoxinas se debe emplear una técnica analítica adecuada. Clásicamente, se han utilizado técnicas cromatográficas como cromatografía en capa fina de alta eficiencia (HPTLC) [76, 77], cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) y cromatografía de gas (GC). Dependiendo del tipo de tricoteceno analizado, se deben acoplar distintos detectores al sistema cromatográfico. Se describen métodos utilizando HPLC con detector ultravioleta para el análisis de tricotecenos de tipo B (TCTB) [78, 79]. Para el análisis de tricotecenos de tipo A (TCTA) se puede utilizar HPLC con detector de fluorescencia, previa derivatización de las toxinas para inducir fluorescencia, ya que los tricotecenos no poseen fluorescencia nativa [70, 80]. El empleo de un detector de masas acoplado al sistema de HPLC, permite el análisis simultáneo de TCTA y TCTB [81, 82]. El análisis de tricotecenos mediante cromatografía de gas requiere una etapa adicional de derivatización de las micotoxinas para transformarlas en compuestos volátiles. Con esta finalidad, se pueden utilizar reactivos de sililación (TMS) y de acilación (TFAA, HFBA, PFPA). La elección del reactivo derivatizante depende del tipo de tricoteceno que se desea determinar y del detector empleado [83]. Se describen métodos utilizando cromatografía de gas con detector de ionización de llama (FID) [84, 85], detector de captura de electrones (ECD) [86-88], detector de masas [89-91]. Alternativamente, se han buscado métodos que permitan un análisis más rápido y menos complejo, surgiendo así los denominados métodos rápidos o de screening basados en inmunoensayos (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzima (ELISAs), dispositivos de flujo lateral (LFDs), inmunoensayo por polarización fluorescente (FPIA), biosensores) y espectroscopía en el infrarrojo cercano (NIR) [59, 60, 92].

2. Hipótesis de trabajo

Las especies de *Fusarium* aisladas desde trigo candeal (*Triticum turgidum*), afectado con fusariosis de la espiga durante el ciclo agrícola 2012/13 en la provincia de Ñuble, son productoras de micotoxinas.

3. Objetivos

3.1. Objetivo general

Evaluar la capacidad micotoxigénica de las especies de *Fusarium* aisladas desde trigo candeal, variedad Llareta INIA, afectado con fusariosis de la espiga durante el ciclo agrícola 2012/13 en la provincia de Ñuble.

3.2. Objetivos específicos

- Aislar y purificar especies de *Fusarium* provenientes de trigo candeal, variedad Llareta INIA, afectado con fusariosis de la espiga.
- Caracterizar morfológica y molecularmente las especies de *Fusarium* aisladas.
- Implementar una metodología analítica para la detección y cuantificación de las micotoxinas producidas.
- Determinar la capacidad micotoxigénica, *in vitro*, de las especies aisladas.

4. Materiales

4.1. Equipos y materiales

- Cromatógrafo de gas 6890N Agilent Technologies (California, USA) equipado con inyector automático de líquidos 7683B Series y detector de captura de electrones de micro-celda (μ -ECD).
- Estufa WTB Binder (Tuttlingen, Alemania).
- pH metro Thermo Orion Modelo 920 (Cummings, MA, USA) acoplado a electrodo de vidrio combinado.
- Vortex de contacto V1 Plus Boeco (Hamburg, Alemania).
- Agitador horizontal Buhler KL2 (Hechingen, Alemania).
- Sistema purificador de agua Simplicity de Millipore (Bedford, USA).
- Balanza analítica Denver Instrument Company AA-200 (Göttingen, Alemania).
- Molinillo Krups GVX2.
- Micropipetas Brand Transferpette 10 – 100 μ L, 100 – 1000 μ L, 1 – 10 mL (Wertheim, Alemania).
- Evaporador Reacti-VapTM modelo 18780 Pierce (Illinois, USA).
- Cámara de flujo laminar modelo 1846 Forma Scientific, Inc. (Ohio, USA).
- Autoclave 50 litros Amilab (La Florida, Santiago).
- Microscopio Zeiss Axioskop (Oberkochen, Alemania).
- Cámara de vacío VisiprepTM Supelco (Bellefonte, PA, USA).
- Columna Quadrex 5 % fenil – 95 % metilpolisiloxano 30 m x 0.25 mm I.D. x 0.25 μ m de espesor de film (Woodbridge, CT, USA).
- Cartuchos de extracción en fase sólida Bond Elut Mycotoxin Agilent Technologies (California, USA).
- Papel filtro Whatman N° 4 (New Jersey, USA).
- Material de vidrio.

4.2. Reactivos

Deoxinivalenol, 3-acetildeoxinivalenol, 15-acetildeoxinivalenol, nivalenol, 2-(2-clorofenil)-2-(4-clorofenil)-1,1-dicloroetileno, 1,1-dicloro-2,2-bis(4-clorofenil)etileno, BSA (N,O-bis(trimetilsilil)acetamida) + TMCS (trimetilclorosilano) + TMSI (N-trimetilsililimidazol) 3:2:3 (Sylon BTZ) Kit, se obtuvieron desde Sigma-Aldrich (St. Louis MO, USA). Dihidrógenofosfato de sodio monohidrato ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$) y di-sodio hidrógenofosfato dodecahidrato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$) grado analítico; acetonitrilo grado HPLC y hexano grado GC, se obtuvieron desde Merck (Darmstadt, Alemania). Agar papa dextrosa (EP/USP/JP/BP) se obtuvo desde Oxoid (Hampshire, UK). Agua ultrapura (18,2 M Ω cm) fue producida por el sistema Simplicity.

4.3. Medio de cultivo

Se utilizó agar papa dextrosa como medio de cultivo. Para su preparación se disolvieron 39 gramos de agar papa dextrosa en un litro de agua destilada estéril. Se agitó y calentó hasta disolver completamente el polvo. Luego, se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. El medio de cultivo fue adicionado con 0.05 g L⁻¹ de cloranfenicol para evitar el desarrollo de bacterias.

4.4. Soluciones

4.4.1. Solución tampón

La solución tampón fosfato 60 mM pH 7 se preparó disolviendo 253 mg de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ y 416 mg de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$ en agua ultrapura, posteriormente se ajustó el pH con NaOH 1 N y se completó a un volumen final de 50 mL con agua ultrapura.

4.4.2. Solución extractiva

La solución extractiva se preparó adicionando 80 mL de acetonitrilo grado HPLC y 20 mL de agua ultrapura.

4.4.3. Soluciones patrón

- Estándar interno: se preparó una solución madre de o,p'-DDE, p,p'-DDE $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, para lo cual se pesaron 5 mg de cada analito, se disolvieron en hexano y se completó a un volumen final de 50 mL con hexano grado GC. A partir de esta solución se preparó una solución diluida de $0.12 \mu\text{g mL}^{-1}$ la cual se usó como estándar interno. Ambas soluciones se almacenaron a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$.
- Estándar de micotoxinas: se prepararon soluciones madres de cada micotoxina (DON, 3-ADON, 15-ADON, NIV) a una concentración de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, disolviendo el estándar sólido en la cantidad adecuada de acetonitrilo grado HPLC. A partir de estas soluciones se prepararon, mediante dilución con acetonitrilo, soluciones estándar de trabajo de concentraciones 0.5 y $2.5 \mu\text{g mL}^{-1}$, consistente en una mezcla de las micotoxinas estudiadas. Todas las soluciones se almacenaron a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$.



5. Metodología

5.1. Aislamiento y purificación de especies de *Fusarium* desde trigo

Se seleccionaron las espigas de trigo que presentaron sintomatología de fusariosis de la espiga, es decir, espigas decoloradas en las cuales se observó crecimiento de micelio de color rosa o blanquecino [17, 19].

Desde estas espigas, se extrajeron las glumas afectadas y fueron puestas en placas con medio agar papa dextrosa (PDA) para permitir el crecimiento del hongo. Las placas se dejaron a temperatura ambiente y luego de unos días, se observó el crecimiento de las distintas colonias. Con un sacabocado se tomó una porción de una determinada colonia y se colocó en el centro de una nueva placa de PDA, dejando la superficie cubierta de micelio en contacto con el medio PDA; este procedimiento se debe realizar hasta obtener un aislamiento puro del hongo.

Esta actividad y todas las relacionadas con el estudio y manipulación del material fúngico se realizaron en el Laboratorio de Fitopatología de Cereales del Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA) Quilamapu, Chillán, gracias a la gentileza del Dr. Ricardo Madariaga B.

5.2. Identificación de las especies aisladas

5.2.1. Identificación morfológica

En primer lugar se observaron las características macroscópicas de las colonias aisladas en las placas de PDA. Se observó la velocidad de crecimiento del hongo en la placa, la forma de crecimiento y la pigmentación del anverso y reverso de la placa. Posteriormente, se tomó una pequeña porción de micelio del hongo y se observó bajo el microscopio para verificar la presencia o ausencia de estructuras microscópicas que son características del género *Fusarium*.

5.2.2. Identificación molecular

Para la extracción del ADN de los hongos aislados, se molieron 200 mg de micelio del hongo en tampón de extracción CTAB 2 % de acuerdo a lo descrito por Montalva et al [93].

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó utilizando partidores específicos [94] para *Fusarium graminearum*, *Fusarium pseudograminearum*, *Fusarium avenaceum*, *Fusarium culmorum* y *Fusarium acuminatum*.

El análisis de cada aislamiento se realizó en duplicado utilizando un volumen final de 25 μ L por muestra, conteniendo: tampón PCR, $MgCl_2$ 1.5 mM, 200 μ M de cada dNTP, 240 nM de cada partidor, 1.5 U de Taq ADN polimerasa y 25 ng de ADN del hongo, de acuerdo con el

protocolo descrito por Scott et al. [94]. La reacción se realizó utilizando un termociclador programado con los siguientes tiempos y temperaturas de amplificación: 1 ciclo a 94 °C por 3 minutos para la desnaturalización del ADN molde; 35 ciclos de desnaturalización cíclica a 94 °C por 45 segundos, 35 ciclos de 45 segundos, a una temperatura dependiente del partidador utilizado [94] para la hibridación del partidador al ADN molde; 35 ciclos a 72 °C por 2 minutos de extensión y un ciclo de extensión final a 72 °C por 7 minutos.

La presencia de producto amplificado se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % p/v en tampón borato de sodio teñido con bromuro de etidio. Se adicionaron 10 µL de producto de amplificación mezclado con 2 µL de tampón de carga y se realizó la electroforesis a un voltaje constante de 100 volt durante 40 minutos. Finalmente, las bandas de ADN amplificado se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta.

La identificación molecular del aislamiento se realizó bajo la supervisión del Dr. Ernesto Moya E. en el Laboratorio de Fitopatología, Departamento de Producción Vegetal, Facultad de Agronomía, Universidad de Concepción Campus Chillán.

5.3. Implementación de un método cromatográfico para la detección y cuantificación de tricotecenos en trigo

5.3.1. Extracción y limpieza

La extracción de las micotoxinas desde trigo se realizó según el procedimiento descrito por Klötzel et al. [95], con algunas modificaciones. 25 gramos de trigo molido se extrajeron con 100 mL de solución extractiva acetonitrilo:agua (80:20, v/v) durante 1 hora a temperatura ambiente, utilizando un agitador horizontal. Posteriormente, se filtró el extracto y se tomó una alícuota de 4 mL del filtrado para realizar la limpieza del extracto con cartuchos de extracción en fase sólida Bond Elut Mycotoxin. Finalmente, se tomaron 2 mL del eluato y se evaporaron a sequedad bajo corriente de nitrógeno.

5.3.2. Derivatización de las micotoxinas

Las micotoxinas se derivatizaron utilizando el procedimiento descrito por Rodríguez-Carrasco et al. [96], con algunas modificaciones. Al extracto seco, se adicionaron 50 µL de reactivo de derivatización BSA + TMCS + TMSI (3:2:3) y se dejó reaccionar a 30 °C por 30 minutos. Luego se agregaron 500 µL de solución o,p'-DDE y p,p'-DDE 0.12 µg mL⁻¹ en hexano (estándar interno), o simplemente hexano en el caso del blanco de reacción, y se agitó en vortex por 30 segundos. Posteriormente se agregó 1 mL de tampón fosfato (60 mM, pH 7) y se agitó en vortex por 30 segundos. Luego se transfirió la fase superior de hexano a un vial para su posterior análisis por cromatografía de gas.

5.3.3. Condiciones cromatográficas

Las muestras se analizaron utilizando cromatografía de gas con detector de captura de electrones bajo las siguientes condiciones cromatográficas:

- Volumen de inyección : 1 μL en modo splitless.
- Temperatura inyector : 250 $^{\circ}\text{C}$ a presión constante de 20.3 psi.
- Fase estacionaria : 5 % fenil – 95 % metilpolisiloxano 30 m x 0.25 mm I.D. x 0.25 μm de espesor de film.
- Gas de arrastre : nitrógeno.
- Programa de temperatura del horno : 80 $^{\circ}\text{C}$
245 $^{\circ}\text{C}$ a 60 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$, mantener por 3 min.
260 $^{\circ}\text{C}$ a 3 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$
270 $^{\circ}\text{C}$ a 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$, mantener por 10 min
- Temperatura detector : 300 $^{\circ}\text{C}$

5.4. Determinación parámetros analíticos

5.4.1. Linealidad

La linealidad de un método analítico es la capacidad, dentro de un intervalo definido, de obtener resultados que son directamente proporcionales a la concentración de analito en una muestra [97].

Para verificar la linealidad de la respuesta del detector con respecto a la concentración de las micotoxinas, se confeccionaron curvas de calibración estándar empleando el método de estándar interno. Las curvas de calibración se construyeron utilizando 8 niveles de concentración comprendidos en el rango de 50 a 1000 $\mu\text{g kg}^{-1}$, utilizando una concentración de estándar interno de 0.12 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Las ecuaciones que describen el comportamiento lineal se obtuvieron graficando la relación entre la proporción de área del analito (A_A) y el área del estándar interno (A_{IS}), versus la concentración del analito. Cada curva de calibración se realizó en duplicado en tres días distintos.

Para evaluar el efecto de la matriz sobre la linealidad, se confeccionaron curvas de calibración sobrecargando trigo. El trigo utilizado fue previamente analizado y no se detectó la presencia de las micotoxinas estudiadas, por tanto es apto para su uso como trigo blanco. La extracción de trigo se realizó de acuerdo al procedimiento descrito en la sección 5.3.1. Al extracto seco, se adicionó una cantidad adecuada de estándar de micotoxinas para obtener concentraciones de 50, 100, 350, 650 y 1000 $\mu\text{g kg}^{-1}$, se evaporó el solvente bajo corriente de nitrógeno y se derivatizaron los extractos (ver sección 5.3.2). Las curvas de calibración en matriz se realizaron en duplicado en tres días distintos y las ecuaciones correspondientes se obtuvieron de la forma señalada anteriormente.

5.4.2. Precisión y exactitud

La precisión de un procedimiento analítico expresa el grado de dispersión de una serie de medidas obtenidas bajo condiciones establecidas. Mientras que la exactitud expresa el grado de concordancia entre el valor que se acepta como valor verdadero y el valor encontrado [97].

Para la determinación de estos parámetros, se sobrecargaron muestras de trigo a dos niveles de concentración 200 y 750 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Para esto, se adicionó una cantidad adecuada de solución estándar a 25 g de trigo molido y luego se realizó la extracción de las muestras siguiendo el procedimiento descrito en la sección 5.3.1. Los extractos obtenidos, se derivatizaron (ver sección 5.3.2) y se analizaron por cromatografía de gas (ver sección 5.3.3). La evaluación de cada nivel de concentración se realizó en triplicado durante dos días distintos. El grado de dispersión de los resultados obtenidos, se evaluó mediante la determinación de la desviación estándar relativa (RSD) y la exactitud se evaluó mediante la determinación del porcentaje de recuperación.

5.4.3. Límite de detección y límite de cuantificación

El límite de detección es la cantidad más baja de analito en una muestra que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada como un valor exacto. Mientras que el límite de cuantificación es la menor cantidad de analito en una muestra que puede ser determinada cuantitativamente con precisión y exactitud adecuadas [97].

Estos parámetros se determinaron utilizando el método de señal/ruido, para esto se sobrecargó un extracto de trigo a una concentración de 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de cada micotoxina y se evaluó en conjunto con un blanco de trigo. Los límites se determinaron considerando una relación señal/ruido de 3.3:1 para el límite de detección y de 10:1 para el límite de cuantificación.

5.5. Producción de micotoxinas *in vitro*

5.5.1. Diseño de experimento

Para evaluar si el aislamiento obtenido tiene la capacidad de producir micotoxinas, se planificó un diseño de experimentos del tipo factorial completo (FFD) de tres variables a dos niveles. Posteriormente, con las respuestas obtenidas a partir de los experimentos diseñados, se generó un modelo matemático utilizando regresión por cuadrados parciales mínimos (PLSR). De esta forma, además de evaluar la producción de micotoxinas, se puede determinar si las variables evaluadas impactan de manera significativa en la producción de micotoxinas y si existen interacciones entre estas variables.

5.5.2. Contaminación de arroz

La contaminación del arroz con el aislamiento de *Fusarium* se realizó de acuerdo a lo planificado en el diseño de experimentos, utilizando las siguientes variables:

- Cantidad de agua destilada: 40 y 80 mL
- Temperatura de incubación: 20 y 25 °C
- Tiempo de incubación : 3 y 4 semanas.

El procedimiento general consistió en agregar (en frascos de 250 mL), la cantidad correspondiente de agua destilada a 100 gramos de arroz pulido (arroz blanco marca Miraflores® grado 1, grano largo – ancho). Posteriormente, esta mezcla se esterilizó en autoclave a una temperatura de 121 °C por 15 minutos y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Al día siguiente, se contaminó el arroz con 10 discos (de 1 cm de diámetro) de una colonia del hongo en medio PDA de siete días de crecimiento. Finalmente, los arroces contaminados se incubaron en estufa bajo las condiciones que se describen en la tabla 5.1. Transcurrido el tiempo de incubación, se secó el arroz en una estufa a 50 °C por tres días. Las muestras se almacenaron a – 20 °C hasta su análisis mediante GC-ECD.

Tabla 5.1: Condiciones experimentales ensayo producción de micotoxinas *in vitro*.

Condición	Tiempo (semanas)	Temperatura (°C)	Cantidad de agua (mL)
1	3	20	40
2	3	20	80
3	3	25	40
4	3	25	80
5	4	20	40
6	4	20	80
7	4	25	40
8	4	25	80

Se realizaron 5 réplicas de cada condición ensayada más un blanco al cual no se adicionaron discos de PDA con el hongo, obteniéndose un total de 6 experimentos por cada condición ensayada.

5.5.3. Detección y cuantificación de las micotoxinas producidas

Para la extracción de las micotoxinas se molieron los 100 gramos de arroz de cada ensayo, y se homogeneizaron completamente. De este homogeneizado, se tomaron 25 gramos de arroz y se extrajeron con 100 mL de solución extractiva acetonitrilo:agua (80:20, v/v) durante 1 hora a temperatura ambiente, utilizando un agitador horizontal. Posteriormente, se filtró el extracto y se tomó una alícuota de 8 mL del filtrado para realizar la limpieza del extracto con cartuchos

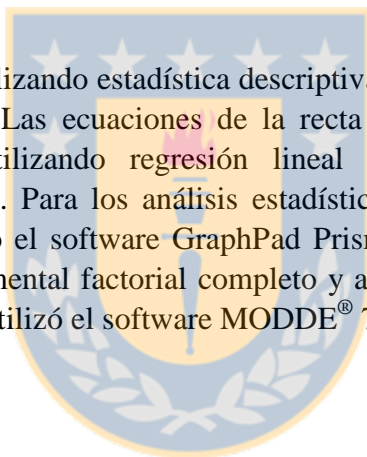
de extracción en fase sólida Bond Elut Mycotoxin. Finalmente, se tomaron 4 mL del eluato y se evaporaron a sequedad bajo corriente de nitrógeno.

Una vez seco los extractos, se adicionaron 50 μL de reactivo de derivatización BSA + TMCS + TMSI (3:2:3) y se dejó reaccionar a 30 °C por 30 minutos. Luego se agregaron 250 μL de hexano y se agitó en vortex por 30 segundos. Posteriormente, se agregó 1 mL de tampón fosfato (60 mM, pH 7) y se agitó en vortex por 30 segundos. Finalmente, se transfirió la fase superior de hexano a un vial para su posterior análisis por cromatografía de gas, utilizando las condiciones cromatográficas señaladas en la sección 5.3.3.

Las muestras se cuantificaron utilizando el método de calibración externa, para lo cual se confeccionó una curva de calibración con arroz sobrecargado en un rango de concentración de 25 a 1000 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

5.6. Tratamiento de datos

Los datos fueron evaluados utilizando estadística descriptiva (promedio, desviación estándar y desviación estándar relativa). Las ecuaciones de la recta correspondiente a cada curva de calibración se obtuvieron utilizando regresión lineal empleando el programa Excel[®] (Microsoft Corporation, USA). Para los análisis estadísticos de datos correspondientes a t-student y test Fisher se utilizó el software GraphPad Prism[®] 5.0 (GraphPad, USA). Para la elaboración del diseño experimental factorial completo y análisis de regresión por cuadrados parciales mínimos (PLSR) se utilizó el software MODDE[®] 7.0 (Umetrics, Suecia).



