



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

**EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD MICOTOXIGÉNICA DE ESPECIES DE  
*FUSARIUM* AISLADAS DE CEREALES NACIONALES**

Tesis presentada a la Facultad de Farmacia de la Universidad de Concepción  
para optar al grado de Magíster en Ciencias Farmacéuticas

**POR: DIEGO IGNACIO JORQUERA PEREIRA**

Profesora Guía: Dra. Gisela Alejandra Ríos Gajardo  
Dpto. de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Farmacia  
Universidad de Concepción

**Enero, 2022  
Concepción, Chile**

Profesor Tutor:

---

Dra. Gisela Alejandra Ríos Gajardo  
Facultad de Farmacia  
Universidad de Concepción

Comisión Evaluadora:

---

Dr. Ernesto Antonio Moya Elizondo  
Facultad de Agronomía  
Universidad de Concepción



---

Dr. Víctor Haroldo Campos Requena  
Facultad de Ciencias Químicas  
Universidad de Concepción

---

Dra. Claudia Andrea Oviedo Silva  
Facultad de Ciencias  
Universidad del Bio-Bío

Directora del Programa:

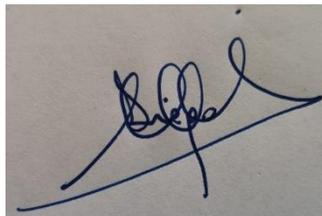
---

MSc. Sigrid Claudia Mennickent Cid  
Facultad de Farmacia  
Universidad de Concepción

## AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN

Quien suscribe, DIEGO IGNACIO JORQUERA PEREIRA, RUT: 17.903.962-1, alumno del Programa de Magíster en Ciencias Farmacéuticas, de la Facultad de Farmacia, de la Universidad de Concepción, declara ser autor de la tesis **EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD MICOTOXIGÉNICA DE ESPECIES DE *FUSARIUM* AISLADAS DE CEREALES NACIONALES** y conceder derecho de publicación, comunicación al público y reproducción de esa obra, en forma total o parcial en cualquier medio y bajo cualquier forma del mismo, a la Universidad de Concepción, Chile, para formar parte de la colección material o digital de cualquiera de las Bibliotecas de la Universidad de Concepción y del Repositorio UDEC. Esta autorización es de forma libre y gratuita, y considera la reproducción de la obra con fines académicos y de difusión tanto nacional como internacionalmente.

Asimismo, quien suscribe declara que dicha obra no infringe derechos de autor de terceros.



---

DIEGO IGNACIO JORQUERA PEREIRA

## RESUMEN

Los cereales son comúnmente colonizados por especies del género *Fusarium* y, a menudo, contaminados con micotoxinas (metabolitos secundarios tóxicos), las cuales tienen un gran impacto en la salud humana/animal, en la economía y en la productividad agropecuaria. Por ello, se planteó como objetivo identificar molecularmente algunas especies de *Fusarium* aisladas desde muestras de maíz y trigo, provenientes de la región de Ñuble, Chile, determinar su capacidad micotoxigénica, *in vitro*, y evaluar el efecto de la humedad del grano (adicionando 40 mL y 80 mL de agua) y la temperatura (15, 25 y 30 °C) en la producción de micotoxinas. Además de implementar métodos de análisis para detectar y cuantificar las micotoxinas. Los hongos aislados desde los granos de maíz y trigo se identificaron como *F. proliferatum* y *F. graminearum*, respectivamente. Utilizando un medio de arroz para la producción de micotoxinas, *in vitro*, se obtuvo que *F. proliferatum* tiene la capacidad de producir FB<sub>1</sub> y FB<sub>2</sub>, mientras que *F. graminearum* las micotoxinas NIV, DON, 3-ADON, 15-ADON y ZEA. Se implementaron métodos analíticos por HPLC-FLD para el análisis de FB<sub>1</sub> y FB<sub>2</sub> y UHPLC-ESI-MS/MS para TCT-B y ZEA. Las concentraciones de FB<sub>1</sub>, FB<sub>2</sub> y DON aumentaron a mayor temperatura y menor cantidad de agua; mientras que 3-ADON y 15-ADON a mayor temperatura y cantidad de agua. NIV solo se detectó y ZEA no se ajustó al modelo. Se concluye que el efecto de las variables humedad del grano y temperatura afectan en la producción, *in vitro*, de las micotoxinas.