6. Resultados

6.1. Identificación de las especies aisladas

6.1.1. Identificación morfológica

Desde las espigas de trigo candeal, variedad Llareta INIA, que presentaron crecimiento de un micelio de coloración rosa-blanquecino, se obtuvo un aislamiento puro del hongo responsable de la patología. Este aislamiento se denominó FUS 2013-7.

En la figura 6.1 se observa el aislamiento obtenido en placas de PDA, se aprecia un crecimiento radial del hongo, el cual creció a una velocidad de 1 centímetro por día. La colonia presenta un micelio algodonoso de coloración blanquecina con tintes rosados, observándose claramente esta coloración en el reverso de la placa de PDA.

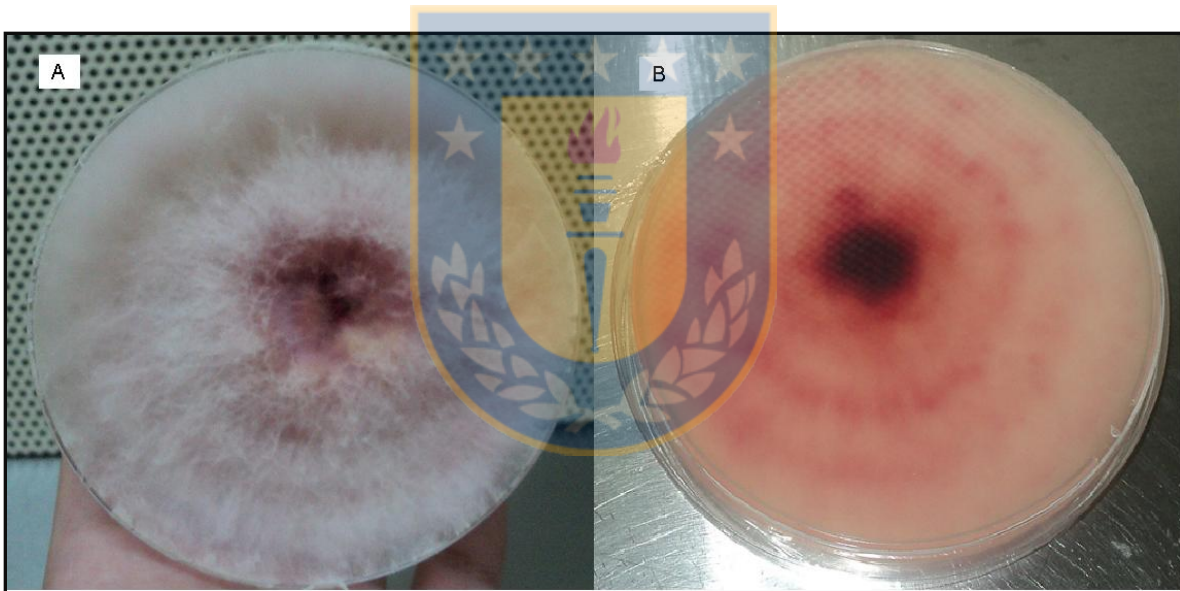


Figura 6.1: Aislamiento FUS 2013-7 en medio PDA. A) anverso de la placa, B) reverso de la placa.

Al observar el micelio del hongo con un microscopio óptico, para determinar la presencia de estructuras microscópicas que permitan identificar el aislamiento, se encontró ausencia de microconidias y presencia de macroconidias. Como se observa en la figura 6.2, las macroconidias encontradas tienen forma curvada (“forma de canoa”), son pluriseptadas y presentan una célula basal con forma de pie, esto último es una característica del género *Fusarium*.



Figura 6.2: Macroconidia del aislamiento FUS 2013-7.

Las características macroscópicas y microscópicas observadas permiten identificar morfológicamente al aislamiento como *Fusarium graminearum*.

6.1.2. Identificación molecular

Se realizó la caracterización molecular del aislamiento FUS 2013-7 utilizando partidores específicos para distintas especies del género *Fusarium*. Este ensayo se realizó en conjunto con otros aislamientos denominados FUS 2013-14 y FUS 2013-19 los cuales tienen una procedencia distinta al aislamiento estudiado en este trabajo.

En la figura 6.3 se observa el producto de amplificación obtenido al utilizar partidores para *F. graminearum* Fg16NF/Fg16NR (líneas 1 – 7) y *F. pseudograminearum* Fp1-1/Fp1-2 (líneas 8 – 14) los cuales amplifican bandas de 280 y 523 pb respectivamente [94]. Las líneas 1, 2, 8 y 9 contienen ADN del aislamiento FUS 2013-7, las líneas 3, 4, 10 y 11 contienen ADN del aislamiento FUS 2013-14 y las líneas 5, 6, 12 y 13 contienen ADN del aislamiento FUS 2013-19; 7 y 14 son controles negativos que no contienen ADN y M corresponde a un marcador de peso molecular. Se observa amplificación de la banda de 280 pb en las líneas 1 y 2 lo que permite identificar el aislamiento FUS 2013-7 como *Fusarium graminearum*.



Figura 6.3: Gel de agarosa ensayo PCR utilizando partidores para *F. graminearum* y *F. pseudograminearum*.

Con la finalidad de identificar los aislamientos FUS 2013-14 y 2013-19 se realizó un nuevo ensayo de PCR utilizando partidores específicos para *F. graminearum* Fg16NF/Fg16NR, *F. avenaceum* FA-ITSF/FA-ITSR, *F. culmorum* Fc01F/Fc01R y *F. acuminatum* FAC-F/FAC-R los cuales amplifican bandas de 280, 272, 570, 602 pb respectivamente [94].

En la figura 6.4 se observa el producto de amplificación obtenido. Las líneas 1 y 2 contienen ADN del aislamiento FUS 2013-7, las líneas 4, 5, 9, 10, 14 y 15 contienen ADN del aislamiento FUS 2013-14 y las líneas 6, 7, 11, 12, 16 y 17 contienen ADN del aislamiento FUS 2013-19; 3, 8, 13 y 18 son controles negativos que no contienen ADN y M es un marcador de peso molecular. Se observa amplificación de la banda de 280 pb en las líneas 1 y 2 lo que ratifica que el aislamiento FUS 2013-7 es un *Fusarium graminearum*. También se observa amplificación de la banda de 602 pb en las líneas 14 – 17 lo que permite identificar los aislamientos FUS 2013-14 y FUS 2013-19 como *Fusarium acuminatum*.

Estos resultados también demuestran la especificidad de la metodología utilizada ya que cada aislamiento amplificó solamente con un partidore.

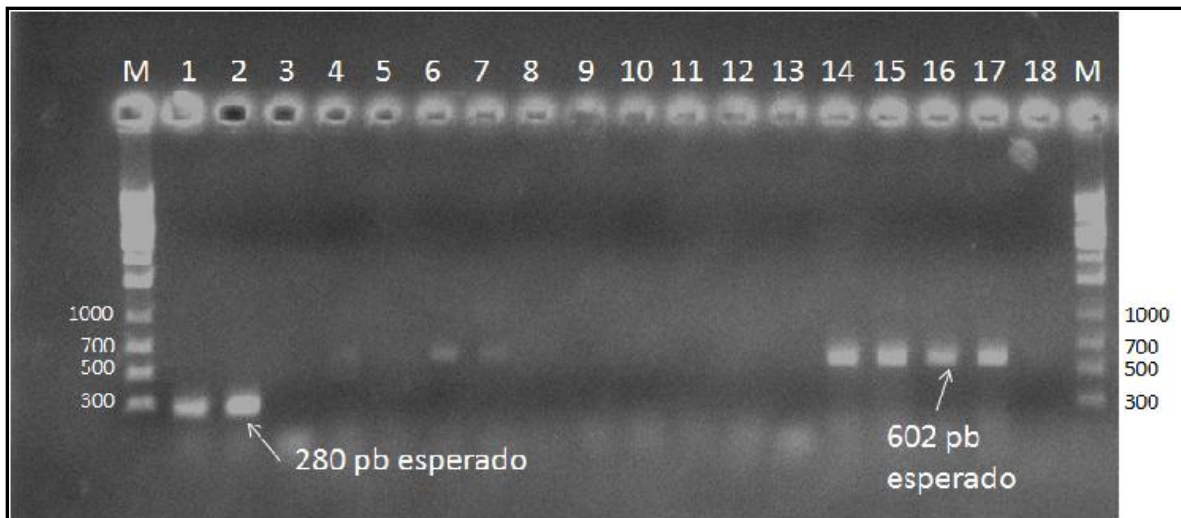


Figura 6.4: Gel de agarosa ensayo PCR utilizando partidores para *F. graminearum* (1 – 3), *F. avenaceum* (4 – 8), *F. culmorum* (9 – 13) y *F. acuminatum* (14 – 18).

6.2. Implementación de un método analítico para la detección y cuantificación de tricotecenos en trigo

6.2.1. Micotoxinas estudiadas

Al inicio de la implementación del método cromatográfico se evaluó la detección de tricotecenos de tipo A (DAS y HT-2) y tricotecenos de tipo B (DON, 3-ADON y NIV).

En la figura 6.5 se presenta el cromatograma obtenido, en el cual se observa una separación adecuada de las micotoxinas, excepto para DAS, que no se resuelve respecto al 3-ADON. Por otra parte, a pesar que todas las micotoxinas son derivatizadas de igual forma, se observa que la respuesta de los tricotecenos de tipo A es bastante menor a la señal obtenida para los tricotecenos de tipo B (TCTB). Este resultado concuerda con lo reportado en literatura donde se señala que los trimetilsilil derivados de los tricotecenos de tipo A otorgan menor señal al ser analizados mediante GC-ECD, debido a la carencia del grupo carbonilo en C-8 [85, 98, 99].

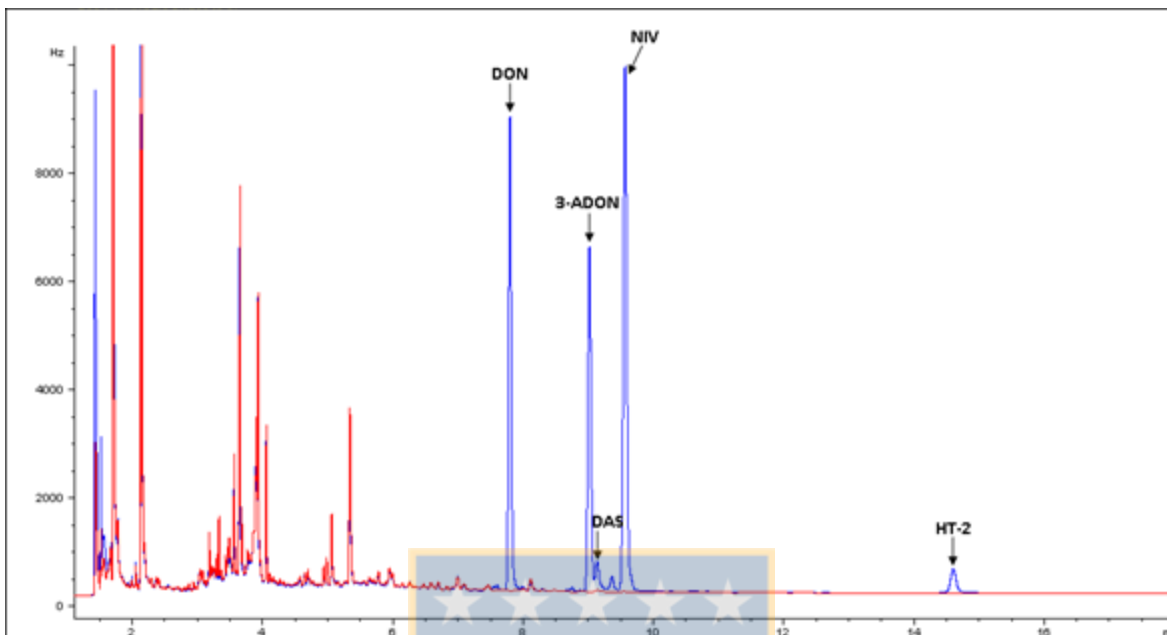


Figura 6.5: Cromatograma de una mezcla de estándar de DON ($300 \mu\text{g kg}^{-1}$), 3-ADON ($300 \mu\text{g kg}^{-1}$), NIV ($300 \mu\text{g kg}^{-1}$), DAS ($1200 \mu\text{g kg}^{-1}$) y HT-2 ($1200 \mu\text{g kg}^{-1}$) derivatizados con BSA + TMCS + TMSI.

En base a lo anteriormente señalado y, sumado al hecho de que *F. graminearum* se asocia con la producción de tricotecenos de tipo B [8, 63, 89, 100, 101], se decidió continuar el trabajo estudiando solamente el grupo de tricotecenos de tipo B.

6.2.2. Temperatura de reacción

Los procedimientos de derivatización de tricotecenos con BSA + TMCS + TMSI descritos en literatura utilizan distintas temperaturas de reacción, entre las cuales destacan: temperatura ambiente [62, 102], 30° [103, 104], 40° [101, 105] y 80°C [88, 106]. Debido a esto se decidió estudiar si habría diferencia al realizar la reacción de derivatización a 30° u 80°C . Para esto se derivatizó estándar de tricotecenos de tipo B a una concentración de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ en triplicado a las temperaturas ensayadas. Se comparó las áreas promedio obtenidas mediante una prueba de t-student ($\alpha=0.05$), encontrándose que no existe diferencia estadísticamente significativa entre realizar la reacción a 30° u 80°C para ninguna de las micotoxinas estudiadas (figura 6.6). Por tanto, se decidió realizar la reacción de derivatización a 30°C .

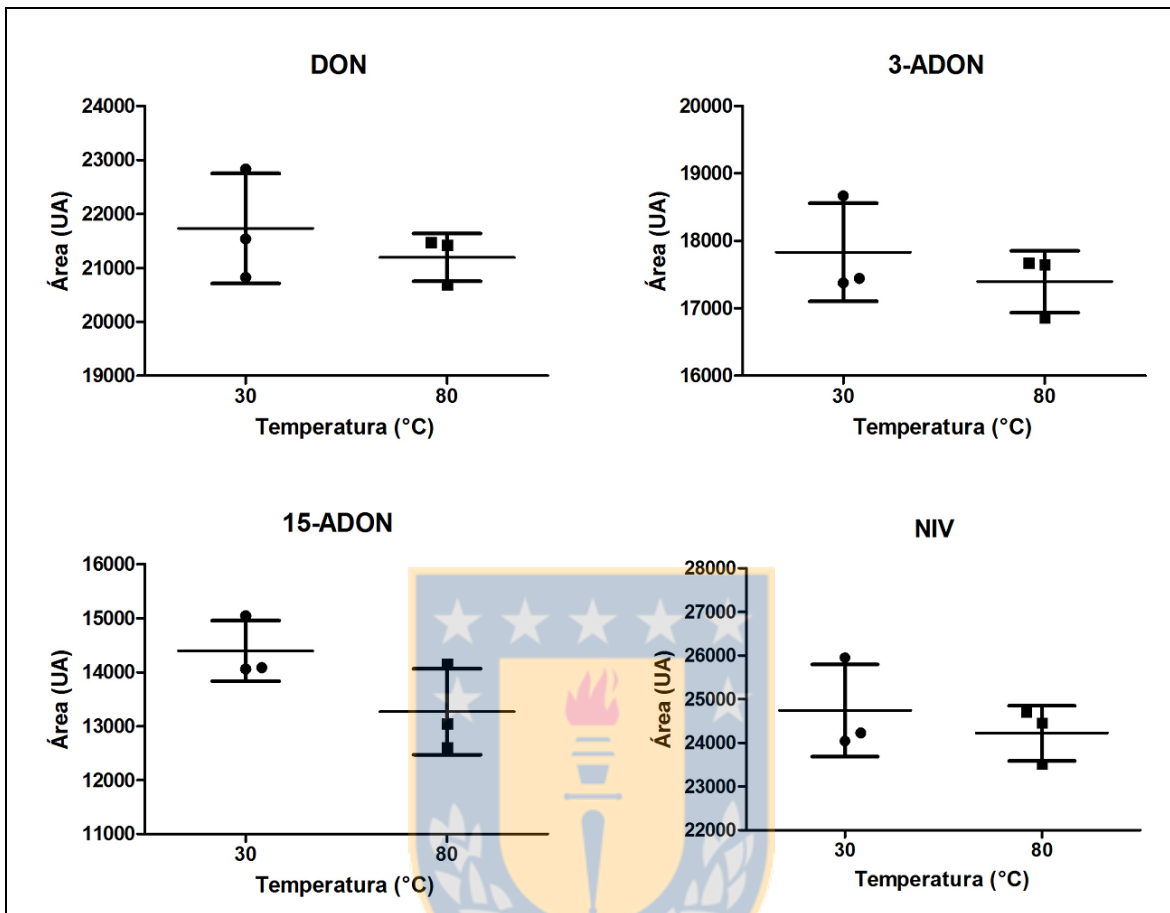


Figura 6.6: Comparación temperatura de reacción de derivatización de tricotecenos de tipo B ($100 \mu\text{g kg}^{-1}$) con BSA + TMCS + TMSI. Se representa la media y la desviación estándar.

6.2.3. Elección estándar interno

Se utiliza un estándar interno clorado para controlar la respuesta y disminuir los problemas de reproducibilidad y repetibilidad del instrumento (GC-ECD) [105, 107]. Con esta finalidad, se ensayó el uso de *o,p'*-DDE y *p,p'*-DDE. En la figura 6.7 se observa la señal obtenida para estos analitos y su relación con las micotoxinas estudiadas. Ambos compuestos proporcionan una señal adecuada libre de interferencias de la matriz. Se decidió utilizar *p,p'*-DDE como estándar interno ya que proporciona mayor señal y presenta una menor cantidad de picos aledaños.

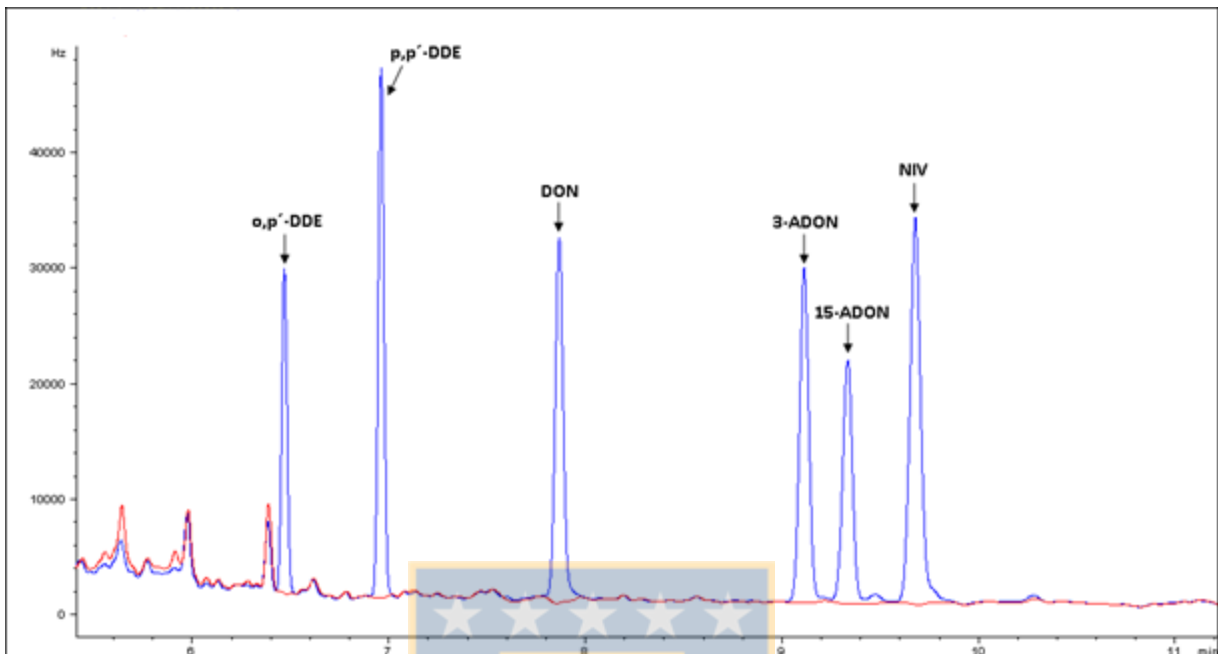


Figura 6.7: Cromatograma de trigo blanco (línea roja) y trigo sobrecargado (línea azul) con o,p'-DDE, p,p'-DDE: $0.12 \mu\text{g mL}^{-1}$ y TCTB: $500 \mu\text{g kg}^{-1}$.

6.3. Determinación parámetros analíticos

6.3.1. Linealidad

6.3.1.1. Curva de calibración estándar

En la figura 6.8 se presentan las curvas de calibración obtenidas para las cuatro micotoxinas estudiadas. Las ecuaciones de la recta, correspondiente a cada micotoxina, se presentan en la tabla 6.1 junto con el coeficiente de correlación. Los resultados obtenidos demuestran que existe una relación lineal entre las variables en el rango ensayado.

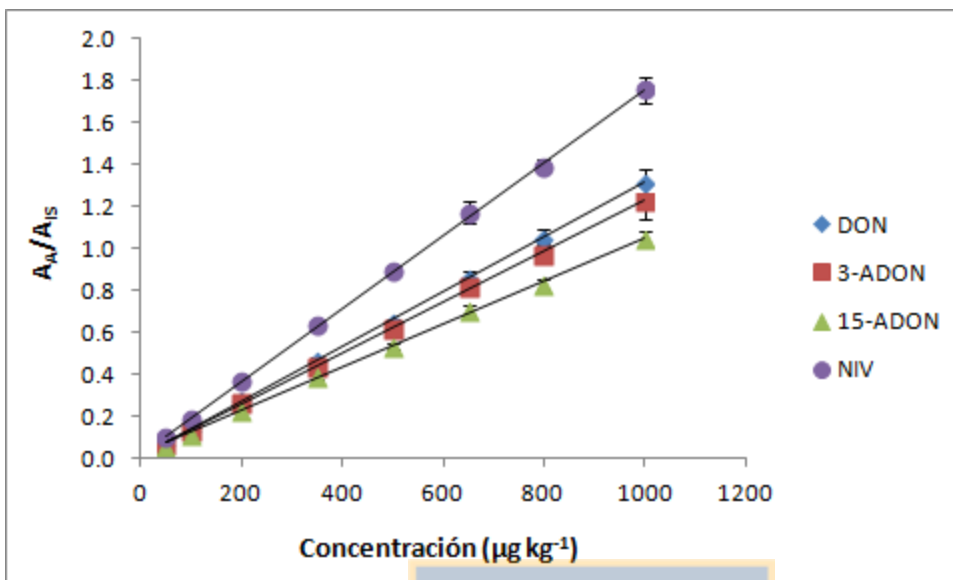


Figura 6.8: Curvas de calibración estándar. n = 2; 3 días distintos.

Tabla 6.1: Linealidad de tricotecenos en estándar^a.

Micotoxina	Ecuación de la recta	Coefficiente de correlación (r)
DON	$y = 0.0013 x + 0.0087$	0.9999
3-ADON	$y = 0.0012 x + 0.0185$	0.9997
15-ADON	$y = 0.0010 x + 0.0225$	0.9996
NIV	$y = 0.0017 x + 0.0216$	0.9997

^a Rango lineal: 50 – 1000 µg kg⁻¹.

6.3.1.2. Curva de calibración en matriz

En la figura 6.9 se presentan las curvas de calibración en matriz obtenidas para las cuatro micotoxinas estudiadas. Las ecuaciones de la recta, correspondiente a cada micotoxina, se presentan en la tabla 6.2 junto con el coeficiente de correlación. Los resultados obtenidos demuestran que existe una relación lineal entre las variables en el rango ensayado.

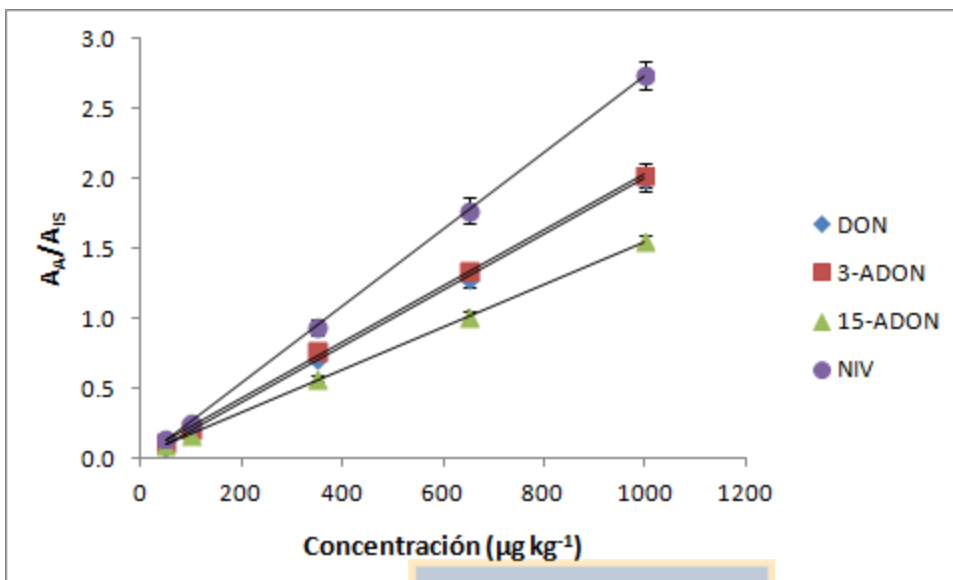


Figura 6.9: Curva de calibración en trigo. n = 2; 3 días distintos.

Tabla 6.2: Linealidad de tricotecenos en trigo^a.

Micotoxina	Ecuación de la recta	Coefficiente de correlación (r)
DON	$y = 0.0020 x - 0.0034$	0.9998
3-ADON	$y = 0.0020 x + 0.0317$	0.9996
15-ADON	$y = 0.0015 x + 0.0212$	0.9999
NIV	$y = 0.0027 x - 0.0044$	0.9999

^a Rango lineal: 50 – 1000 µg kg⁻¹.

Posteriormente, se procedió a comparar las pendientes de las curvas de calibración de estándar con la curva de calibración en matriz mediante un test Fisher ($\alpha=0.05$). La comparación muestra que las pendientes de ambas curvas no son iguales, $p < 0.0001$. Se obtuvo el mismo resultado para todas las micotoxinas, esto se observa gráficamente en las figuras 6.10 a la 6.13. Este resultado muestra que hay un efecto matriz y, por tanto, se debe utilizar una curva de calibración en matriz para la cuantificación de las micotoxinas en trigo.

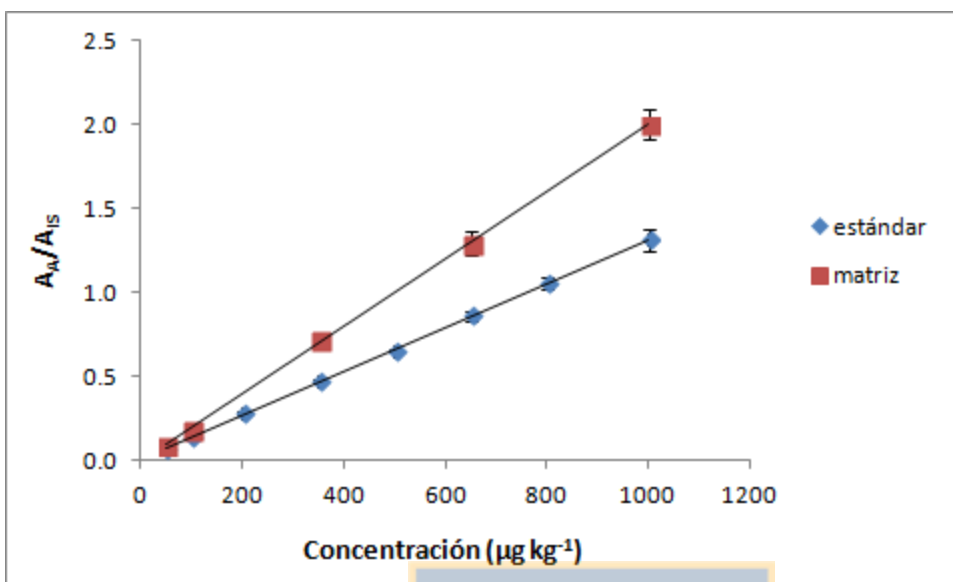


Figura 6.10: Comparación curva de calibración estándar y matriz para deoxinivalenol.

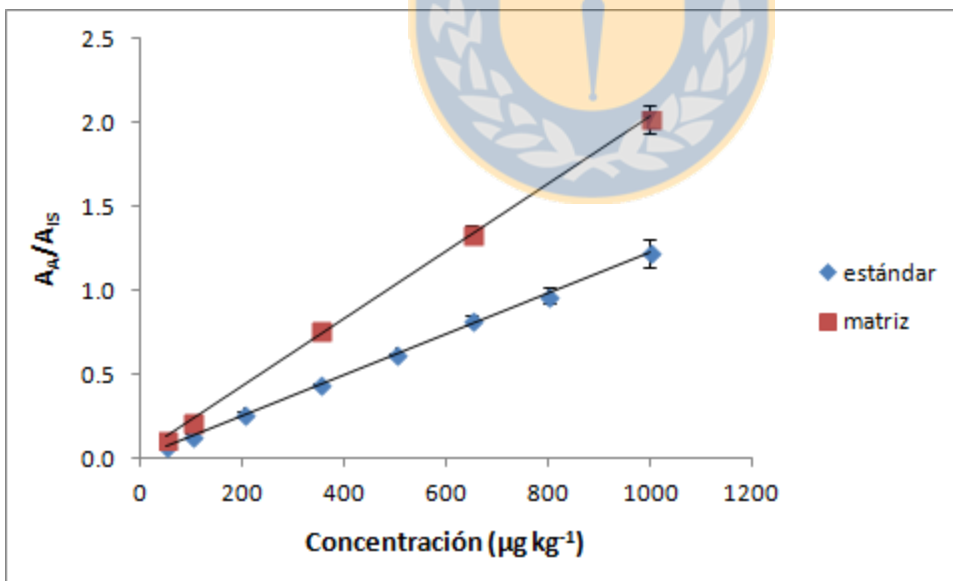


Figura 6.11: Comparación curva de calibración estándar y matriz para 3-acetildeoxinivalenol.

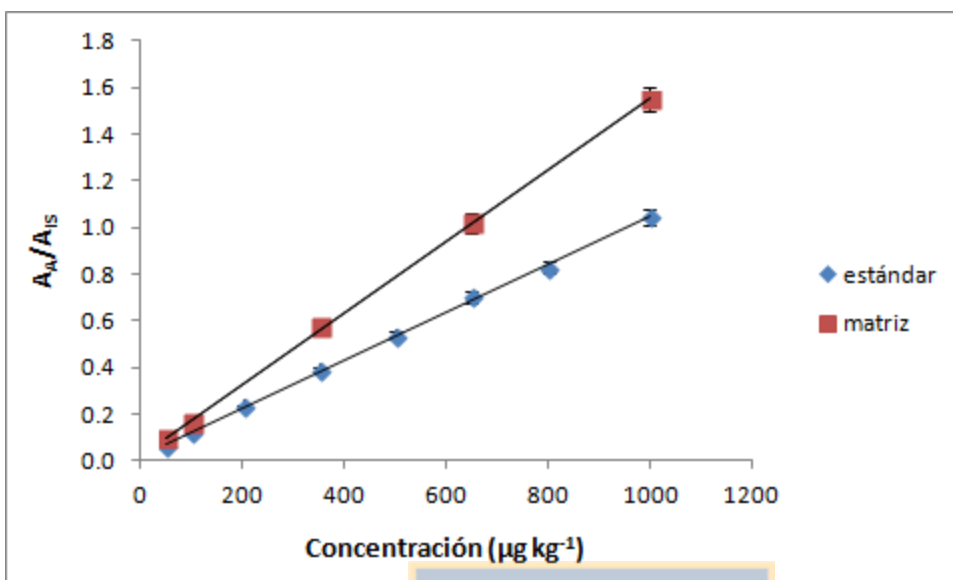


Figura 6.12: Comparación curva de calibración estándar y matriz para 15-acetildeoxinivalenol.

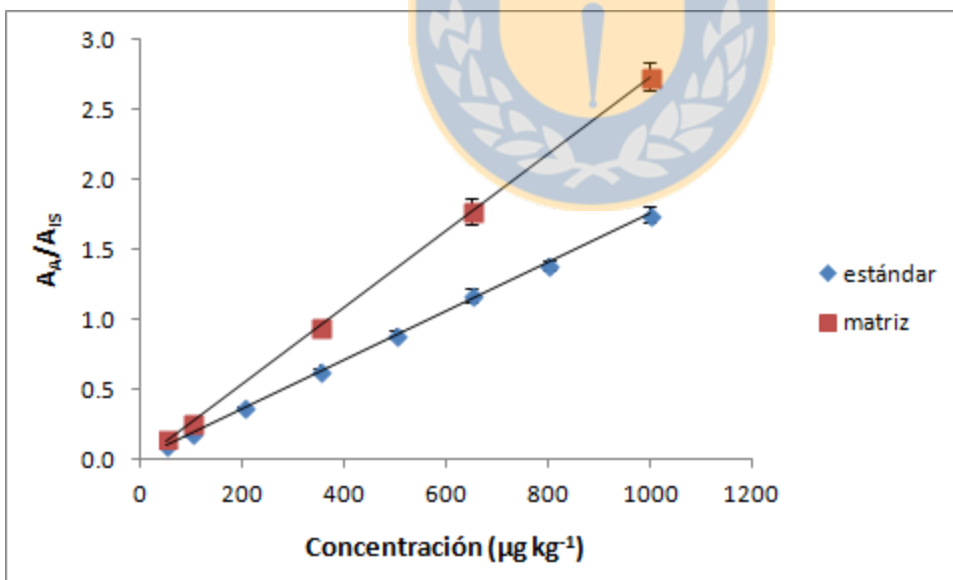


Figura 6.13: Comparación curva de calibración estándar y matriz para nivalenol.

6.3.2. Precisión y exactitud

Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 6.3, se observa que los valores de recuperación más bajos corresponden a NIV y los más altos a 3-ADON. Se obtuvo una recuperación adecuada para DON, 3-ADON y 15-ADON sin embargo, la recuperación de NIV se encuentra fuera del rango aceptado (80 – 110 %) de acuerdo al criterio de AOAC [108]. La baja recuperación de NIV es frecuentemente reportada en literatura, por ejemplo utilizando columnas Bond Elut Mycotoxin Klötzel et al. reporta una recuperación de 67 % en trigo [95], mientras que Yue et al. señala una recuperación de 60.1 % en plantas medicinales [109]. Utilizando otros procedimientos de limpieza del extracto también se describen valores de recuperación inferiores al 80 % [62, 104, 106, 110, 111]. Por tanto, debido a la baja recuperación de NIV (50.1 %) la metodología implementada, sólo es adecuada para analizar la presencia de esta micotoxina en las muestras.

En cuanto a la dispersión de los resultados (RSD), esta es adecuada obteniéndose valores que van desde 1.5 a 6.3 %.

Tabla 6.3: Recuperación y desviación estándar relativa de tricotenenos en trigo sobrecargado (n = 6).

Micotoxina	Nivel de sobrecarga ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Recuperación (%)	RSD (%)
DON	200	86.7	6.2
	750	93.1	1.5
3-ADON	200	109	3.3
	750	110	5.2
15-ADON	200	107	3.1
	750	108	4.2
NIV	200	52.1	6.3
	750	50.1	4.2

6.3.3. Límite de detección y límite de cuantificación

Estos parámetros se evaluaron en matriz utilizando el método de señal/ruido, obteniéndose límites de cuantificación entre 30 y 44 $\mu\text{g kg}^{-1}$ como se señala en la tala 6.4. Los valores obtenidos para los límites de detección y cuantificación se verificaron experimentalmente sobrecargando un blanco de trigo con las concentraciones correspondientes y se inyectó en quintuplicado.

Tabla 6.4: Límite de detección y cuantificación de tricotecenos en trigo.

Micotoxina	Límite de detección ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Límite de cuantificación ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
DON	13.2	40.0
3-ADON	13.2	40.0
15-ADON	14.5	44.0
NIV	10.0	30.0

6.3.4. Análisis de muestra de trigo afectado con FHB

Utilizando la metodología analítica implementada, se analizaron los granos de trigo obtenidos desde las espigas que presentaron sintomatología de FHB. El análisis de la muestra no detectó la presencia de micotoxinas en los granos de trigo.

6.4. Producción de micotoxinas *in vitro*

Las muestras de arroz de los ensayos de producción de micotoxinas *in vitro* se cuantificaron utilizando el método de calibración externa. El detalle de las curvas de calibración empleadas para dicha cuantificación se presenta en el anexo A.

6.4.1. Primer ensayo

Se realizó un ensayo preliminar para determinar si el aislamiento de *Fusarium graminearum*, FUS 2013-7, tenía la capacidad de producir micotoxinas en un medio de arroz. Para esto se agregaron 40 mL de agua destilada a 100 gramos de arroz (en un matraz erlenmeyer de 500 mL), esta mezcla se esterilizó en autoclave a una temperatura de 121 °C por 15 minutos y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Posteriormente se contaminó el arroz con 10 discos de una colonia del hongo en medio PDA de siete días de crecimiento y se dejó en incubación bajo las siguientes condiciones:

- 20 °C durante 3 semanas
- 20 °C durante 4 semanas

- 25 °C durante 3 semanas
- 25 °C durante 4 semanas

En las tabla 6.5 se presentan los resultados obtenidos, se observa que el aislamiento FUS 2013-7 produce DON y 3-ADON bajo las condiciones ensayadas. La micotoxina 15-ADON no fue analizada porque no se disponía del estándar.

Tabla 6.5: Micotoxinas producidas por aislamiento FUS 2013-7 en arroz.

Réplica	Concentración de DON ($\mu\text{g kg}^{-1}$)				Concentración de 3-ADON ($\mu\text{g kg}^{-1}$)			
	3 semanas		4 semanas		3 semanas		4 semanas	
	20 °C	25 °C	20 °C	25 °C	20 °C	25 °C	20 °C	25 °C
1	51.1	1085.4	53.3	356.9	nd ^a	81.2	22.2	174.4
2	433.8	2904.0	96.2	7918.3	nd	35.9	24.0	39.0
3	116.3	454.0	118.7	3637.8	nd	155.8	17.0	113.6
Promedio	200.4	1481.1	89.4	3971.0		91.0	21.1	109.0
SD ^b	204.7	1272.0	33.2	3791.7		60.5	3.6	67.8
RSD	102.2	85.9	37.2	95.5		66.5	17.2	62.2

^a No detectado

^b Desviación estándar

6.4.2. Segundo ensayo

Debido a que el ensayo preliminar mostró que el aislamiento FUS 2013-7 tiene la capacidad de producir micotoxinas, se realizó un segundo ensayo de producción de micotoxinas *in vitro* utilizando un diseño de experimentos para evaluar cuales son las variables que tienen un mayor impacto en la producción de micotoxinas.

Para este estudio “screening” de variables, se planificó un diseño experimental factorial completo (FFD) de tres variables a dos niveles (2^3). Este tipo de diseño experimental permite determinar la influencia y el impacto de las variables sobre la respuesta medida y también permite determinar si existen interacciones significativas entre las variables estudiadas. Se midió como respuesta la concentración de cada micotoxina en $\mu\text{g kg}^{-1}$ y se estudiaron las variables: x_1 temperatura de incubación (T_{inc}), x_2 tiempo de incubación (t_{inc}) y x_3 cantidad de agua adicionada (Agua). Los niveles estudiados para cada variable fueron dos, los cuales se codificaron como (-1) para el nivel más bajo y (+1) para el nivel más alto de cada variable como se indica en la tabla 6.6. Esta normalización tiene por objetivo poder trabajar con variables que poseen diferentes unidades y magnitudes, de esta forma, al trabajar con valores codificados estas variables se pueden relacionar y comparar directamente unas con otras.

Tabla 6.6: Variables estudiadas en el diseño experimental de tipo factorial completo de dos niveles (2^3), segundo ensayo de producción de micotoxinas *in vitro*.

Variables	Niveles	
	-1	+1
x_1 Temperatura de incubación (°C)	20	25
x_2 Tiempo de incubación (semanas)	3	4
x_3 Cantidad de agua (mL)	40	80

Como las variables experimentales, x , son tres y se estudiaron en dos niveles, el diseño estaría conformado por 2^x experimentos, lo que corresponde a $2^3 = 8$ experimentos. Sin embargo, debido a la gran variabilidad de los resultados obtenidos en el ensayo preliminar, se decidió realizar cada experimento en quintuplicado, por lo que se tiene un total de 40 experimentos, los que se detallan en la tabla B1 del anexo B. La contaminación del arroz con el aislamiento FUS 2013-7 se realizó utilizando el procedimiento descrito en la sección 5.5.2. Los resultados obtenidos se presentan en las tablas 6.7 a la 6.9, a partir de las cuales se observa que el aislamiento FUS 2013-7 produce DON, 3-ADON y 15-ADON bajo las condiciones ensayadas. La producción simultánea de DON, 3-ADON y 15-ADON es un hallazgo frecuente al utilizar un medio de cultivo sólido (arroz, trigo) para evaluar la producción de micotoxinas [53, 112-115]. Sin embargo, a pesar de la producción simultánea de ambos derivados acetilados, se aprecia que la cantidad producida de 15-ADON es bastante mayor a la cantidad producida de 3-ADON, entre 5 y 10 veces mayor, lo que permite clasificar al aislamiento de *Fusarium graminearum*, FUS 2013-7, en el quimiotipo 15-ADON.

Tabla 6.7: Cantidad de deoxinivalenol producido por el aislamiento FUS 2013-7 en el segundo ensayo de producción de micotoxinas *in vitro*.

Réplica	Concentración de DON ($\mu\text{g kg}^{-1}$)							
	20/ 3/ 40 ^a	20/ 3/ 80	20/ 4/ 40	20/ 4/ 80	25/ 3/ 40	25/ 3/ 80	25/ 4/ 40	25/ 4/ 80
1	8.9	6201.4	26.5	9799.7	187.8	246.5	288.4	140.6
2	43.9	1252.4	15.7	3584.4	140.8	60.5	372.0	37.3
3	1185.5	22.0	18.4	8663.7	147.5	153.5	227.6	118.2
4	12.4	13885.4	2033.2	759.6	209.4	115.4	344.5	176.2
5	9.3	113.7	69.0	17.0	213.9	46.2	241.9	284.8
Promedio	252.0	4295.0	432.6	4564.9	179.9	124.4	294.9	151.4
SD	522.0	5928.9	895.1	4481.3	34.2	80.7	62.8	90.3
RSD	207.2	138.0	206.9	98.2	19.0	64.8	21.3	59.6

^a: Condiciones del ensayo denominadas según temperatura (°C)/ tiempo de incubación (semanas)/ cantidad de agua adicionada (mL).