## ABSTRACT

Cereals are commonly colonized by species of the genus *Fusarium* and are often contaminated with mycotoxins (toxic secondary metabolites), which have a great impact on human/animal health, the economy and agricultural productivity. Therefore, the objective was to molecularly identify some *Fusarium* species isolated from corn and wheat samples, from the Ñuble region, Chile, to determine their mycotoxigenic capacity under, *in vitro* conditions, and to evaluate the effect of grain moisture (adding 40 mL and 80 mL of water) and the temperature (15, 25 and 30 °C) in the production of mycotoxins. In addition to implementing analytical methods to detect and quantify mycotoxins. The fungi isolated from corn and wheat grains were identified as *F. proliferatum* and *F. graminearum*, respectively. Using a rice medium to produce *in vitro* mycotoxins, it was obtained that *F. proliferatum* has the ability to produce FB<sub>1</sub> and FB<sub>2</sub>, while *F. graminearum* the mycotoxins NIV, DON, 3-ADON, 15-ADON and ZEA. Analytical methods were implemented by HPLC-FLD for the analysis of FB<sub>1</sub> and FB<sub>2</sub> and HPLC-ESI-MS/MS for TCT-B and ZEA. The concentrations of FB<sub>1</sub>, FB<sub>2</sub>, DON and ZEA increased at higher temperatures and with less water; while 3-ADON and 15-ADON at a higher temperature and amount of water. NIV only detected and ZEA did not fit the model. It is concluded that the effect of the grain humidity and temperature variables affect the *in vitro* production of mycotoxins.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1. Género <i>Fusarium</i> .....	1
1.1.1. Caracterización molecular .....	2
1.2. Micotoxinas producidas por <i>Fusarium</i> spp.....	4
1.2.1. Fumonisinias .....	5
1.2.2. Tricotecenos.....	8
1.2.3. Zearalenona .....	13
1.3. Biosíntesis .....	16
1.3.1. Fumonisinias .....	16
1.3.2. Tricotecenos.....	22
1.3.2.1. Quimiotipos de <i>F. graminearum</i> .....	28
1.3.3. Zearalenona .....	29
1.4. Métodos de análisis <i>Fusarium</i> toxinas .....	31
1.5. Estudios de micotoxinas en Chile .....	366
<b>2. HIPÓTESIS</b> .....	38

<b>3. OBJETIVOS</b> .....	39
3.1. Objetivo general.....	39
3.2. Objetivos específicos .....	39
<b>4. MATERIALES</b> .....	40
4.1. Equipos y materiales.....	40
4.2. Reactivos .....	42
4.3. Medio de cultivo .....	42
4.4. Soluciones .....	43
4.4.1. Solución tampón.....	43
4.4.2. Soluciones extractivas.....	43
4.4.3. Soluciones reactivo de derivatización .....	43
4.4.4. Solución patrón .....	44
<b>5. METODOLOGÍA</b> .....	45
5.1. Aislamiento y purificación de especies de <i>Fusarium</i> provenientes de cereales nacionales.....	45
5.2. Caracterización molecular de las especies de <i>Fusarium</i> aisladas.....	46
5.2.1. Extracción del ADN .....	46
5.2.2. PCR punto final .....	46
5.2.3. Secuenciación Sanger y alineamiento local .....	48

5.3. Implementación de las metodologías analíticas para la determinación y cuantificación de micotoxinas .....	48
5.3.1. Extracción y limpieza.....	48
5.3.1.1. Fumonisinias B <sub>1</sub> y B <sub>2</sub> .....	48
5.3.1.2. Tricotecenos de tipo B y Zearalenona .....	49
5.3.2. Condiciones cromatográficas .....	50
5.3.2.1. Fumonisinias B <sub>1</sub> y B <sub>2</sub> .....	50
5.3.2.2. Tricotecenos de tipo B y Zearalenona .....	50
5.3.3. Determinación de parámetros analíticos .....	52
5.3.3.1. Linealidad .....	53
5.3.3.2. Límite de detección y límite de cuantificación.....	54
5.3.3.3. Precisión.....	55
5.3.3.4. Exactitud.....	56
5.4. Determinación de la capacidad micotoxigénica, <i>in vitro</i> , de la(s) especie(s) aislada(s).....	57
5.4.1. Contaminación de arroz .....	57
5.4.2. Detección y cuantificación de las micotoxinas producidas .....	59