Tabla 6.8: Cantidad de 3-acetildeoxinivalenol producido por el aislamiento FUS 2013-7 en el segundo ensayo de producción de micotoxinas *in vitro*.

Réplica	Concentración de 3-ADON ($\mu\text{g kg}^{-1}$)							
	20/ 3/ 40 ^a	20/ 3/ 80	20/ 4/ 40	20/ 4/ 80	25/ 3/ 40	25/ 3/ 80	25/ 4/ 40	25/ 4/ 80
1	nd ^b	534.8	38.3	434.2	95.0	143.7	97.0	83.6
2	42.1	346.8	33.2	461.4	81.2	66.8	94.7	43.2
3	274.0	33.6	34.1	392.0	85.6	108.6	69.5	71.5
4	31.4	821.5	349.7	101.9	94.6	74.2	99.4	86.9
5	30.7	68.2	42.5	31.0	93.5	51.7	83.8	100.9
Promedio	94.6	361.0	99.6	284.1	90.0	89.0	88.9	77.2
SD	119.8	330.0	139.9	201.8	6.3	37.0	12.4	21.7
RSD	126.7	91.4	140.5	71.0	7.0	41.6	13.9	28.1

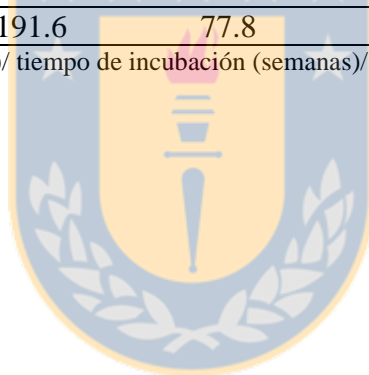
^a: Condiciones del ensayo denominadas según temperatura (°C)/ tiempo de incubación (semanas)/ cantidad de agua adicionada (mL).

^b: No detectado.

Tabla 6.9: Cantidad de 15-acetildeoxinivalenol producido por el aislamiento FUS 2013-7 en el segundo ensayo de producción de micotoxinas *in vitro*.

Réplica	Concentración de 15-ADON ($\mu\text{g kg}^{-1}$)							
	20/ 3/ 40 ^a	20/ 3/ 80	20/ 4/ 40	20/ 4/ 80	25/ 3/ 40	25/ 3/ 80	25/ 4/ 40	25/ 4/ 80
1	28.7	6491.0	81.0	5638.8	641.5	1207.1	779.2	671.0
2	204.5	2554.2	50.4	4345.8	415.8	304.9	860.7	211.4
3	2063.0	63.4	64.7	3070.9	435.2	707.5	522.2	619.4
4	38.4	9274.3	2639.1	1346.8	665.9	438.7	869.0	860.8
5	28.6	294.0	145.9	43.4	791.4	199.9	661.1	910.4
Promedio	472.6	3735.4	596.2	2889.1	590.0	571.6	738.4	654.6
SD	892.2	4031.0	1142.6	2246.8	160.7	402.9	147.0	276.5
RSD	188.8	107.9	191.6	77.8	27.2	70.5	19.9	42.2

^a: Condiciones del ensayo denominadas según temperatura (°C)/ tiempo de incubación (semanas)/ cantidad de agua adicionada (mL).



Para modelar la relación existente entre las variables estudiadas y las respuestas medidas, se generó un modelo matemático utilizando regresión por cuadrados parciales mínimos (PLSR). De esta forma, se obtiene una ecuación polinomial refinada que describe el comportamiento del sistema en estudio, ecuación 1.

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_3x_3 + b_{13}x_1x_3 \quad (1)$$

Donde y es la respuesta medida, x son los valores codificados de las variables, b_0 es la constante de la ecuación y b_n son los diferentes coeficientes de regresión del polinomio.

Para evaluar el ajuste del modelo y, por tanto, su confiabilidad se debe examinar la variación explicada y la variación predicha. La variación explicada se expresa mediante R^2 (bondad del modelo) y es una medida de qué tan bien se ajusta el modelo de regresión a los datos experimentales. Este R^2 puede tener valores entre 0 y 1, en donde 1 indica un modelo que se ajusta de manera perfecta a los datos experimentales, y 0 indica que el modelo no se ajusta en absoluto. La variación predicha se expresa por medio de Q^2 (bondad de predicción) la cual estima el poder predictivo del modelo. El valor de Q^2 puede ir desde 1 a $-\infty$, e indica un buen modelo cuando existe una diferencia no mayor a 0.2 – 0.3 con respecto a R^2 . Otros parámetros que permiten complementar la información de la calidad del modelo son los valores de validación y de reproducibilidad. Cuando el valor de validación del modelo es mayor a 0.25 no hay falta de ajuste en el modelo, y cuando este valor es menor a 0.25 se tiene una significativa falta de ajuste. La reproducibilidad es una medida del control del error experimental, y cuando este valor es alto (> 0.5) se tiene un buen control del error experimental [116]. En la tabla 6.10 se presenta la evaluación del modelo, estos parámetros de evaluación muestran que el modelo se ajusta bien a la respuesta experimental, encontrándose valores de $R^2 > 0.84$, lo que indica un buen ajuste y valores de $Q^2 > 0.77$ indicando un buen poder predictivo.

Tabla 6.10: Evaluación del modelo PLS tras 2 PLS-componentes, segundo ensayo de producción de micotoxinas *in vitro*.

Parámetros del modelo	y-respuestas			Modelo total
	DON	3-ADON	15-ADON	
R^2	0.8717	0.8401	0.8624	0.8582
Q^2	0.8289	0.7777	0.8191	0.8072
Validez del modelo	0.8472	0.6606	0.8334	
Reproducibilidad	0.8553	0.8333	0.8458	

El modelo se validó utilizando un test de ANOVA el cual se presenta en la tabla B2 del anexo B. Se aprecia que la significancia del modelo de regresión, para cada una de las respuestas medidas, tiene un valor de $p < 0.000$ lo que indica que es un modelo satisfactorio y

significativo. La comparación del error del modelo con el error de réplicas arroja un valor de $p > 0.05$ que indica que el modelo no tiene falta de ajuste, y muestra por tanto un buen ajuste de los datos para las tres respuestas. Con esta validación estadística del modelo, se tienen garantías para interpretar los coeficientes de regresión obtenidos de dicho modelo.

En la tabla 6.11 se presentan los valores de los coeficientes de regresión del polinomio (b), estos coeficientes permiten conocer la relación existente entre cada variable y las respuestas. Como las variables usadas en el modelo tienen sus valores normalizados de -1 a $+1$, el impacto relativo de cada variable está directamente relacionado con el tamaño del coeficiente de regresión, esto quiere decir que mientras más grande el valor del coeficiente (ya sea positivo o negativo), esa variable tiene un mayor impacto sobre la respuesta [117]. En la tabla 6.11 se aprecia que, entre las variables individuales, la cantidad de agua adicionada tiene un mayor impacto en la producción de micotoxinas, y debido a que este coeficiente tiene signo positivo, se tiene que a mayor cantidad de agua se produce mayor cantidad de micotoxina como se aprecia en la figura 6.14. La T_{inc} tienen un impacto menor en la producción de DON y 3-ADON mientras que para 15-ADON su impacto no es estadísticamente significativo. También se observa que existe una interacción fuerte entre las variables temperatura de incubación y cantidad de agua ($T_{inc} \times \text{Agua}$), esta interacción tiene un mayor impacto sobre la producción de micotoxinas que las variables individuales debido al alto valor de su coeficiente de regresión.

Tabla 6.11: Coeficientes de regresión normalizados (b) para el modelo PLS, segundo ensayo de producción de micotoxinas *in vitro*.

Términos del polinomio	y_1	y_2	y_3
	DON	3-ADON	15-ADON
constante b_0	2.739 ± 0.063^a $p = 0.000^b$	5.317 ± 0.070 $p = 0.000$	4.216 ± 0.066 $p = 0.000$
$b_1 T_{inc}$	-0.137 ± 0.064 $p = 0.041$	-0.168 ± 0.071 $p = 0.024$	0.074 ± 0.067 $p = 0.278$
$b_3 \text{ Agua}$	0.531 ± 0.064 $p = 0.000$	0.522 ± 0.071 $p = 0.000$	0.556 ± 0.067 $p = 0.000$
$b_{13} T_{inc} \times \text{Agua}$	-0.773 ± 0.065 $p = 0.000$	-0.768 ± 0.072 $p = 0.000$	-0.750 ± 0.068 $p = 0.000$

^a Coeficientes de regresión normalizados \pm error estándar.

^b Valor de p para el coeficiente.

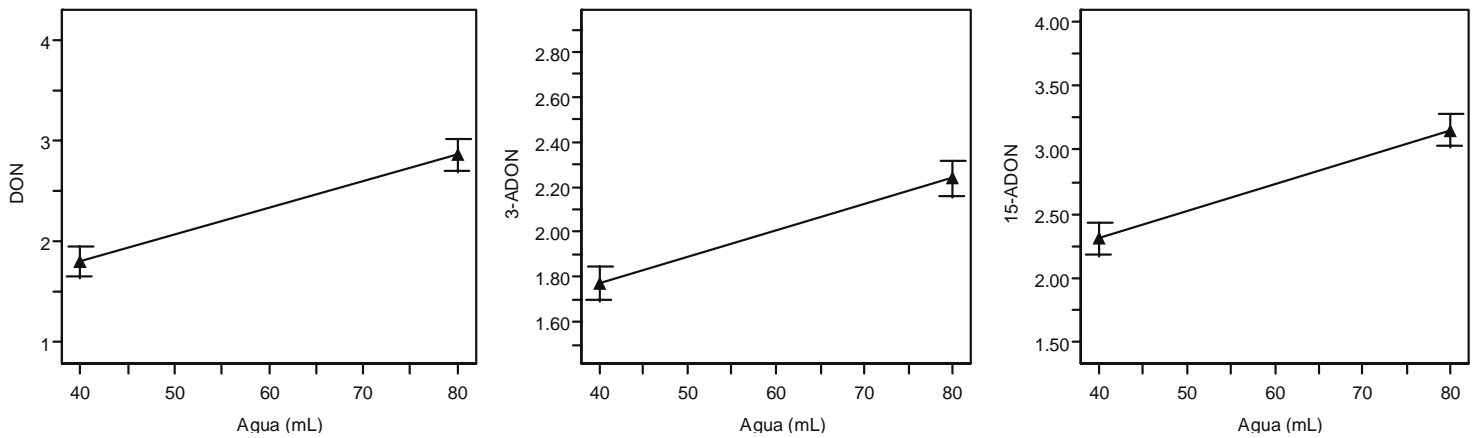


Figura 6.14: Efecto de la variable cantidad de agua sobre la producción de micotoxinas *in vitro*.

En la figura 6.15 se observa la interacción $T_{inc} \times \text{Agua}$, se aprecia que al aumentar la T_{inc} se genera un aumento en la producción de micotoxinas al utilizar menor cantidad de agua, y que al utilizar el nivel más alto de agua se produce una disminución en la producción de micotoxinas. Sin embargo, a pesar de esta disminución, se observa que la producción es mayor al utilizar mayor cantidad de agua. Además, se aprecia que esta diferencia de comportamiento se minimiza al utilizar una temperatura de incubación de 25 °C.

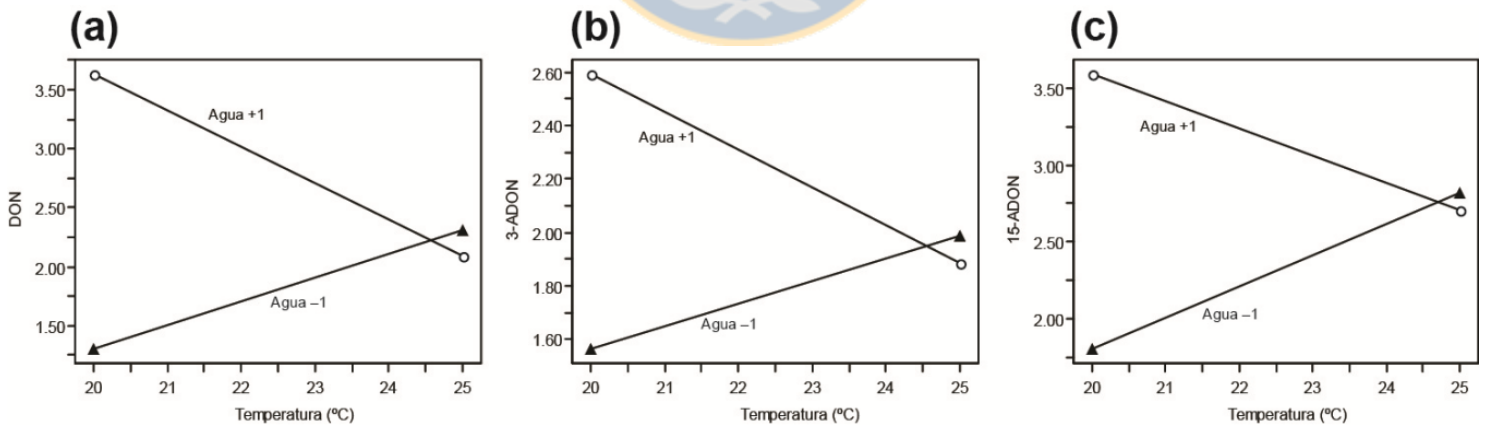


Figura 6.15: Gráficos de interacción T_{inc} vs. Agua. (a) DON, (b) 3-ADON, y (c) 15-ADON. (▲) 40 mL de agua, (○) 80 mL de agua.

En la figura 6.16 se presenta el gráfico de *loadings* en el cual se grafican todas las variables y las respuestas al mismo tiempo, mostrando así sus interrelaciones. Cuando una variable o interacción está lejos del origen del gráfico significa que tiene un gran impacto en la respuesta, y mientras más cerca del origen del gráfico menor es su impacto. Entre la variables estudiadas, T_{inc} tiene el menor impacto, mientras que la variable Agua y la interacción $T_{inc} \times \text{Agua}$ poseen las mayores influencias en las respuestas.

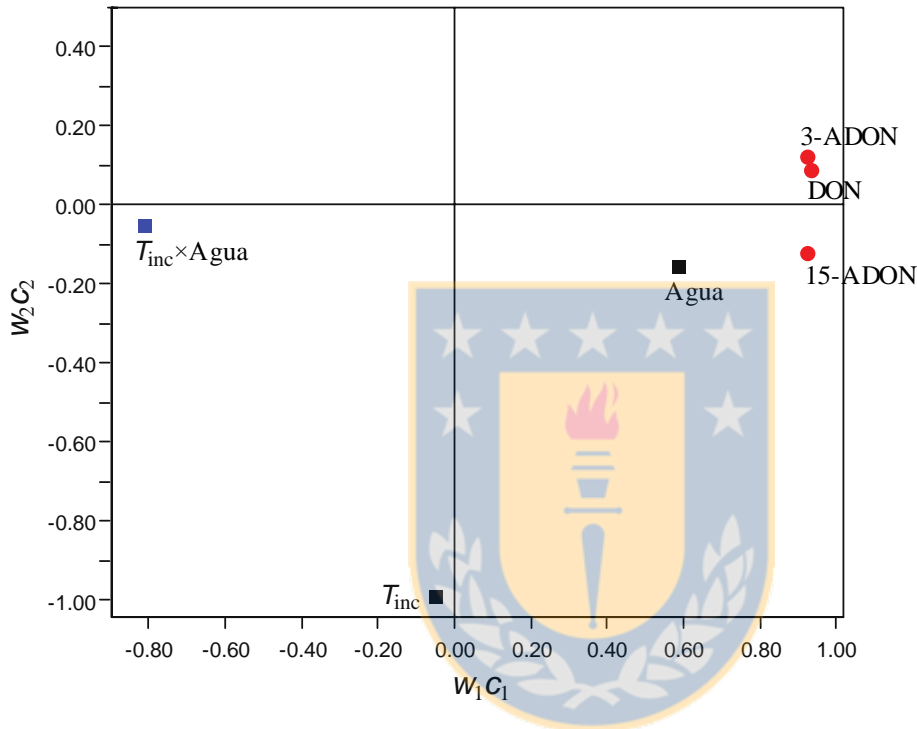


Figura 6.16: Gráfico de *loadings* del primer y segundo PLS-componente, segundo ensayo de producción de micotoxinas *in vitro*.

Para tener una mejor apreciación de la información que entrega el gráfico de *loadings*, se puede trazar una línea a partir de una respuesta pasando por el origen del gráfico. Luego, desde cada variable e interacción se traza una proyección perpendicular a esta línea (figura 6.17). Cuando la intersección de estas se aleja del origen del gráfico, más importante es esta variable para la respuesta evaluada. Se observa que para las tres micotoxinas el agua tiene un gran impacto en la producción de éstas y como se encuentra en el mismo cuadrante que las respuestas, está correlacionada positivamente, es decir, a mayor cantidad de agua mayor producción de micotoxinas. La interacción $T_{inc} \times \text{Agua}$ tiene un gran impacto en la producción de las tres micotoxinas y como se ubica en el cuadrante contrario a las respuestas presenta un coeficiente de regresión con signo negativo, esto se aprecia claramente en el gráfico de coeficientes (figura 6.18). La T_{inc} tiene un impacto menor en la producción de micotoxinas e

impacta de forma negativa la producción de DON y 3-ADON, es decir, a mayor T_{inc} se tiene una menor producción de estas toxinas. En el caso de 15-ADON esta variable tiene un impacto menor y se encuentra correlacionada positivamente. También se puede observar que DON, 3-ADON y 15-ADON se encuentran muy cercanas entre sí, lo cual indica que son respuestas fuertemente correlacionadas y por tanto debieran poseer similares perfiles de coeficientes, lo cual se puede corroborar al observar la figura 6.18.



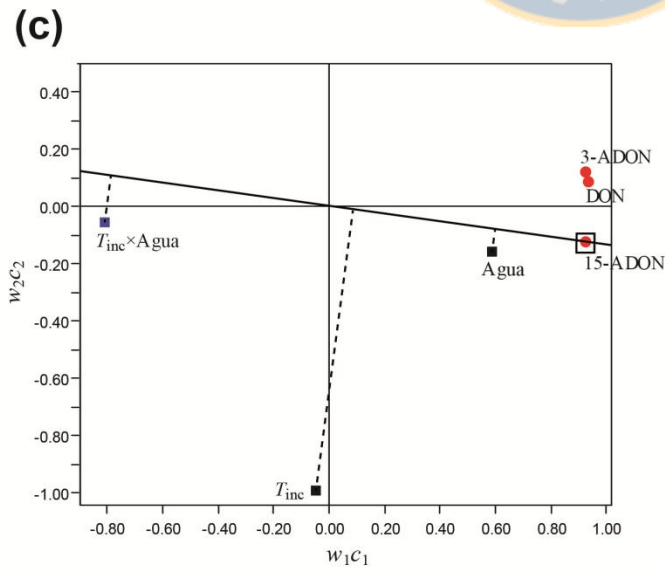
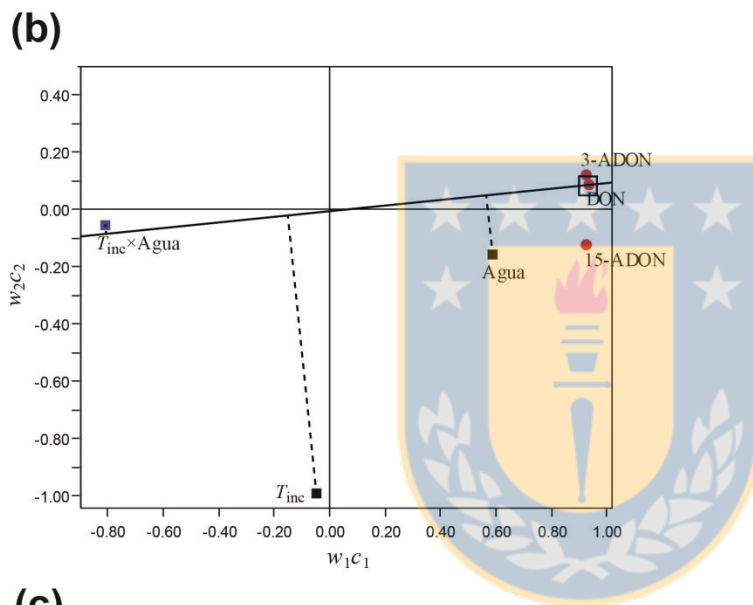
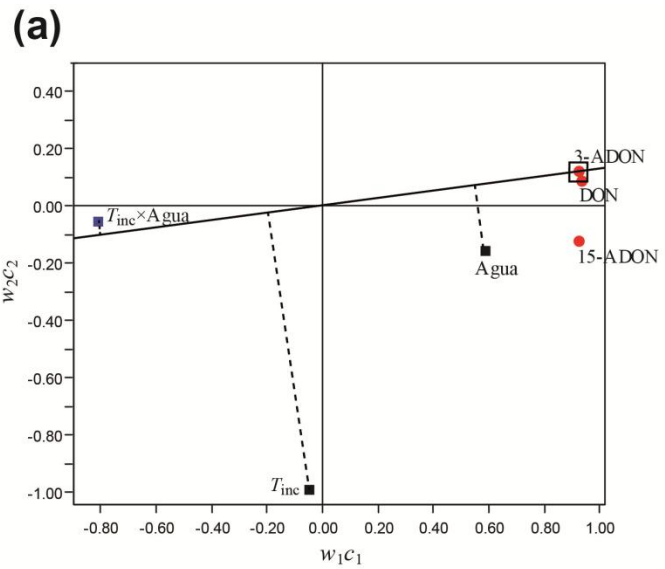


Figura 6.17: Gráfico de *loadings* del primer y segundo PLS-componente con proyecciones para las respuestas (a) 3-ADON; (b) DON; y (c) 15-ADON, segundo ensayo de producción de micotoxinas *in vitro*.

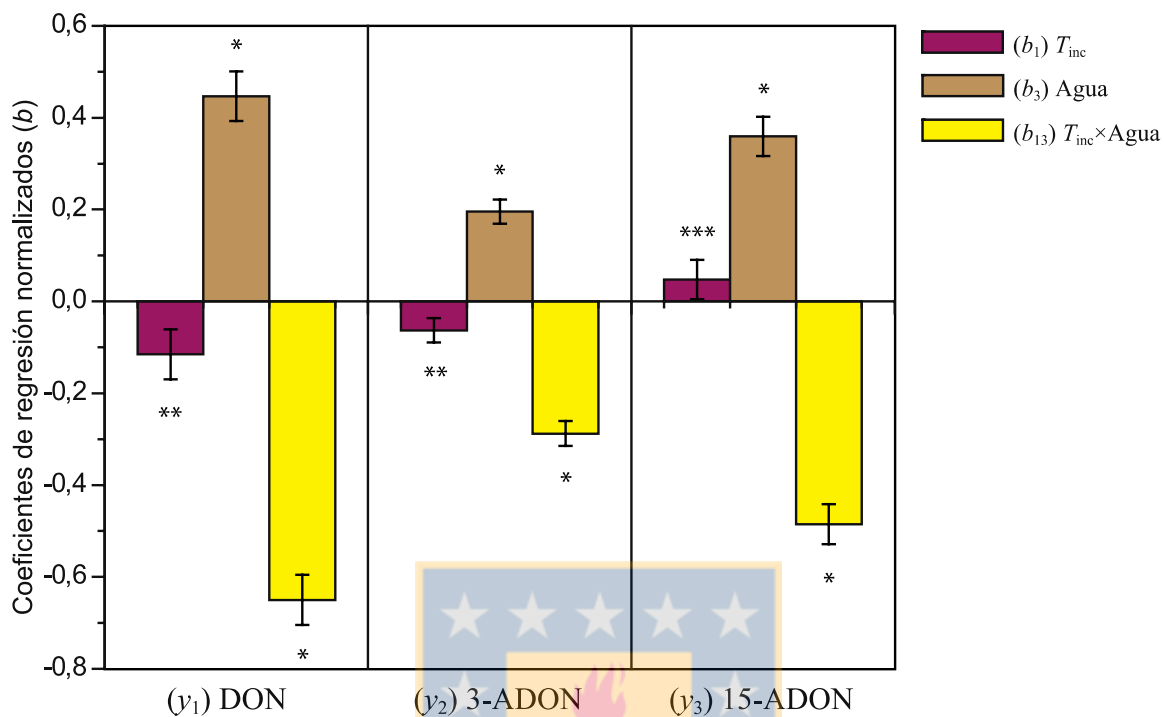


Figura 6.18: Gráfico de coeficientes de regresión normalizados (b) para el modelo PLS, segundo ensayo de producción de micotoxinas *in vitro*. (*) $p < 0,001$; (**) $p < 0,05$; y (***) $p > 0,05$.

Por tanto, dentro de las variables estudiadas, la variable cantidad de agua es la que tiene un mayor impacto en la producción de micotoxinas *in vitro*. La temperatura de incubación tiene un impacto menor en la producción de micotoxinas, sin embargo posee una interacción con la cantidad de agua y esta interacción entre variables $T_{inc} \times \text{Agua}$ influye significativamente en la producción de micotoxinas *in vitro*.

6.4.3. Tercer ensayo

Debido a la gran dispersión de los resultados obtenidos en las réplicas de cada condición ensayada, se decidió realizar un tercer ensayo para evaluar si al modificar la forma de contaminar el arroz se logra mayor homogeneidad. Para esto, se molió y homogeneizó completamente el medio PDA que contiene la colonia del aislamiento FUS 2013-7 de siete días de crecimiento. Luego, se tomó una porción de este homogeneizado y se contaminó el medio de arroz. Es importante destacar que la porción del homogeneizado utilizada para realizar la contaminación es equivalente al volumen ocupado por los 10 discos de la colonia en medio PDA empleados en los ensayos anteriores.

Se planificó un diseño factorial completo (FFD) de tres variables a dos niveles. Las variables estudiadas y las respuestas medidas son las mismas que se evaluaron en el segundo ensayo de producción de micotoxinas *in vitro*. Es decir, se midió como respuesta la concentración de y_1 DON, y_2 3-ADON y y_3 15-ADON en $\mu\text{g kg}^{-1}$ y se estudiaron las variables: x_1 temperatura de incubación (T_{inc}), x_2 tiempo de incubación (t_{inc}) y x_3 cantidad de agua adicionada (Agua) como se señala en la tabla 6.12. Como se estudiaron tres variables experimentales a dos niveles, el diseño debería estar compuesto por $2^3 = 8$ experimentos, sin embargo, se realizaron cuatro réplicas por cada experimento lo que genera un total de 32 experimentos los que se detallan en la tabla B3 del anexo B.

Tabla 6.12: Variables estudiadas en el diseño experimental de tipo factorial completo de dos niveles (2^3), tercer ensayo de producción de micotoxinas *in vitro*.

Variables	Niveles	
	-1	+1
x_1 Temperatura de incubación (°C)	20	25
x_2 Tiempo de incubación (semanas)	3	4
x_3 Cantidad de agua (mL)	40	80

Los resultados obtenidos se presentan en las tablas 6.13 a la 6.15. Se aprecia que, en general, los datos presentan menor dispersión (RSD) que los obtenidos en el segundo ensayo. Sin embargo, se observa una diferencia importante respecto al segundo ensayo, ya que en general se produce una menor cantidad de micotoxinas, especialmente en las condiciones que utilizan 80 mL de agua. Esto se aprecia claramente en los resultados obtenidos para 3-ADON donde no se detectó esta micotoxina en ninguna de las condiciones que utilizan 80 mL de agua. Estas diferencias en la cantidad de micotoxinas producidas se puede deber a la modificación que se realizó en la forma de contaminar el arroz, ya que tal vez se produjo un efecto de dilución al moler todo el medio de PDA con el hongo y luego tomar una porción de este homogeneizado. De esta forma, el número de conidias agregadas tal vez fue inferior al número de conidias

adicionadas utilizando la modalidad de discos conteniendo el hongo. Sin embargo, a pesar de estas diferencias en cuanto a cantidad de micotoxinas producidas, se mantiene la tendencia de producción de micotoxinas observada en el segundo ensayo, esto es: 15-ADON > DON > 3-ADON lo que confirma que el aislamiento FUS 2013-7 pertenece al quimiotipo 15-ADON, ya que esta es la micotoxina que produce en mayor cantidad.



Tabla 6.13: Cantidad de deoxinivalenol producido por el aislamiento FUS 2013-7 en el tercer ensayo de producción de micotoxinas *in vitro*.

Réplica	Concentración de DON ($\mu\text{g kg}^{-1}$)							
	20/ 3/ 40 ^a	20/ 3/ 80	20/ 4/ 40	20/ 4/ 80	25/ 3/ 40	25/ 3/ 80	25/ 4/ 40	25/ 4/ 80
1	43.6	nd	64.7	42.8	38.0	nd	58.7	nd
2	100.4	nd	72.9	37.4	42.9	nd	71.9	nd
3	454.8	nd	73.8	nd	42.5	nd	44.6	nd
4	48.2	nd	44.9	nd	47.1	nd	39.3	53.0
Promedio	161.7		64.1	40.1	42.6		53.6	53.0
SD	197.1		13.4	3.8	3.7		14.6	
RSD	121.9		20.9	9.5	8.7		27.3	

^a: Condiciones del ensayo denominadas según temperatura (°C)/ tiempo de incubación (semanas)/ cantidad de agua adicionada (mL).

^b: No detectado.

Tabla 6.14: Cantidad de 3-acetildeoxinivalenol producido por el aislamiento FUS 2013-7 en el tercer ensayo de producción de micotoxinas *in vitro*.

Réplica	Concentración de 3-ADON ($\mu\text{g kg}^{-1}$)							
	20/ 3/ 40 ^a	20/ 3/ 80	20/ 4/ 40	20/ 4/ 80	25/ 3/ 40	25/ 3/ 80	25/ 4/ 40	25/ 4/ 80
1	37.7	nd	43.6	nd	35.7	nd	41.3	nd
2	54.4	nd	44.1	nd	37.5	nd	37.4	nd
3	75.4	nd	43.0	nd	35.6	nd	36.5	nd
4	39.2	nd	36.4	nd	38.9	nd	nd	nd
Promedio	51.7		41.8		36.9		38.4	
SD	17.5		3.6		1.6		2.5	
RSD	33.9		8.6		4.3		6.6	

^a: Condiciones del ensayo denominadas según temperatura (°C)/ tiempo de incubación (semanas)/ cantidad de agua adicionada (mL).

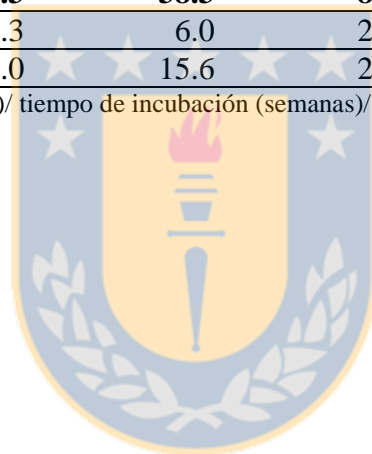
^b: No detectado.

Tabla 6.15: Cantidad de 15-acetildeoxinivalenol producido por el aislamiento FUS 2013-7 en el tercer ensayo de producción de micotoxinas *in vitro*.

Réplica	Concentración de 15-ADON ($\mu\text{g kg}^{-1}$)							
	20/ 3/ 40 ^a	20/ 3/ 80	20/ 4/ 40	20/ 4/ 80	25/ 3/ 40	25/ 3/ 80	25/ 4/ 40	25/ 4/ 80
1	102.1	33.6	170.0	35.1	66.3	52.2	162.0	43.6
2	302.2	nd	165.8	35.0	94.3	40.9	76.5	67.6
3	704.2	34.3	153.3	35.8	59.7	40.2	98.2	42.1
4	122.7	35.9	108.2	47.2	103.3	42.2	56.4	58.9
Promedio	307.8	34.6	149.3	38.3	80.9	43.9	98.3	53.0
SD	279.1	1.1	28.3	6.0	21.1	5.6	45.8	12.3
RSD	90.7	3.3	19.0	15.6	26.1	12.8	46.6	23.2

^a: Condiciones del ensayo denominadas según temperatura (°C)/ tiempo de incubación (semanas)/ cantidad de agua adicionada (mL).

^b: No detectado.



La relación existente entre las variables estudiadas y las respuestas medidas se modeló utilizando regresión por cuadrados parciales mínimos (PLSR), obteniéndose la ecuación 2 que describe el comportamiento del sistema en estudio.

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 \quad (2)$$

El modelo obtenido, tras una refinación de los datos, presenta buenas características. En la tabla 6.16 se aprecia que el modelo total tiene un valor de $R^2 = 0.8440$ y un valor de $Q^2 = 0.7252$ lo que indica que el modelo se ajusta bien a la respuesta experimental y tiene un buen poder predictivo. Los valores de validación del modelo son superiores a 0.25 y se tiene un buen control del error experimental, ya que los valores de reproducibilidad son superiores a 0.5.

Tabla 6.16: Evaluación del modelo PLS tras 3 PLS-componentes, tercer ensayo de producción de micotoxinas *in vitro*.

Parámetros del modelo	y-respuestas			Modelo total
	DON	3-ADON	15-ADON	
R^2	0.8368	0.9305	0.7642	0.8440
Q^2	0.7002	0.8654	0.6204	0.7252
Validez del modelo	0.5144	0.5488	0.7377	
Reproducibilidad	0.8040	0.9168	0.7041	

En la tabla B4 del anexo B, se presenta el test de ANOVA que confirma la validez del modelo. Se observa que la significancia del modelo de regresión tiene un valor de $p < 0.000$ lo que indica que es un modelo satisfactorio y significativo. También se aprecia que el modelo no tiene falta de ajuste ya que la comparación del error del modelo con el error de réplicas arroja un valor de $p > 0.05$. Por tanto, el modelo es apropiado para obtener información de cuáles son las variables que tienen mayor influencia en la producción de micotoxinas *in vitro* y determinar si existen interacciones significativas entre las variables.

Tabla 6.17: Coeficientes de regresión normalizados (*b*) para el modelo PLS, tercer ensayo de producción de micotoxinas *in vitro*.

Términos del polinomio	y_1 DON	y_2 3-ADON	y_3 15-ADON
constante b_0	0.600 ± 0.076^a $p = 0.000^b$	0.909 ± 0.051 $p = 0.000$	5.917 ± 0.094 $p = 0.000$
$b_1 T_{inc}$	-0.007 ± 0.077 $p = 0.931$	-0.128 ± 0.052 $p = 0.021$	-0.190 ± 0.096 $p = 0.058$
$b_2 t_{inc}$	0.309 ± 0.077 $p = 0.000$	-0.051 ± 0.052 $p = 0.336$	-0.017 ± 0.096 $p = 0.857$
$b_3 \text{ Agua}$	-0.753 ± 0.077 $p = 0.000$	-0.936 ± 0.052 $p = 0.000$	-0.764 ± 0.096 $p = 0.000$
$b_{12} T_{inc} \times t_{inc}$	0.076 ± 0.078 $p = 0.340$	0.035 ± 0.053 $p = 0.513$	0.107 ± 0.097 $p = 0.281$
$b_{13} T_{inc} \times \text{Agua}$	0.131 ± 0.078 $p = 0.106$	0.109 ± 0.053 $p = 0.050$	0.367 ± 0.097 $p = 0.001$
$b_{23} t_{inc} \times \text{Agua}$	0.341 ± 0.078 $p = 0.000$	0.056 ± 0.053 $p = 0.296$	0.107 ± 0.097 $p = 0.282$

^a Coeficientes de regresión normalizados \pm error estándar.

^b Valor de p para el coeficiente.

Los coeficientes de regresión y sus significancias estadísticas se detallan en la tabla 6.17 y se aprecian visualmente en el gráfico de coeficientes presentado en la figura 6.19. Se observa que el agua es la variable que tiene el mayor impacto en la producción de micotoxinas. La temperatura de incubación (T_{inc}) sólo tiene un efecto significativo en la producción de 3-ADON y, el tiempo de incubación (t_{inc}) sólo tiene un impacto significativo en la producción de DON. En este gráfico también se observa la presencia de interacciones entre las variables que afectan significativamente la producción de micotoxinas *in vitro*. El detalle del efecto de las variables individuales en la producción de cada micotoxina se aprecia en la figura 6.20. En esta figura, se observa claramente que al aumentar el tiempo de incubación de tres a cuatro semanas se produce un aumento en la producción de DON, mientras que la producción de 3-ADON se ve disminuida. Esta disminución en la cantidad de 3-ADON se puede deber a la transformación de este derivado acetilado en DON (producto final de la biosíntesis), lo que explicaría el aumento en la cantidad de esta micotoxina al aumentar el tiempo de incubación [44, 118]. Por otra parte, no se observan cambios en la cantidad de 15-ADON al aumentar el tiempo de incubación en el rango estudiado. Al graficar el efecto de la T_{inc} se observa que al aumentar de 20 a 25 °C la T_{inc} no se genera diferencia en la cantidad de DON producido, pero si se observa una disminución en la cantidad de 3-ADON y 15-ADON, produciéndose una mayor cantidad de estas micotoxinas a una menor T_{inc} . Esto concuerda con lo reportado por Llorens et al. quien señala una T_{inc} óptima de 15 °C para 3-ADON [119]. Finalmente, al

graficar el efecto de la cantidad de agua adicionada, se observa que esta variable afecta de igual forma a las tres micotoxinas, teniendo un efecto inversamente proporcional en la producción de micotoxinas lo que se ve reflejado en el signo negativo de su coeficiente de regresión.

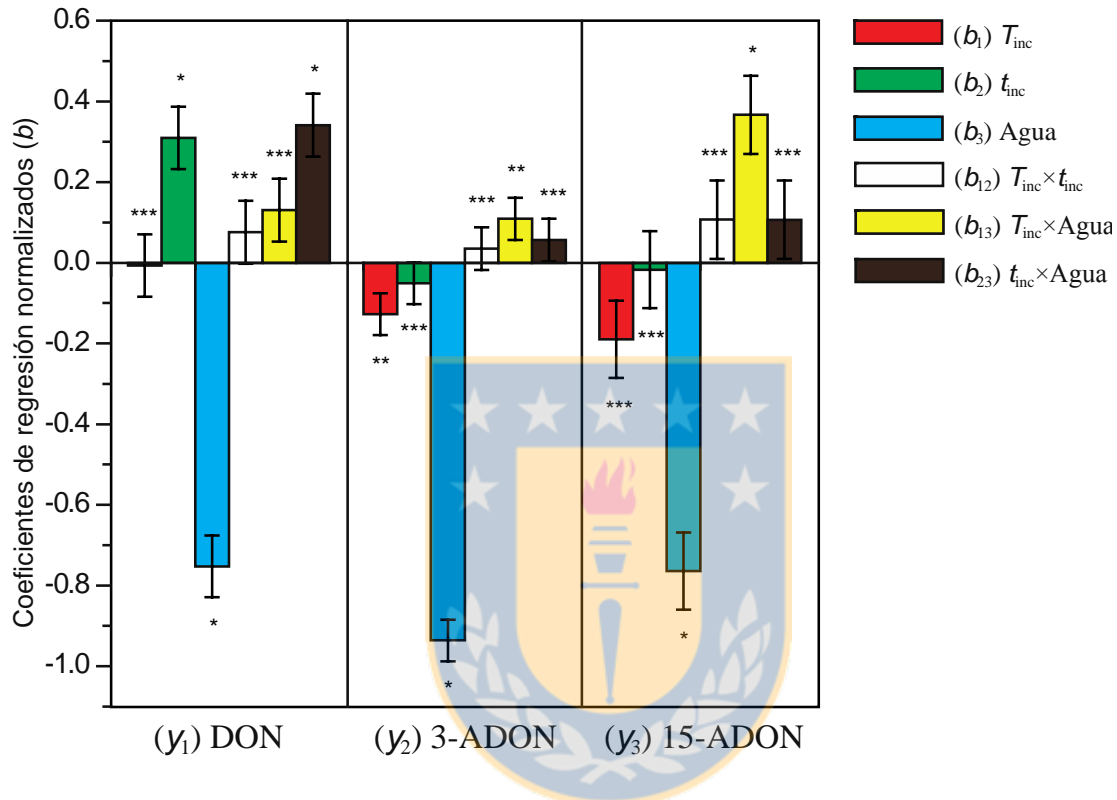


Figura 6.19: Gráfico de coeficientes de regresión normalizados (b) para el modelo PLS, tercer ensayo de producción de micotoxinas *in vitro*. (*) $p < 0,001$; (**) $p < 0,05$; y (***) $p > 0,05$.

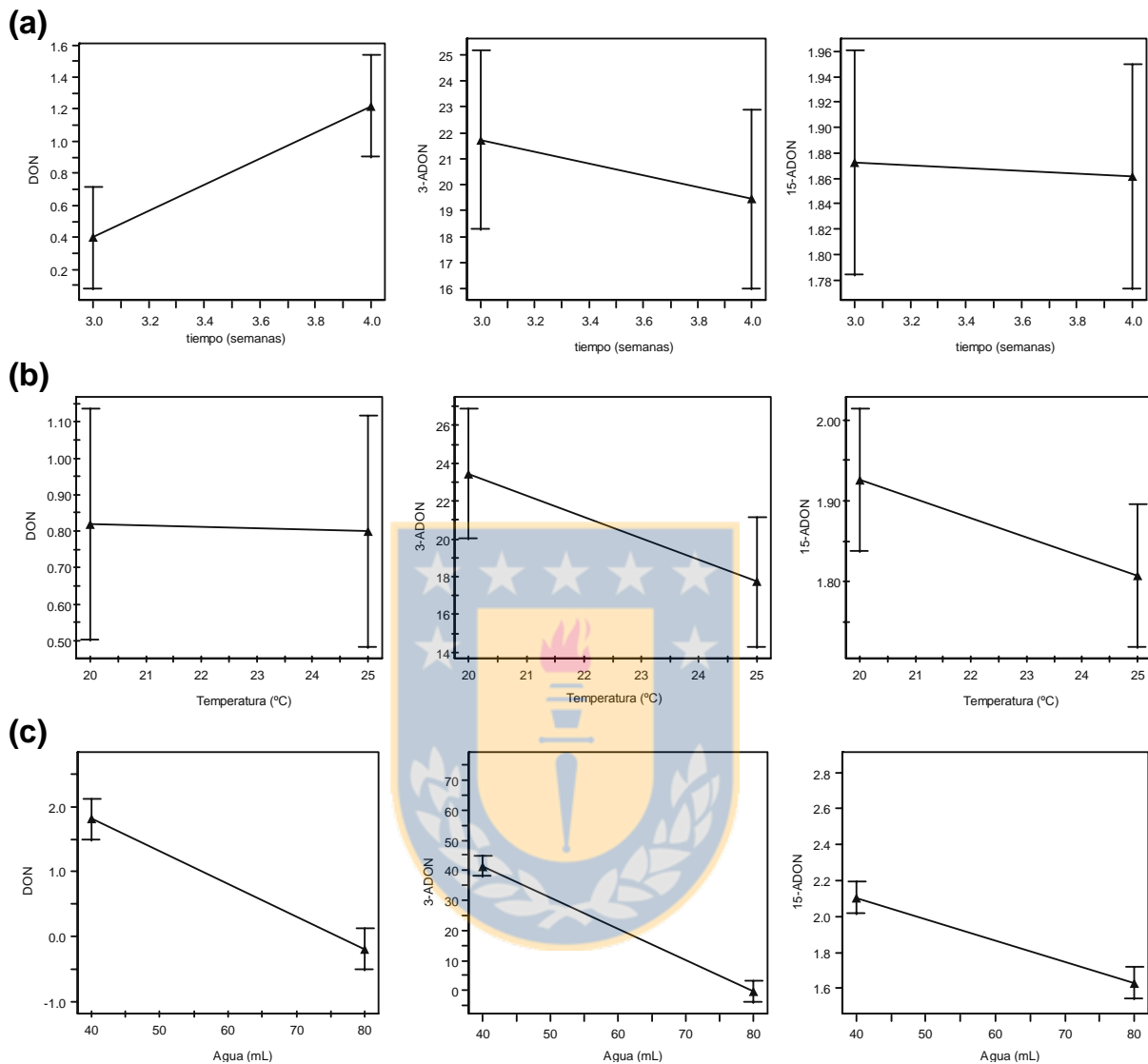


Figura 6.20: Gráficos de efectos principales sobre la producción de micotoxinas *in vitro*. (a) Efecto del tiempo de incubación; (b) efecto de la temperatura de incubación; y (c) efecto de la cantidad de agua.