5.5.	Evaluación del efecto de la humedad del grano y de la temperatura en la producción de las micotoxinas.....	59
5.5.1.	Determinación de la humedad.....	59
5.5.2.	Diseño de experimentos.....	60
5.5.3.	Tratamiento de datos .....	61
<b>6.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>62</b>
6.1.	Aislamiento y purificación de <i>Fusarium</i> provenientes de cereales nacionales .....	62
6.2.	Caracterización molecular de las especies de <i>Fusarium</i> aisladas.....	63
6.2.1.	Extracción del ADN .....	63
6.2.2.	PCR punto final .....	63
6.2.3.	Secuenciación Sanger y alineamiento local .....	64
6.3.	Implementación de las metodologías analíticas para la determinación y cuantificación de micotoxinas.....	66
6.3.1.	Condiciones cromatográficas .....	66
6.3.1.1.	Fumonisinias B <sub>1</sub> y B <sub>2</sub> .....	66
6.3.1.2.	Tricotecenos de tipo B y Zearalenona .....	67

6.3.2.	Determinación de parámetros analíticos .....	72
6.3.2.1.	Linealidad .....	72
6.3.2.1.1.	Curva de calibración en estándar .....	72
6.3.2.1.1.1.	Fumonisinias B <sub>1</sub> y B <sub>2</sub> .....	72
6.3.2.1.1.2.	Tricotecenos de tipo B y Zearalenona .....	73
6.3.2.1.2.	Curva de calibración en matriz .....	75
6.3.2.1.2.1.	Fumonisinia B <sub>1</sub> .....	75
6.3.2.1.2.2.	Tricotecenos de tipo B y Zearalenona .....	78
6.3.2.2.	Límite de detección y límite de cuantificación.....	82
6.3.2.2.1.	Fumonisinias B <sub>1</sub> y B <sub>2</sub> .....	82
6.3.2.2.2.	Tricotecenos de tipo B y Zearalenona .....	83
6.3.2.3.	Precisión .....	84
6.3.2.3.1.	Fumonisinia B <sub>1</sub> .....	84
6.3.2.3.2.	Tricotecenos de tipo B y Zearalenona .....	85
6.3.2.4.	Exactitud .....	87
6.3.2.4.1.	Fumonisinia B <sub>1</sub> .....	87
6.3.2.4.2.	Tricotecenos de tipo B y Zearalenona .....	88

6.4. Determinación de la capacidad micotoxigénica, <i>in vitro</i> , de la(s) especie(s) aislada(s).....	89
6.4.1. Producción de micotoxinas <i>in vitro</i> .....	89
6.4.1.1. Aislamiento de <i>F. proliferatum</i> .....	89
6.4.1.2. Aislamiento de <i>F. graminearum</i> .....	91
6.5. Evaluación del efecto de la humedad del grano y temperatura en la producción de micotoxinas .....	95
6.5.1. Determinación de humedad .....	95
6.5.2. Diseño de experimentos.....	96
6.5.2.1. Aislamiento de <i>F. proliferatum</i> .....	98
6.5.2.2. Aislamiento de <i>F. graminearum</i> .....	103
<b>7. CONCLUSIONES.....</b>	<b>110</b>
<b>8. GLOSARIO.....</b>	<b>111</b>
<b>9. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>117</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1. Micotoxinas prevalentes producidas por <i>Fusarium</i> spp. ....	5
Tabla 1-2. Límite máximo permitido de FUMO (FB <sub>1</sub> + FB <sub>2</sub> ) por la Unión Europea. .....	8
Tabla 1-3. Límite máximo permitido de DON por la Unión Europea. ....	11
Tabla 1-4. Límite máximo permitido de ZEA por la Unión Europea. ....	15
Tabla 5-1. Descripción de partidores utilizados en la amplificación de las zonas ITS, TEF 1- $\alpha$ y SSU rRNA. ....	47
Tabla 5-2. Método en gradiente, fase móvil A: H <sub>2</sub> O (0,1% AcAcét), B: ACN (0,1% AcAcét). ....	51
Tabla 5-3. Parámetro analítico evaluado por cada micotoxina. ....	52
Tabla 5-4. Condiciones experimentales para la producción de micotoxinas <i>in vitro</i> . .....	58
Tabla 6-1. Identificación molecular de aislados mediante algoritmo de alineamiento local BLAST .....	65
Tabla 6-2. Parámetros de detección de las micotoxinas en estudio. ....	68
Tabla 6-3. Linealidad de FB <sub>1</sub> y FB <sub>2</sub> en estándar .....	73
Tabla 6-4. Linealidad de TCT-B y ZEA en estándar. ....	75