En el gráfico de *loadings* (figura 6.21) se observa que las micotoxinas 15-ADON y 3-ADON se encuentran muy cercanas entre sí, mientras que la micotoxina DON se encuentra más alejada. Esto explicaría la diferencia observada en el impacto de algunas variables, a diferencia de lo observado en el segundo ensayo de producción de micotoxinas *in vitro*, donde las tres micotoxinas se encontraban agrupadas y se veían afectadas de la misma forma por las variables e interacciones que eran significativas.

Al observar la figura 6.21, se aprecia la similitud en el impacto de las variables sobre la producción de 15-ADON y 3-ADON (25.a y 25.b). Se observa que la interacción $T_{inc} \times \text{Agua}$ tiene un gran impacto sobre la producción de los derivados acetilados, no así en la producción de DON ya que el intercepto de su proyección se encuentra muy cerca del origen del gráfico (figura 6.21.c). La variable agua tiene un gran impacto en la producción de las tres micotoxinas ya que en todos los gráficos es la variable que se encuentra más alejada del origen del gráfico, y su ubicación en el cuadrante opuesto a las respuestas señala que al aumentar la cantidad de agua disminuye la producción de micotoxinas. Se observa que la variable t_{inc} afecta de manera importante y directamente proporcional la producción de DON, pero no la producción de 3 y 15-ADON. Este aumento en la cantidad de DON producido al aumentar el tiempo de incubación es frecuentemente reportado en literatura [120-122]. La producción de DON también se ve fuertemente impactada por la interacción $t_{inc} \times \text{Agua}$ lo que no ocurre en la producción de 3 y 15-ADON ya que el intercepto de su proyección se encuentra prácticamente en el origen del gráfico.



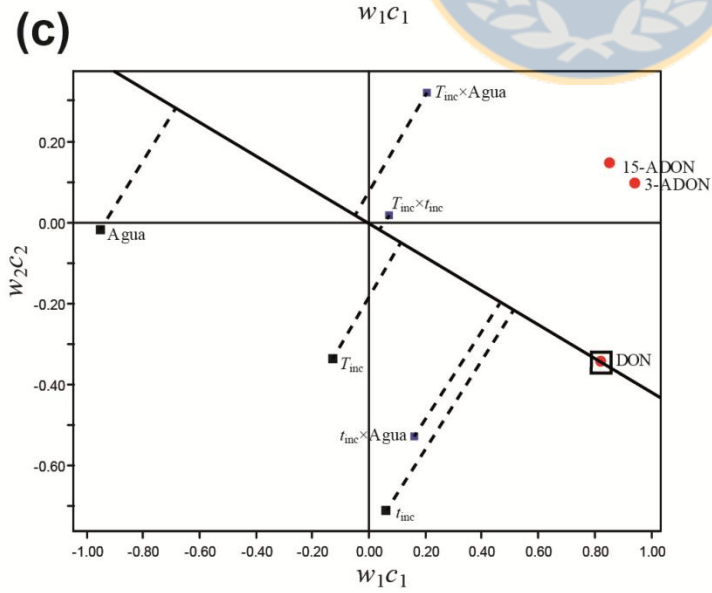
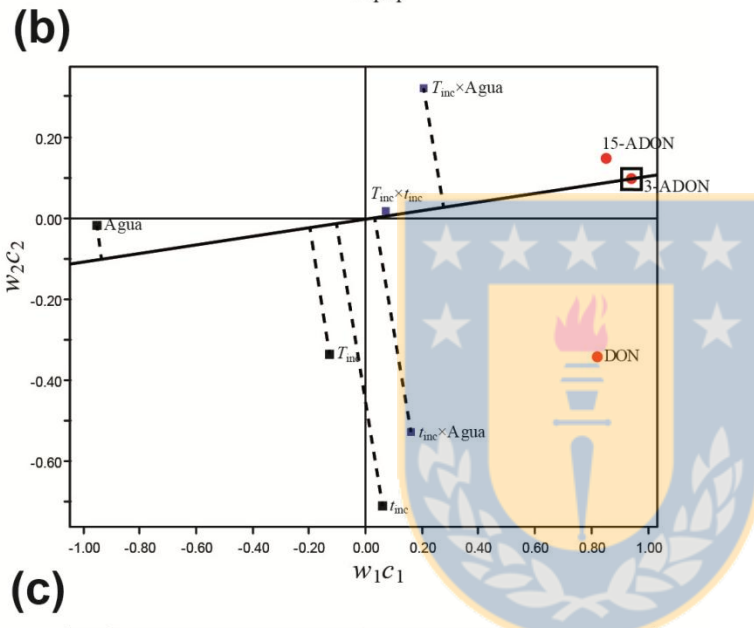
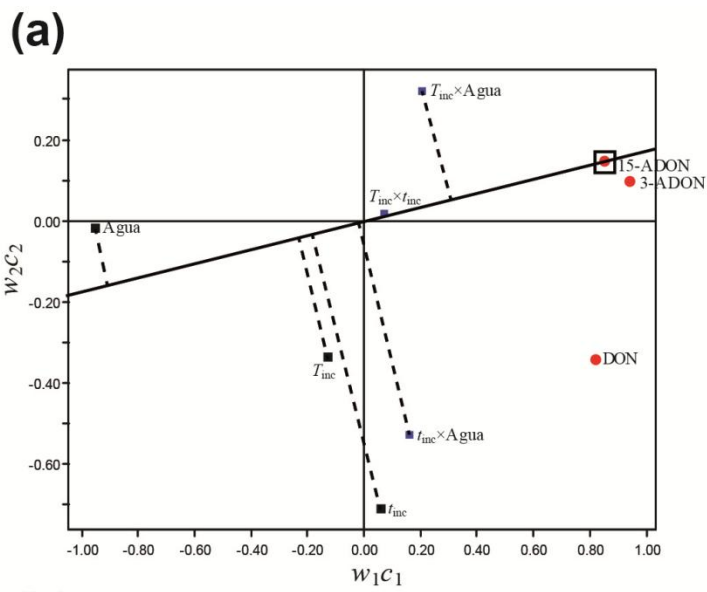


Figura 6.21: Gráfico de *loadings* del primer y segundo PLS-componente con proyecciones para las respuestas (a) 15-ADON; (b) 3-ADON; y (c) DON.

Por tanto, este tercer ensayo confirma que la cantidad de agua adicionada al medio de arroz y la interacción $T_{inc} \times \text{Agua}$, tienen un impacto significativo en la producción de micotoxinas *in vitro*. Además de señalar que el tiempo de incubación y la interacción $t_{inc} \times \text{Agua}$ influyen significativamente en la producción de DON. Estos resultados concuerdan con lo reportado en literatura donde varios estudios señalan que la actividad de agua, temperatura y tiempo de incubación, y las interacciones entre estas variables tienen un efecto significativo sobre la producción de DON y otros tricotecenos producidos por hongos pertenecientes al género *Fusarium* [120, 122-125].

6.4.4. Confirmación de la identidad de las micotoxinas producidas

En la figura 6.22 se observa uno de los cromatogramas obtenidos en los ensayos de producción de micotoxinas *in vitro*. Se observa un pequeño pico en el tiempo de retención del nivalenol, razón por la cual se analizó la muestra por cromatografía de gas con detector de masas (GC-MS/MS). De esta manera, se puede confirmar la identidad de las micotoxinas DON, 3-ADON y 15-ADON analizadas mediante GC-ECD. Además de discriminar si ese pequeño pico que se observa en la muestra es nivalenol o corresponde a otro compuesto. La muestra se derivatizó siguiendo el procedimiento empleado para el análisis mediante GC-ECD. Las condiciones cromatográficas relacionadas al GC fueron las descritas en la sección 5.3.3, a excepción del gas de arrastre que en este caso fue helio. La muestra se analizó en modo scan y modo MRM (Monitorización de Reacción Múltiple) según el procedimiento descrito por Rodríguez-Carrasco et al. [96]. En la tabla 6.18 se presentan las transiciones utilizadas para el análisis en modo MRM.

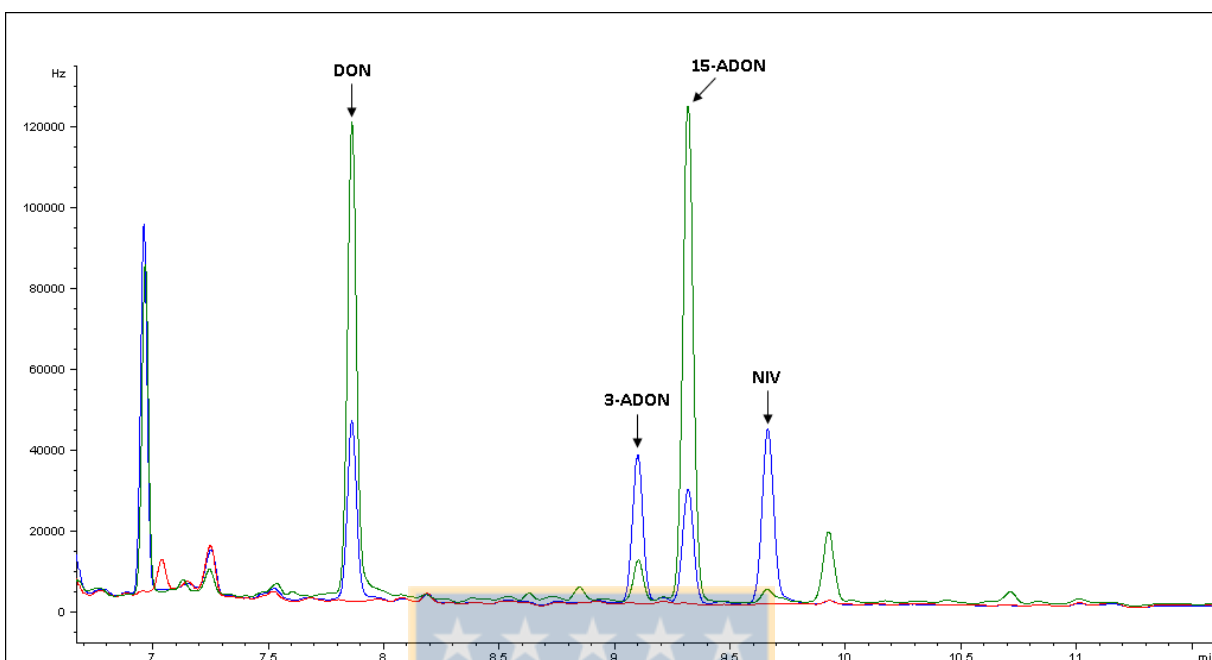


Figura 6.22: Cromatograma ensayo producción de micotoxinas *in vitro* incubación a 20 °C, 3 semanas, 40 mL de agua. Línea roja: blanco de arroz. Línea verde: muestra de arroz contaminado. Línea azul: arroz sobrecargado con TCTB 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

Tabla 6.18: Transiciones utilizadas para el análisis en modo MRM.

Micotoxina	MRM ₁ cuantificador	MRM ₂ cualificador
DON	392 > 259	407 > 197
3-ADON	392 > 287	467 > 147
15-ADON	392 > 287	467 > 147
NIV	289 > 73	379 > 73
ZEA	462 > 151	462 > 333

Los resultados obtenidos, tanto en modo scan como en modo MRM, permitieron confirmar la presencia de DON, 3-ADON y 15-ADON en la muestra de arroz contaminado con el aislamiento FUS 2013-7. Los resultados también permiten descartar la presencia de NIV en la muestra, como se aprecia en la figura 6.23. Por tanto, el pico observado en el cromatograma obtenido con GC-ECD en el tiempo de retención de NIV, puede corresponder a otro compuesto producido por el hongo, ya que en el blanco de arroz incubado bajo las mismas condiciones no se observa el compuesto. Además, este pico sólo se observó en algunas condiciones de incubación.

También se investigó la presencia de zearalenona (ZEA) en la muestra de arroz. Esta micotoxina no se evaluó utilizando la metodología de GC-ECD porque, a pesar de ser derivatizada con el reactivo de derivatización utilizado, el detector de captura de electrones (ECD) no es capaz de detectar este analito. Los cromatogramas en modo MRM indican la presencia de ZEA en la muestra de arroz, lo cual se confirmó comparando el espectro de masas de la muestra con el espectro de masas de un estándar de ZEA (figura 6.24).



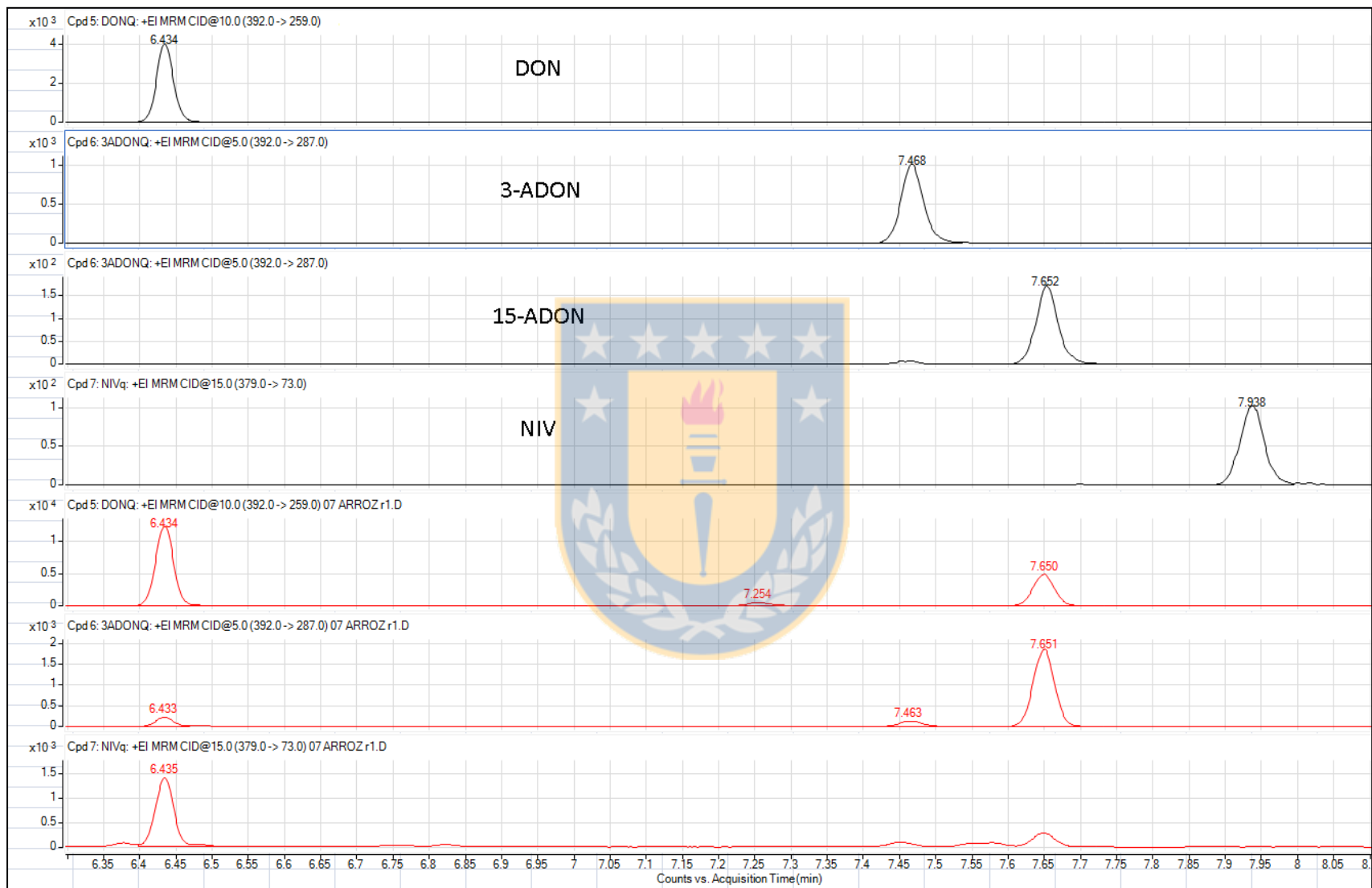


Figura 6.23: Cromatogramas de estándar de TCTB y muestra de arroz en modo MRM. Línea negra: estándar de DON, 3-ADON, 15-ADON y NIV $500 \mu\text{g kg}^{-1}$ cada uno. Línea roja: muestra de arroz incubada a 20°C , 3 semanas, 40 mL de agua.

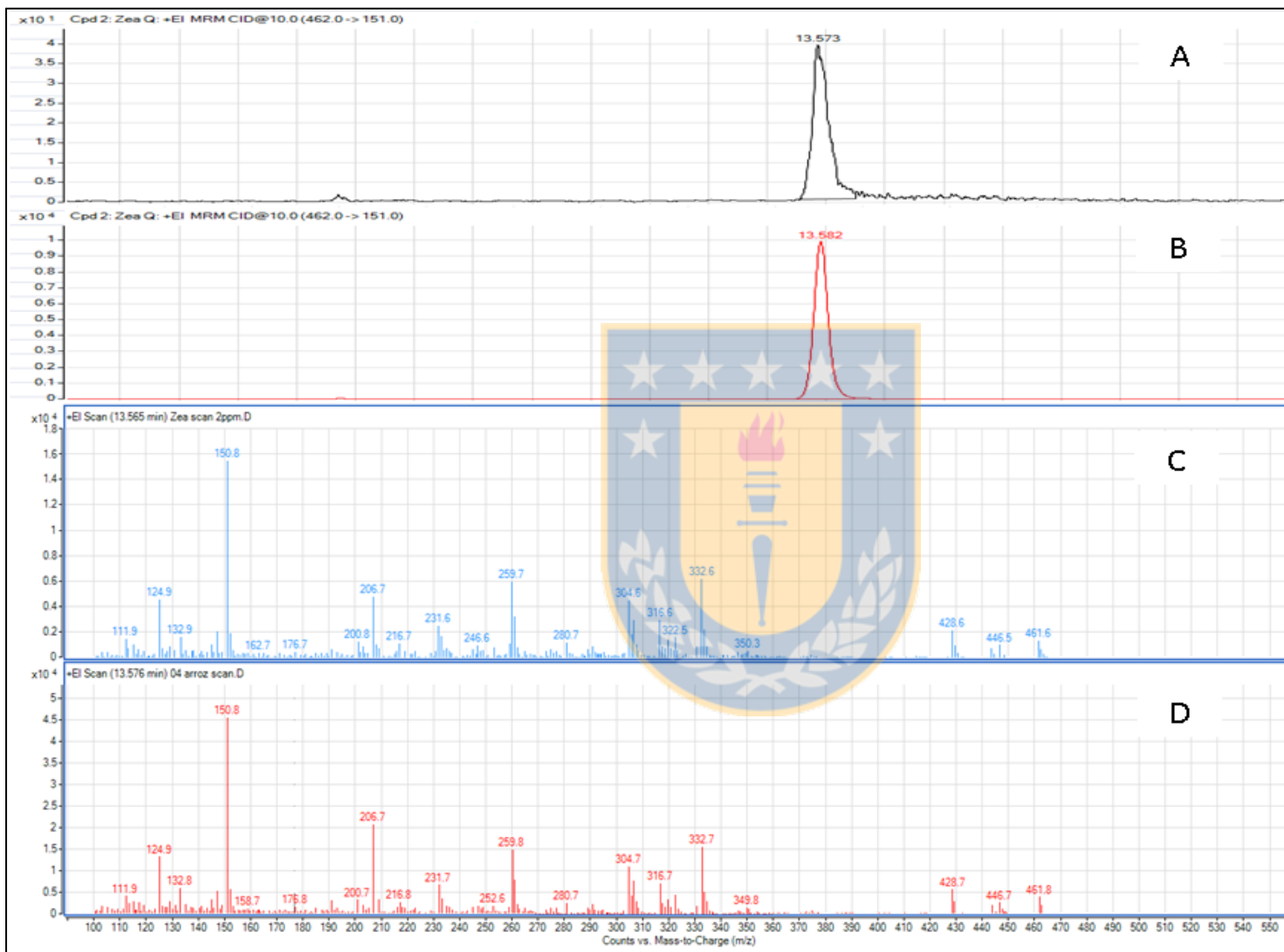


Figura 6.24: Detección de ZEA en muestra ensayo producción de micotoxinas *in vitro* incubada a 20 °C, 3 semanas, 40 mL agua. Cromatogramas en modo MRM: A) estándar ZEA 2 $\mu\text{g g}^{-1}$, B) muestra de arroz. Espectros de masas: C) estándar de ZEA, D) muestra de arroz.