Tabla 6-5. Linealidad de FB <sub>1</sub> en matriz.....	76
Tabla 6-6. Linealidad de TCT-B y ZEA en matriz.....	79
Tabla 6-7. LOQ de FB <sub>1</sub> y FB <sub>2</sub> en arroz.....	83
Tabla 6-8. LOQ de TCT-B y ZEA en arroz.....	84
Tabla 6-9. Repetibilidad de FB <sub>1</sub> en arroz sobrecargado ( $n = 6$ ).....	84
Tabla 6-10. Precisión intermedia de FB <sub>1</sub> en arroz sobrecargado ( $n = 3$ ; 3 días). .....	85
Tabla 6-11. Repetibilidad de TCT-B y ZEA en arroz sobrecargado ( $n = 6$ ). ....	86
Tabla 6-12. Precisión intermedia de TCT-B y ZEA en arroz sobrecargado ( $n = 4$ ; 3 días).....	86
Tabla 6-13. Recuperación de FB <sub>1</sub> en arroz sobrecargado ( $n = 3$ ; 3 días).....	87
Tabla 6-14. Recuperación de TCT-B y ZEA en arroz sobrecargado ( $n = 4$ ; 3 días). .....	88
Tabla 6-15. Producción de FB <sub>1</sub> por <i>F. proliferatum</i> cepa FMID en arroz. ....	90
Tabla 6-16. Producción de FB <sub>2</sub> por <i>F. proliferatum</i> cepa FMID en arroz.....	90
Tabla 6-17. Producción de DON por <i>F. graminearum</i> cepa FGRAM en arroz..	91
Tabla 6-18. Producción de 3-ADON por <i>F. graminearum</i> cepa FGRAM en arroz. .....	92

Tabla 6-19. Producción de 15-ADON por <i>F. graminearum</i> cepa FGRAM en arroz.....	93
Tabla 6-20. Producción de ZEA por <i>F. graminearum</i> cepa FGRAM en arroz.....	93
Tabla 6-21. Control de humedad en arroz estéril adicionando 40 mL de agua destilada ( $n = 3$ ).....	95
Tabla 6-22. Control de humedad en arroz estéril adicionando 80 mL de agua destilada ( $n = 3$ ).....	96
Tabla 6-23. Evaluación estadística del modelo tras 2 PLS-componentes, ensayo de producción <i>in vitro</i> de <i>F. proliferatum</i> cepa FMID. ....	99
Tabla 6-24. Evaluación estadística del modelo tras 2 PLS-componentes, ensayo de producción <i>in vitro</i> de <i>F. graminearum</i> cepa FGRAM. ....	103

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1. Estructura química fumonisinas.....	6
Figura 1-2. Estructura química TCT.....	9
Figura 1-3. Estructura química ZEA.....	14
Figura 1-4. Esquema y funciones del grupo biosintético de FUMO en <i>F. verticillioides</i> , <i>F. oxysporum</i> y <i>F. proliferatum</i> . ....	17
Figura 1-5. Ruta biosintética propuesta para FUMO.....	20
Figura 1-6. Esquema del grupo biosintético de TCT en <i>F. graminearum</i> .....	23
Figura 1-7. Primeras etapas de la biosíntesis de TCT.....	24
Figura 1-8. Diferenciación TCT-A y TCT-B en (a) <i>F. sporotrichioides</i> (b) <i>F. graminearum</i> .....	25
Figura 1-9. Biosíntesis de (a) T-2 en <i>F. sporotrichioides</i> ; (b) NIV en <i>F. graminearum</i> (quimiotipo NIV). ....	26
Figura 1-10. Biosíntesis de (a) T-2 en <i>F. sporotrichioides</i> ; (b) 3-ADON y 15-ADON en <i>F. graminearum</i> (quimiotipo 3-ADON y 15-ADON). ....	27
Figura 1-11. Ruta biosintética propuesta para ZEA. ....	31
Figura 6-1. (a) Crecimiento micelar de FGRAM sobre medio PDA. (b) Crecimiento micelar de FMID sobre medio PDA; 7 días de incubación.....	62

Figura 6-2. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de productos de PCR para zonas ITS, SSU rRNA y TEF 1- $\alpha$ .....	63
Figura 6-3. Cromatograma de (a) estándar de FB <sub>1</sub> (250 $\mu\text{g L}^{-1}$ ), (b) FB <sub>2</sub> (200 $\mu\text{g L}^{-1}$ ), (c) arroz sobrecargado con FB <sub>1</sub> (25 $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) y (d) arroz blanco derivatizados con OPA. ....	67
Figura 6-4. UPLC-ESI-MS/MS (a) Espectros en modo SCAN, (b) Cromatogramas en modo MRM: estándar de NIV 350 $\mu\text{g L}^{-1}$ ; estándar de DON 350 $\mu\text{g L}^{-1}$ , estándar de 3-ADON 350 $\mu\text{g L}^{-1}$ , estándar de 15-ADON 350 $\mu\text{g L}^{-1}$ , estándar de ZEA 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ , y estándar de $\alpha$ -OTA 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ .....	71
Figura 6-5. Curva de calibración de estándar FB <sub>1</sub> y FB <sub>2</sub> . $n = 2$ ; 3 días distintos. ....	72
Figura 6-6. Curva de calibración de estándar 3-ADON, 15-ADON y ZEA. $n=2$ ; 3 días distintos. ....	74
Figura 6-7. Curva de calibración de estándar NIV y DON. $n=2$ ; 3 días distintos. ....	74
Figura 6-8. Curva de calibración en matriz FB <sub>1</sub> . $n = 2$ ; 3 días distintos.....	76
Figura 6-9. Comparación curva de calibración en estándar y matriz para FB <sub>1</sub> . 77	
Figura 6-10. Curva de calibración en matriz TCT-B y ZEA. $n=2$ ; 3 días distintos. ....	78

Figura 6-11. Comparación curva de calibración en estándar y matriz para NIV. .....	80
Figura 6-12. Comparación curva de calibración en estándar y matriz para DON. .....	80
Figura 6-13. Comparación curva de calibración en estándar y matriz para 3- ADON. ....	81
Figura 6-14. Comparación curva de calibración en estándar y matriz para 15- ADON. ....	81
Figura 6-15. Comparación curva de calibración en estándar y matriz para ZEA. .....	82
Figura 6-16. Gráfico PLS <i>loadings</i> para las respuestas (a) FB <sub>1</sub> y (b) FB <sub>2</sub> , ensayo de producción <i>in vitro</i> de micotoxinas por <i>F. proliferatum</i> cepa FMID. ....	101
Figura 6-17. Gráfico de <i>loadings</i> del primer y segundo PLS-componente con proyecciones para las respuestas (a) DON (b) 3-ADON (c) 15-ADON (d) ZEA; producción <i>in vitro</i> de micotoxinas del aislado de <i>F. graminearum</i> cepa FGRAM. .....	107

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Género *Fusarium*

El género *Fusarium*, perteneciente al reino Fungi, es uno de los géneros más importantes en la producción de micotoxinas a nivel mundial. Fue descrito por primera vez por Link en 1809 en plantas de Malamaceae, posterior a esto, se han descubierto más de mil especies de *Fusarium* (Wei & Wu, 2020). Muchas de estas especies, en condiciones ambientales favorables, principalmente en regiones templadas, pueden producir una variedad de micotoxinas - que son metabolitos secundarios tóxicos - ampliamente distribuidas en la naturaleza y se encuentran comúnmente en cereales cultivados en América, Europa y Asia. Estos hongos causan deterioro en la calidad de los cultivos y de los granos, además de representar riesgos en la salud humana y animal (Kalagatur et al., 2018). Las consecuencias de la ingestión de estos compuestos fúngicos varían desde enfermedades agudas y manifiestas con alta morbilidad y muerte hasta enfermedades crónicas (Escrivá et al., 2015). Se estima, que entre el 10 y el 30% de los granos cosechados se pierden debido a la presencia de infecciones fúngicas, y que aproximadamente un 25% de los cultivos de cereales del mundo están contaminados por algún tipo de micotoxinas (FAO, 2003). Por lo tanto, es importante investigar a miembros del género *Fusarium* desde diferentes perspectivas, dado las toxinas que producen, y el impacto económico y social que tienen en las producciones agrícolas (Hassan et al., 2019).