7. Conclusiones

Los resultados expuestos permiten alcanzar las siguientes conclusiones:

1. Mediante la observación de características morfológicas e identificación molecular, se ha identificado al hongo *Fusarium graminearum* como agente causal del episodio de fusariosis de la espiga observado en trigo candeal cultivado en la provincia de Ñuble, Región del Bio Bio, durante el ciclo agrícola 2012/13.
2. La metodología analítica implementada utilizando cromatografía de gas con detector de captura de electrones, demostró ser efectiva para la cuantificación de deoxinivalenol, 3-acetildeoxinivalenol y 15-acetildeoxinivalenol en trigo.
3. El método analítico implementado presenta un bajo porcentaje de recuperación para la micotoxina nivalenol. Por tanto, ésta metodología sólo es adecuada para investigar la presencia de esta micotoxina en muestras de trigo, es decir para el análisis cualitativo de NIV.
4. Los ensayos desarrollados, *in vitro*, utilizando un medio de cultivo de arroz, demuestran que el aislamiento de *Fusarium graminearum*, tiene la capacidad de producir micotoxinas bajo las condiciones ensayadas. Además, el perfil micotoxigénico presentado por el aislamiento permite su clasificación en el quimiotipo 15-ADON.
5. La cantidad de agua adicionada al medio de arroz y la interacción entre la temperatura de incubación y la cantidad de agua adicionada ($T_{inc} \times \text{Agua}$) son los factores que tienen mayor influencia en la producción de micotoxinas *in vitro*.

8. Referencias

1. Summerell, B.A. and J.F. Leslie, Fifty years of Fusarium: how could nine species have ever been enough? *Fungal Diversity*, 2011. **50**(1): p. 135-144.
2. Nelson, P.E., M.C. Dignani, and E.J. Anaissie, Taxonomy, biology, and clinical aspects of Fusarium species. *Clinical Microbiology Reviews*, 1994. **7**(4): p. 479.
3. Leslie, J.F., B.A. Summerell, and S. Bullock, *The Fusarium laboratory manual*. Vol. 2. 2006: Wiley Online Library.
4. Summerell, B.A., B. Salleh, and J.F. Leslie, A utilitarian approach to Fusarium identification. *Plant disease*, 2003. **87**(2): p. 117.
5. Gong, L., Y. Jiang, and F. Chen, Molecular strategies for detection and quantification of mycotoxin-producing Fusarium species: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2014.
6. Mishra, P.K., R.T. Fox, and A. Culham, Development of a PCR-based assay for rapid and reliable identification of pathogenic Fusaria. *FEMS Microbiology Letters*, 2003. **218**(2): p. 329-332.
7. Lin, Z., et al., Species-Specific Detection and Identification of Fusarium Species Complex, the Causal Agent of Sugarcane Pokkah Boeng in China. 2014.
8. Llorens, A., et al., Characterization of Fusarium spp. isolates by PCR-RFLP analysis of the intergenic spacer region of the rRNA gene (rDNA). *International journal of food microbiology*, 2006. **106**(3): p. 297-306.
9. Sampietro, D.A., et al., A molecular based strategy for rapid diagnosis of toxigenic Fusarium species associated to cereal grains from Argentina. *Fungal biology*, 2010. **114**(1): p. 74-81.
10. Jurado, M., et al., PCR detection assays for the trichothecene-producing species Fusarium graminearum, Fusarium culmorum, Fusarium poae, Fusarium equiseti and Fusarium sporotrichioides. *Systematic and Applied Microbiology*, 2005. **28**(6): p. 562-568.
11. Yin, Y., et al., Characterization of sterol demethylation inhibitor-resistant isolates of Fusarium asiaticum and F. graminearum collected from wheat in China. *Phytopathology*, 2009. **99**(5): p. 487-497.
12. Kristensen, R., et al., Phylogeny and toxigenic potential is correlated in Fusarium species as revealed by partial translation elongation factor 1 alpha gene sequences. *Mycological research*, 2005. **109**(02): p. 173-186.
13. O'Donnell, K., et al., Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1998. **95**(5): p. 2044-2049.
14. Seifert, K.A. and C.A. Levesque, Phylogeny and molecular diagnosis of mycotoxigenic fungi, in Molecular Diversity and PCR-detection of Toxigenic Fusarium Species and Ochratoxigenic Fungi. 2004, *Springer*. p. 449-471.
15. Aoki, T. and K. O'Donnell, Morphological and molecular characterization of Fusarium pseudograminearum sp. nov., formerly recognized as the Group 1 population of F. graminearum. *Mycologia*, 1999: p. 597-609.
16. Rahjoo, V., et al., Morphological and molecular identification of Fusarium isolated from maize ears in Iran. *Journal of Plant Pathology*, 2008: p. 463-468.
17. Champeil, A., T. Dore, and J. Fourbet, Fusarium head blight: epidemiological origin of the effects of cultural practices on head blight attacks and the production of mycotoxins by Fusarium in wheat grains. *Plant Science*, 2004. **166**(6): p. 1389-1415.
18. Mazzilli, S., C. Pérez, and O. Ernst, Fusariosis de la espiga en trigo: características de la enfermedad y posibilidades de uso de modelos de predicción para optimizar el control químico. *Agrociencia*, 2007. **11**(1): p. 11-21.

19. Osborne, L.E. and J.M. Stein, Epidemiology of Fusarium head blight on small-grain cereals. *International journal of food microbiology*, 2007. **119**(1): p. 103-108.
20. Schmale III, D.G. and G.C. Bergstrom. Fusarium head blight in wheat. 2003; disponible en: <http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/fungi/ascomycetes/Pages/Fusarium.aspx>.
21. Oliveira, P.M., E. Zannini, and E.K. Arendt, Cereal fungal infection, mycotoxins, and lactic acid bacteria mediated bioprotection: from crop farming to cereal products. *Food microbiology*, 2014. **37**: p. 78-95.
22. Goswami, R.S. and H.C. Kistler, Heading for disaster: Fusarium graminearum on cereal crops. *Molecular plant pathology*, 2004. **5**(6): p. 515-525.
23. Gilbert, J. and A. Tekauz, Review: recent developments in research on Fusarium head blight of wheat in Canada. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 2000. **22**(1): p. 1-8.
24. McMullen, M., et al., A Unified Effort to Fight an Enemy of Wheat and Barley: Fusarium Head Blight. *Plant Disease*, 2012. **96**(12): p. 1712-1728.
25. Yuen, G.Y. and S.D. Schoneweis, Strategies for managing Fusarium head blight and deoxynivalenol accumulation in wheat. *International journal of food microbiology*, 2007. **119**(1): p. 126-130.
26. Moretti, A., et al., Systemic growth of *F. graminearum* in wheat plants and related accumulation of deoxynivalenol. *Toxins*, 2014. **6**(4): p. 1308-1324.
27. Jansen, C., et al., Infection patterns in barley and wheat spikes inoculated with wild-type and trichodiene synthase gene disrupted *Fusarium graminearum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005. **102**(46): p. 16892-16897.
28. Del Ponte, E., J. Fernandes, and G. Bergstrom, Influence of growth stage on Fusarium head blight and deoxynivalenol production in wheat. *Journal of Phytopathology*, 2007. **155**(10): p. 577-581.
29. Trail, F., For blighted waves of grain: *Fusarium graminearum* in the postgenomics era. *Plant physiology*, 2009. **149**(1): p. 103-110.
30. McCormick, S.P., et al., Trichothecenes: from simple to complex mycotoxins. *Toxins*, 2011. **3**(7): p. 802-814.
31. He, J., et al., Chemical and biological transformations for detoxification of trichothecene mycotoxins in human and animal food chains: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 2010. **21**(2): p. 67-76.
32. Marin, S., et al., Mycotoxins: occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food and Chemical Toxicology*, 2013. **60**: p. 218-237.
33. Omurtag, G.Z., Fumonisin, trichothecenes and zearalenone in cereals. *International Journal of Molecular Sciences*, 2008. **9**(11): p. 2062-2090.
34. Escrivá, L., G. Font, and L. Manyes, In vivo toxicity studies of fusarium mycotoxins in the last decade: A review. *Food and Chemical Toxicology*, 2015. **78**: p. 185-206.
35. Pleadin, J., et al., Fusarium mycotoxins' occurrence in cereals harvested from Croatian fields. *Food Control*, 2013. **32**(1): p. 49-54.
36. Desjardins, A. and R. Proctor, Molecular biology of *Fusarium* mycotoxins. *International journal of food microbiology*, 2007. **119**(1): p. 47-50.
37. Foroud, N.A. and F. Eudes, Trichothecenes in cereal grains. *International journal of molecular sciences*, 2009. **10**(1): p. 147-173.
38. Kimura, M., et al., Molecular and genetic studies of *Fusarium* trichothecene biosynthesis: pathways, genes, and evolution. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 2007. **71**(9): p. 2105-2123.
39. Gareis, M., et al., Collection of occurrence data of *Fusarium* toxins in food and assessment of dietary intake by the population of EU member states. Final Report SCOOP Task, 2003. **3**(10).
40. Bennett, J. and M. Klich, Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, 2003. **16**(3): p. 497-516.

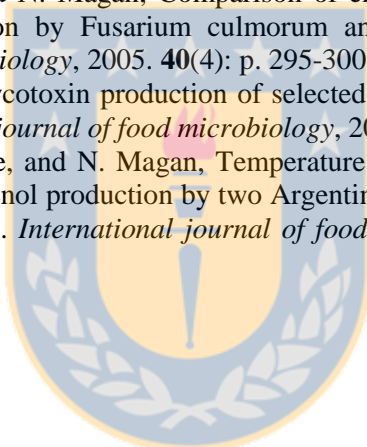
41. República de Chile, *Reglamento Sanitario de los Alimentos*, Art 169, Decreto N° 977/96. Ministerio de Salud, 1996.
42. European Commission, Commission Regulation (EC) No. 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Off. J. Eur. Union*, 2006. **364**: p. 5-24.
43. Merhej, J., et al., The velvet gene, FgVe1, affects fungal development and positively regulates trichothecene biosynthesis and pathogenicity in *Fusarium graminearum*. *Molecular plant pathology*, 2012. **13**(4): p. 363-374.
44. Alexander, N.J., et al., The genetic basis for 3-ADON and 15-ADON trichothecene chemotypes in *Fusarium*. *Fungal Genetics and Biology*, 2011. **48**(5): p. 485-495.
45. Tokai, T., et al., *Fusarium* Tri4 encodes a key multifunctional cytochrome P450 monooxygenase for four consecutive oxygenation steps in trichothecene biosynthesis. *Biochemical and biophysical research communications*, 2007. **353**(2): p. 412-417.
46. Merhej, J., F. Richard-Forget, and C. Barreau, Regulation of trichothecene biosynthesis in *Fusarium*: recent advances and new insights. *Applied microbiology and biotechnology*, 2011. **91**(3): p. 519-528.
47. McCormick, S., et al., Tri1 in *Fusarium graminearum* encodes a P450 oxygenase. *Applied and environmental microbiology*, 2004. **70**(4): p. 2044-2051.
48. Brown, D.W., et al., Inactivation of a cytochrome P-450 is a determinant of trichothecene diversity in *Fusarium* species. *Fungal Genetics and Biology*, 2002. **36**(3): p. 224-233.
49. Lee, T., et al., Tri13 and Tri7 determine deoxynivalenol- and nivalenol-producing chemotypes of *Gibberella zeae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002. **68**(5): p. 2148-2154.
50. Lee, T., et al., Identification of deoxynivalenol- and nivalenol-producing chemotypes of *Gibberella zeae* by using PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001. **67**(7): p. 2966-2972.
51. Moss, M.O. and U. Thrane, *Fusarium* taxonomy with relation to trichothecene formation. *Toxicology letters*, 2004. **153**(1): p. 23-28.
52. Desjardins, A.E., Natural product chemistry meets genetics: when is a genotype a chemotype? *Journal of agricultural and food chemistry*, 2008. **56**(17): p. 7587-7592.
53. Castañares, E., et al., Trichothecene genotypes and production profiles of *Fusarium graminearum* isolates obtained from barley cultivated in Argentina. *International journal of food microbiology*, 2014. **179**: p. 57-63.
54. Ward, T.J., et al., An adaptive evolutionary shift in *Fusarium* head blight pathogen populations is driving the rapid spread of more toxigenic *Fusarium graminearum* in North America. *Fungal Genetics and Biology*, 2008. **45**(4): p. 473-484.
55. Puri, K.D. and S. Zhong, The 3ADON population of *Fusarium graminearum* found in North Dakota is more aggressive and produces a higher level of DON than the prevalent 15ADON population in spring wheat. *Phytopathology*, 2010. **100**(10): p. 1007-1014.
56. Del Ponte, E.M., et al., Regional and field-specific factors affect the composition of *Fusarium* head blight pathogens in subtropical no-till wheat agroecosystem of Brazil. *Phytopathology*, 2015. **105**(2): p. 246-254.
57. Pan, D., et al., Trichothecene genotypes of *Fusarium graminearum* from wheat in Uruguay. *International journal of food microbiology*, 2013. **162**(1): p. 120-123.
58. Reynoso, M.M., et al., Trichothecene genotypes and chemotypes in *Fusarium graminearum* strains isolated from wheat in Argentina. *International journal of food microbiology*, 2011. **145**(2): p. 444-448.
59. Meneely, J.P., et al., Current methods of analysis for the determination of trichothecene mycotoxins in food. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2011. **30**(2): p. 192-203.
60. Krska, R., E. Welzig, and H. Boudra, Analysis of *Fusarium* toxins in feed. *Animal Feed Science and Technology*, 2007. **137**(3): p. 241-264.

61. Kuzdraliński, A., E. Solarska, and J. Mazurkiewicz, Mycotoxin content of organic and conventional oats from southeastern Poland. *Food Control*, 2013. **33**(1): p. 68-72.
62. Jestoi, M., A. Ritieni, and A. Rizzo, Analysis of the Fusarium mycotoxins fusaproliferin and trichothecenes in grains using gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2004. **52**(6): p. 1464-1469.
63. Gottschalk, C., et al., Simultaneous determination of type A, B and D trichothecenes and their occurrence in cereals and cereal products. *Food Additives and Contaminants*, 2009. **26**(9): p. 1273-1289.
64. González-Osnaya, L., et al., Occurrence of deoxynivalenol and T-2 toxin in bread and pasta commercialised in Spain. *Food chemistry*, 2011. **124**(1): p. 156-161.
65. Trucksess, M.W., et al., Determination of deoxynivalenol in processed foods. *Journal of AOAC International*, 2010. **93**(4): p. 1236-1242.
66. Vidal, A., et al., Determination of aflatoxins, deoxynivalenol, ochratoxin A and zearalenone in wheat and oat based bran supplements sold in the Spanish market. *Food and Chemical Toxicology*, 2013. **53**: p. 133-138.
67. Dombink-Kurtzman, M.A., S.M. Poling, and D.F. Kendra, Determination of Deoxynivalenol in Infant Cereal by Immunoaffinity Column Cleanup and High-Pressure Liquid Chromatography–UV Detection. *Journal of Food Protection*, 2010. **73**(6): p. 1073-1076.
68. Kassim, N., et al., A preliminary study of T-2 and HT-2 toxins in cereals sold in traditional market in South Korea. *Food control*, 2011. **22**(8): p. 1408-1412.
69. Visconti, A., et al., Analysis of T-2 and HT-2 toxins in cereal grains by immunoaffinity clean-up and liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 2005. **1075**(1): p. 151-158.
70. Trebstein, A., et al., Determination of T-2 and HT-2 toxins in cereals including oats after immunoaffinity cleanup by liquid chromatography and fluorescence detection. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2008. **56**(13): p. 4968-4975.
71. Yoshinari, T., et al., Occurrence of Four Fusarium Mycotoxins, Deoxynivalenol, Zearalenone, T-2 Toxin, and HT-2 Toxin, in Wheat, Barley, and Japanese Retail Food. *Journal of Food Protection*, 2014. **77**(11): p. 1940-1946.
72. Romagnoli, B., M. Ferrari, and C. Bergamini, Simultaneous determination of deoxynivalenol, zearalenone, T-2 and HT-2 toxins in breakfast cereals and baby food by high-performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *Journal of mass spectrometry*, 2010. **45**(9): p. 1075-1080.
73. Ok, H.E., et al., Mycobiota and natural occurrence of aflatoxin, deoxynivalenol, nivalenol and zearalenone in rice freshly harvested in South Korea. *Food Control*, 2014. **37**: p. 284-291.
74. Dzuman, Z., et al., A rugged high-throughput analytical approach for the determination and quantification of multiple mycotoxins in complex feed matrices. *Talanta*, 2014. **121**: p. 263-272.
75. Koesukwiwat, U., K. Sanguankaew, and N. Leepipatpiboon, Evaluation of a modified QuEChERS method for analysis of mycotoxins in rice. *Food chemistry*, 2014. **153**: p. 44-51.
76. Mishra, S., et al., Occurrence of deoxynivalenol in cereals and exposure risk assessment in Indian population. *Food Control*, 2013. **30**(2): p. 549-555.
77. Sokolović, M. and B. Šimpraga, Survey of trichothecene mycotoxins in grains and animal feed in Croatia by thin layer chromatography. *Food Control*, 2006. **17**(9): p. 733-740.
78. Barros, G., et al., Deoxynivalenol and nivalenol analysis in soybean and soy flour. *World Mycotoxin Journal*, 2008. **1**(3): p. 263-266.
79. Kolmanič, A., et al., Fate of deoxynivalenol and nivalenol during storage of organic whole-grain wheat flour. *Journal of stored products research*, 2010. **46**(1): p. 66-71.

80. Barros, G., et al., Trichothecenes and zearalenone production by *Fusarium equiseti* and *Fusarium semitectum* species isolated from Argentinean soybean. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 2012. **29**(9): p. 1436-1442.
81. Sospedra, I., et al., Use of the modified quick easy cheap effective rugged and safe sample preparation approach for the simultaneous analysis of type A-and B-trichothecenes in wheat flour. *Journal of Chromatography A*, 2010. **1217**(9): p. 1437-1440.
82. Sirhan, A.Y., G.H. Tan, and R.C. Wong, Simultaneous detection of type a and type b trichothecenes in cereals by liquid chromatography coupled with electrospray ionization quadrupole time of flight mass spectrometry (LC-ESI-QTOF-MS/MS). *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 2012. **35**(14): p. 1945-1957.
83. Mateo, J., et al., Critical study of and improvements in chromatographic methods for the analysis of type B trichothecenes. *Journal of Chromatography A*, 2001. **918**(1): p. 99-112.
84. Cerveró, M.C., et al., Determination of trichothecenes, zearalenone and zearalenols in commercially available corn-based foods in Spain. *Revista iberoamericana de micología*, 2007. **24**(1): p. 52.
85. Eke, Z., A. Kende, and K. Torkos, Simultaneous detection of A and B trichothecenes by gas chromatography with flame ionization or mass selective detection. *Microchemical journal*, 2004. **78**(2): p. 211-216.
86. Valle-Algarra, F.M., et al., Determination of type A and type B trichothecenes in paprika and chili pepper using LC-triple quadrupole-MS and GC-ECD. *Talanta*, 2011. **84**(4): p. 1112-1117.
87. Kotal, F., et al., Determination of trichothecenes in cereals. *Journal of Chromatography A*, 1999. **830**(1): p. 219-225.
88. Castillo, M.-Á., et al., Occurrence of deoxynivalenol and nivalenol in Spanish corn-based food products. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2008. **21**(5): p. 423-427.
89. Ibáñez-Vea, M., et al., Co-occurrence of type-A and type-B trichothecenes in barley from a northern region of Spain. *Food Control*, 2012. **25**(1): p. 81-88.
90. Schollenberger, M., et al., Determination of eight trichothecenes by gas chromatography-mass spectrometry after sample clean-up by a two-stage solid-phase extraction. *Journal of Chromatography A*, 1998. **815**(1): p. 123-132.
91. Montes, R., R. Segarra, and M.-Á. Castillo, Trichothecenes in breakfast cereals from the Spanish retail market. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2012. **27**(1): p. 38-44.
92. Lattanzio, V.M., M. Pascale, and A. Visconti, Current analytical methods for trichothecene mycotoxins in cereals. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2009. **28**(6): p. 758-768.
93. Montalva, C., et al., Molecular differentiation of recently described *Neozygites osornensis* (Neozygiales: Neozygiteaceae) from two morphologically similar species. *Journal of invertebrate pathology*, 2014. **115**: p. 92-94.
94. Scott, J., et al., Prevalence of *Fusarium* crown rot pathogens of wheat in southern Queensland and northern New South Wales. 2003.
95. Klötzel, M., U. Lauber, and H.U. Humpf, A new solid phase extraction clean-up method for the determination of 12 type A and B trichothecenes in cereals and cereal-based food by LC-MS/MS. *Molecular nutrition & food research*, 2006. **50**(3): p. 261-269.
96. Rodríguez-Carrasco, Y., et al., Multi-mycotoxin analysis in wheat semolina using an acetonitrile-based extraction procedure and gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2012. **1270**: p. 28-40.
97. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, *Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1)*. 2005; disponible en: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf.

98. Krska, R., S. Baumgartner, and R. Josephs, The state-of-the-art in the analysis of type-A and-B trichothecene mycotoxins in cereals. *Fresenius' journal of analytical chemistry*, 2001. **371**(3): p. 285-299.
99. Langseth, W. and T. Rundberget, Instrumental methods for determination of nonmacrocylic trichothecenes in cereals, foodstuffs and cultures. *Journal of Chromatography A*, 1998. **815**(1): p. 103-121.
100. Bertuzzi, T., et al., Co-occurrence of type A and B trichothecenes and zearalenone in wheat grown in northern Italy over the years 2009–2011. *Food Additives & Contaminants: Part B*, 2014. **7**(4): p. 273-281.
101. Labuda, R., et al., Incidence of trichothecenes and zearalenone in poultry feed mixtures from Slovakia. *International journal of food microbiology*, 2005. **105**(1): p. 19-25.
102. Rodríguez-Carrasco, Y., et al., A survey of trichothecenes, zearalenone and patulin in milled grain-based products using GC–MS/MS. *Food chemistry*, 2014. **146**: p. 212-219.
103. Josephs, R., et al., Determination of trichothecene mycotoxins in wheat by use of supercritical fluid extraction and high-performance liquid chromatography with diode array detection or gas chromatography with electron capture detection. *Journal of Chromatography A*, 1998. **795**(2): p. 297-304.
104. Weingaertner, J., et al., Use of Mycosep multifunctional clean-up columns for the determination of trichothecenes in wheat by electron-capture gas chromatography. *Fresenius' journal of analytical chemistry*, 1997. **357**(8): p. 1206-1210.
105. Hallier, A., F. Celette, and C. David, Effects of sampling and extraction on deoxynivalenol quantification. *Food chemistry*, 2011. **127**(1): p. 303-307.
106. Pereira, V., J. Fernandes, and S. Cunha, Comparative assessment of three cleanup procedures after QuEChERS extraction for determination of trichothecenes (type A and type B) in processed cereal-based baby foods by GC–MS. *Food chemistry*, 2015. **182**: p. 143-149.
107. Eskola, M., et al., A study of the suitability of gas chromatography-electron capture detection for the analysis of deoxynivalenol in cereals. *Mycotoxin research*, 2000. **16**(2): p. 73-90.
108. AOAC International, *Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements*, en AOAC Official Methods of Analysis. 2012.
109. Yue, Y.-T., et al., Simultaneous determination of deoxynivalenol and nivalenol in traditional Chinese medicine by SPE and LC. *Chromatographia*, 2010. **72**(5-6): p. 551-555.
110. Cunha, S.C. and J.O. Fernandes, Development and validation of a method based on a QuEChERS procedure and heart-cutting GC-MS for determination of five mycotoxins in cereal products. *Journal of separation science*, 2010. **33**(4-5): p. 600-609.
111. Schothorst, R., et al., Determination of trichothecenes in duplicate diets of young children by capillary gas chromatography with mass spectrometric detection. *Food additives and contaminants*, 2005. **22**(1): p. 48-55.
112. Bakan, B., et al., Toxicogenic potential of *Fusarium culmorum* strains isolated from French wheat. *Food Additives & Contaminants*, 2001. **18**(11): p. 998-1003.
113. de Kuppler, A.M., et al., Genotyping and phenotyping of *Fusarium graminearum* isolates from Germany related to their mycotoxin biosynthesis. *International journal of food microbiology*, 2011. **151**(1): p. 78-86.
114. Pinto, V., et al., Natural occurrence of nivalenol and mycotoxigenic potential of *Fusarium graminearum* strains in wheat affected by head blight in Argentina. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2008. **39**(1): p. 157-162.
115. Szecsi, A., et al., Determination of trichothecene chemotypes of *Fusarium graminearum* strains isolated in Hungary. *Journal of Phytopathology*, 2005. **153**(7-8): p. 445-448.
116. Eriksson, L., et al., *Design of experiments: principles and applications*. 3ra edición. 2008: MKS Umetrics AB.

117. Bruns, R.E., I.S. Scarminio, and B. de Barros Neto, *Statistical design-chemometrics*. 1ra edición. 2006: Elsevier.
118. Greenhalgh, R., G. Neish, and J. Miller, Deoxynivalenol, acetyl deoxynivalenol, and zearalenone formation by Canadian isolates of *Fusarium graminearum* on solid substrates. *Applied and environmental microbiology*, 1983. **46**(3): p. 625-629.
119. Llorens, A., et al., Influence of environmental factors on the biosynthesis of type B trichothecenes by isolates of *Fusarium* spp. from Spanish crops. *International journal of food microbiology*, 2004. **94**(1): p. 43-54.
120. Hope, R. and N. Magan, Two-dimensional environmental profiles of growth, deoxynivalenol and nivalenol production by *Fusarium culmorum* on a wheat-based substrate. *Letters in Applied Microbiology*, 2003. **37**(1): p. 70-74.
121. Martins, M.L.g. and H.M. Martins, Influence of water activity, temperature and incubation time on the simultaneous production of deoxynivalenol and zearalenone in corn (*Zea mays*) by *Fusarium graminearum*. *Food Chemistry*, 2002. **79**(3): p. 315-318.
122. Ramirez, M.L., S. Chulze, and N. Magan, Impact of environmental factors and fungicides on growth and deoxynivalenol production by *Fusarium graminearum* isolates from Argentinian wheat. *Crop Protection*, 2004. **23**(2): p. 117-125.
123. Hope, R., D. Aldred, and N. Magan, Comparison of environmental profiles for growth and deoxynivalenol production by *Fusarium culmorum* and *F. graminearum* on wheat grain. *Letters in Applied Microbiology*, 2005. **40**(4): p. 295-300.
124. Kokkonen, M., et al., Mycotoxin production of selected *Fusarium* species at different culture conditions. *International journal of food microbiology*, 2010. **143**(1): p. 17-25.
125. Ramirez, M.L., S. Chulze, and N. Magan, Temperature and water activity effects on growth and temporal deoxynivalenol production by two Argentinean strains of *Fusarium graminearum* on irradiated wheat grain. *International journal of food microbiology*, 2006. **106**(3): p. 291-296.



Anexo A

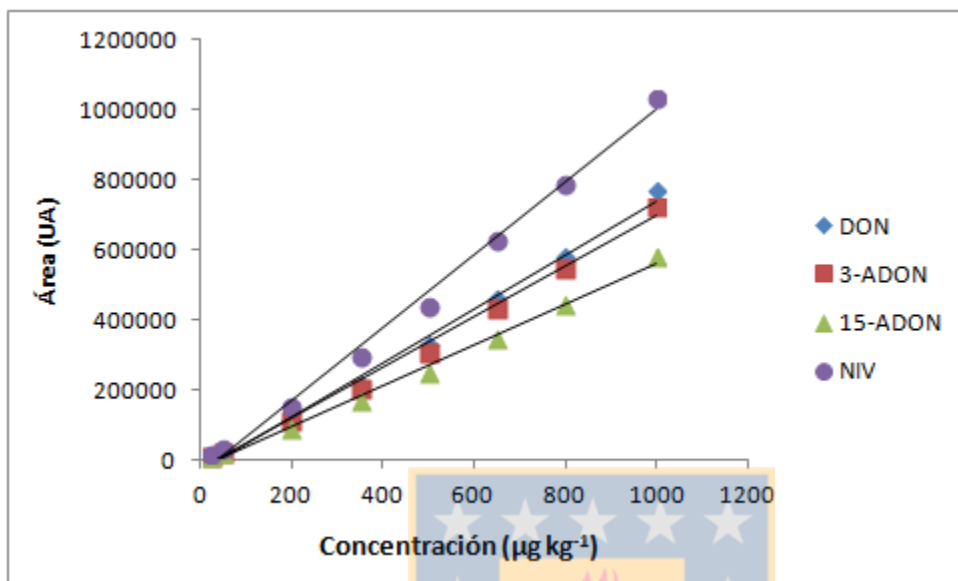


Figura A1: Curva de calibración en arroz.

Tabla A1: Ecuaciones de la recta de tricotecenos en arroz^a.

Micotoxina	Ecuación de la recta	Coefficiente de determinación (R ²)
DON	$y = 765.18 x - 26949$	0.9945
3-ADON	$y = 725.08 x - 24601$	0.9946
15-ADON	$y = 580.54 x - 17561$	0.9955
NIV	$y = 1036.96 x - 35669$	0.9950

^a Rango lineal: 25 – 1000 µg kg⁻¹.

En la figura A2 se presenta un cromatograma de arroz sobrecargado con tricotecenos de tipo B a una concentración de 500 µg kg⁻¹, correspondiente al quinto nivel de la curva de calibración.

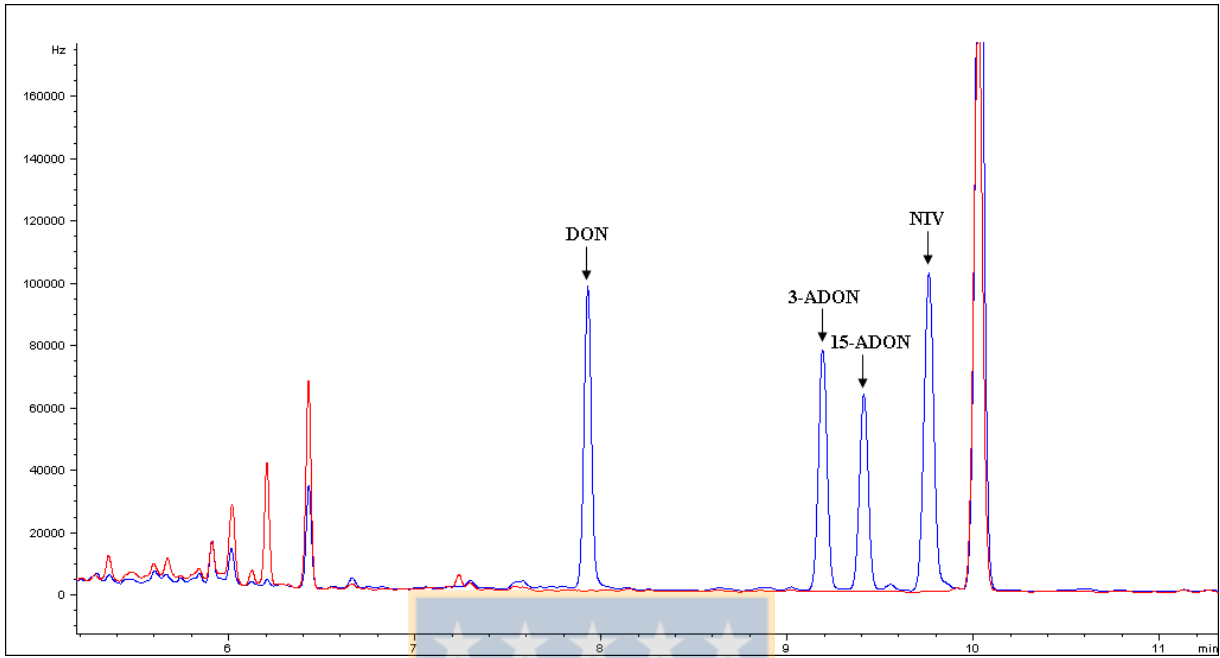


Figura A2: Cromatograma de arroz blanco (línea roja) y arroz sobrecargado (línea azul) con TCTB $500 \mu\text{g kg}^{-1}$.



Anexo B

Tabla B1: Datos experimentales del diseño experimental factorial completo de dos niveles (2^3), segundo ensayo de producción de micotoxinas *in vitro*.

Exp ^a	x-variables			y-respuestas		
	x_1 T_{inc} (°C)	x_2 t_{inc} (semanas)	x_3 Agua (mL)	y_1 DON ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	y_2 3-ADON ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	y_3 15-ADON ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
1	20 (-1) ^b	3 (-1)	40 (-1)	8.9	– ^c	28.7
2	25 (+1)	3 (-1)	40 (-1)	187.8	95.0	641.5
3	20 (-1)	4 (+1)	40 (-1)	26.5	38.3	81.0
4	25 (+1)	4 (+1)	40 (-1)	288.4	97.0	779.2
5	20 (-1)	3 (-1)	80 (+1)	6201.4	534.8	6491.0
6	25 (+1)	3 (-1)	80 (+1)	246.5	143.7	1207.1
7	20 (-1)	4 (+1)	80 (+1)	9799.7	434.2	5638.8
8	25 (+1)	4 (+1)	80 (+1)	140.6	83.6	671.0
9	20 (-1)	3 (-1)	40 (-1)	43.9	42.1	204.5
10	25 (+1)	3 (-1)	40 (-1)	140.8	81.2	415.8
11	20 (-1)	4 (+1)	40 (-1)	15.7	33.2	50.4
12	25 (+1)	4 (+1)	40 (-1)	372.0	94.7	860.7
13	20 (-1)	3 (-1)	80 (+1)	1252.4	346.8	2554.2
14	25 (+1)	3 (-1)	80 (+1)	60.5	66.8	304.9
15	20 (-1)	4 (+1)	80 (+1)	3584.4	461.4	4345.8
16	25 (+1)	4 (+1)	80 (+1)	37.3	43.2	211.4
17	20 (-1)	3 (-1)	40 (-1)	–	–	–
18	25 (+1)	3 (-1)	40 (-1)	147.5	85.6	435.2
19	20 (-1)	4 (+1)	40 (-1)	18.4	34.1	64.7
20	25 (+1)	4 (+1)	40 (-1)	227.6	69.5	522.2
21	20 (-1)	3 (-1)	80 (+1)	–	–	–
22	25 (+1)	3 (-1)	80 (+1)	153.5	108.6	707.5
23	20 (-1)	4 (+1)	80 (+1)	8663.7	392.0	3070.9
24	25 (+1)	4 (+1)	80 (+1)	118.2	71.5	619.4
25	20 (-1)	3 (-1)	40 (-1)	12.4	31.4	38.4
26	25 (+1)	3 (-1)	40 (-1)	209.4	94.6	665.9
27	20 (-1)	4 (+1)	40 (-1)	–	–	–
28	25 (+1)	4 (+1)	40 (-1)	344.5	99.4	869.0
29	20 (-1)	3 (-1)	80 (+1)	13885.4	821.5	9274.3
30	25 (+1)	3 (-1)	80 (+1)	115.4	74.2	438.7
31	20 (-1)	4 (+1)	80 (+1)	759.6	101.9	1346.8
32	25 (+1)	4 (+1)	80 (+1)	176.2	86.9	860.8
33	20 (-1)	3 (-1)	40 (-1)	9.3	30.7	28.6
34	25 (+1)	3 (-1)	40 (-1)	213.9	93.5	791.4
35	20 (-1)	4 (+1)	40 (-1)	69.0	42.5	145.9

36	25 (+1)	4 (+1)	40 (-1)	241.9	83.8	661.1
37	20 (-1)	3 (-1)	80 (+1)	–	–	–
38	25 (+1)	3 (-1)	80 (+1)	46.2	51.7	199.9
39	20 (-1)	4 (+1)	80 (+1)	–	–	–
40	25 (+1)	4 (+1)	80 (+1)	284.8	100.9	910.4

^a Experimentos del diseño.

^b Valores en paréntesis corresponden a los valores codificados de cada nivel.

^c Valores omitidos.

Tabla B2: Test ANOVA para el modelo tras 2 PLS-componentes, segundo ensayo de producción de micotoxinas *in vitro*.

	g.l. ^a	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	Valor de <i>F</i>	Valor de <i>p</i>	Desviación estándar
<i>y</i> ₁ DON						
Total corregido	34	24.0487	0.70731			0.841019
Regresión	3	20.9634	6.98779	70.2109	0.000	2.643440
Residual	31	3.08530	0.09953			0.315477
Falta de ajuste (error del modelo)	4	0.32255	0.08064	0.78807	0.543	0.283968
Error puro (error de réplicas)	27	2.76274	0.10232			0.319881
<i>y</i> ₂ 3-ADON						
Total corregido	33	4.63042	0.14032			0.374587
Regresión	3	3.89006	1.29669	52.5432	0.000	1.138720
Residual	30	0.74036	0.02468			0.157094
Falta de ajuste (error del modelo)	4	0.13212	0.03303	1.41197	0.258	0.181744
Error puro (error de réplicas)	26	0.60823	0.02339			0.152949
<i>y</i> ₃ 15-ADON						
Total corregido	34	14.2187	0.41819			0.646682
Regresión	3	12.2624	4.08746	64.7697	0.000	2.021750
Residual	31	1.95634	0.06311			0.251212
Falta de ajuste (error del modelo)	4	0.21570	0.05393	0.83648	0.514	0.232219
Error puro (error de réplicas)	27	1.74063	0.06447			0.253905

^a Grados de libertad.

Tabla B3: Datos experimentales del diseño experimental factorial completo de dos niveles (2^3), tercer ensayo de producción de micotoxinas *in vitro*.

Exp ^a	x-variables			y-respuestas		
	x_1 T_{inc} (°C)	x_2 t_{inc} (semanas)	x_3 Agua (mL)	y_1 DON ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	y_2 3-ADON ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	y_3 15-ADON ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
1	20 (-1) ^b	3 (-1)	40 (-1)	43.6	37.7	102.1
2	25 (+1)	3 (-1)	40 (-1)	38.0	35.7	66.3
3	20 (-1)	4 (+1)	40 (-1)	64.7	43.6	170.0
4	25 (+1)	4 (+1)	40 (-1)	58.7	41.3	162.0
5	20 (-1)	3 (-1)	80 (+1)	0.1	0.1	33.6
6	25 (+1)	3 (-1)	80 (+1)	0.1	0.1	52.2
7	20 (-1)	4 (+1)	80 (+1)	42.8	0.1	35.1
8	25 (+1)	4 (+1)	80 (+1)	– ^c	0.1	43.6
9	20 (-1)	3 (-1)	40 (-1)	100.4	54.4	302.2
10	25 (+1)	3 (-1)	40 (-1)	42.9	37.5	94.3
11	20 (-1)	4 (+1)	40 (-1)	72.9	44.1	165.8
12	25 (+1)	4 (+1)	40 (-1)	71.9	37.4	76.5
13	20 (-1)	3 (-1)	80 (+1)	0.1	0.1	–
14	25 (+1)	3 (-1)	80 (+1)	0.1	0.1	40.9
15	20 (-1)	4 (+1)	80 (+1)	37.4	0.1	35.0
16	25 (+1)	4 (+1)	80 (+1)	–	0.1	67.6
17	20 (-1)	3 (-1)	40 (-1)	454.8	75.4	704.2
18	25 (+1)	3 (-1)	40 (-1)	42.5	35.6	59.7
19	20 (-1)	4 (+1)	40 (-1)	73.8	43.0	153.3
20	25 (+1)	4 (+1)	40 (-1)	44.6	36.5	98.2
21	20 (-1)	3 (-1)	80 (+1)	0.1	0.1	34.3
22	25 (+1)	3 (-1)	80 (+1)	0.1	0.1	40.2
23	20 (-1)	4 (+1)	80 (+1)	0.1	0.1	35.8
24	25 (+1)	4 (+1)	80 (+1)	–	0.1	42.1
25	20 (-1)	3 (-1)	40 (-1)	48.2	39.2	122.7
26	25 (+1)	3 (-1)	40 (-1)	47.1	38.9	103.3
27	20 (-1)	4 (+1)	40 (-1)	44.9	36.4	108.2
28	25 (+1)	4 (+1)	40 (-1)	39.3	–	56.4
29	20 (-1)	3 (-1)	80 (+1)	0.1	0.1	35.9
30	25 (+1)	3 (-1)	80 (+1)	0.1	0.1	42.2
31	20 (-1)	4 (+1)	80 (+1)	0.1	0.1	47.2
32	25 (+1)	4 (+1)	80 (+1)	53.0	0.1	58.9

^a Experimentos del diseño.

^b Valores codificados de cada nivel en paréntesis.

^c Valores omitidos.

Tabla B4: Test ANOVA para el modelo tras 3 PLS-componentes, tercer ensayo de producción de micotoxinas *in vitro*.

	g.l. ^a	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	Valor de <i>F</i>	Valor de <i>p</i>	Desviación estándar
<i>y</i> ₁ DON						
Total corregido	28	51.0954	1.82484			1.35087
Regresión	6	42.7578	7.12629	18.8036	0.000	2.66951
Residual	22	8.33767	0.37899			0.61562
Falta de ajuste (error del modelo)	1	0.82497	0.82497	2.30601	0.144	0.90828
Error puro (error de réplicas)	21	7.51270	0.35775			0.59812
<i>y</i> ₂ 3-ADON						
Total corregido	30	15377.5	512.585			22.6403
Regresión	6	14309.0	2384.83	53.5621	0.000	48.8347
Residual	24	1068.59	44.5246			6.67267
Falta de ajuste (error del modelo)	1	87.7267	87.7267	2.05708	0.165	9.36626
Error puro (error de réplicas)	23	980.862	42.6462			6.53041
<i>y</i> ₃ 15-ADON						
Total corregido	30	2.98612	0.09954			0.31549
Regresión	6	2.28198	0.38033	12.9631	0.000	0.61671
Residual	24	0.70415	0.02934			0.17129
Falta de ajuste (error del modelo)	1	0.02672	0.02672	0.90736	0.351	0.16348
Error puro (error de réplicas)	23	0.67742	0.02945			0.17162

^a Grados de libertad.