### 1.1.1. Caracterización molecular

La identificación de hongos asociados a los alimentos ha avanzado por el desarrollo de técnicas moleculares basadas en la amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del genoma fúngico, que detectan secuencias de ADN únicas para una especie o un grupo de especies. Para la identificación específica e inequívoca de especies de *Fusarium* se han diseñado varios cebadores o partidores específicos (Tupaki-Sreepurna & Kindo, 2018). Las regiones y genes utilizados para esto son: factor de elongación de traducción 1- $\alpha$  (TEF 1- $\alpha$ ) (O'Donnell et al., 1998) (O'Donnell et al., 2015), ARN polimerasa II dirigida por ADN más grande (RPB1) y una segunda unidad de ADN más grande (RPB2) (O'Donnell et al., 2010), gen de  $\beta$ -tubulina (O'Donnell & Cigelnik, 1997), gen de calmodulina (O'Donnell et al., 2000), espaciador transcrito interno (ITS) (Rakeman et al., 2005), espaciador intergénico (IGS) (Patiño et al., 2004) (Jurado et al., 2006), los dominios D1 y D2 del ADN ribosómico de subunidad pequeña nuclear (ADNr) (Hall et al., 2004), y las secuencias de ARN de subunidades grandes y pequeñas (Micolog, 2018).

La  $\beta$ -tubulina fue el primer gen que codifica proteínas que usó O' Donnell para la filogenética molecular en *Fusarium* spp. Sin embargo, encontró que su utilidad es limitada debido a la presencia de parálogos divergentes dentro de los complejos de especies de *F. solani*, *F. incarnatum-equiseti* y *F. chlamydosporum* (O'Donnell et al., 1998).

Los cebadores ITS son muy específicos para el género *Fusarium*, siendo seleccionados como “código de barras” (Bluhm et al., 2002), sin embargo su utilidad

para *Fusarium* spp, y muchos otros grupos de hongos (Gazis et al., 2011), está limitado por el hecho de que a menudo no es informativo a nivel de especie y, como TEF 1- $\alpha$ , solo se puede alinear de forma fiable entre los miembros de un complejo de especies o varios estrechamente relacionados. En linajes fitopatológicamente importantes recientemente evolucionados como *F. graminearum* (Hao et al., 2017), *F. oxysporum* (O'Donnell et al., 2009) y complejos de especies de *F. fujikuroi* (O'Donnell et al., 2000), muchas de las especies comparten alelos idénticos o casi idénticos de ADNr ITS.

Dentro de las especies de *Fusarium* las principales micotoxinas que se encuentran en los alimentos son los tricotecenos (TCT), zearalenona (ZEA) (Rosa Seus Arraché et al., 2018) y las fumonisinas (FUMO) (Smith et al., 2017). A partir del estudio de la región IGS, se utilizaron partidores específicos (VERT1 - VERT2) y del gen de calmodulina (VER1 - VER2) para *F. verticillioides* (Nagaraj et al., 2016). Y cebadores específicos Fp3F - Fp4R (IGS) y PRO1 - PRO2 (calmodulina) para *F. proliferatum*, permitiendo así discriminar entre ambas especies productoras de FUMO (Visentin et al., 2009). También se han utilizado secuencias de ITS para la detección de *Fusarium* spp, potencialmente productores de FUMO (Grimm & Geisen, 1998).

Para *Fusarium* productores de TCT, se obtuvieron diversos partidores especie específicos FP82F/R (*F. culmorum*) (Nicholson et al., 1998), Fg16F/R (*F. graminearum*) (Nicolaisen et al., 2005) (Garmendia et al., 2018) y AF330109CF/R (*F. sporotrichioides*) (Demeke et al., 2005), esto permite identificar entre las tres especies principales productoras de TCT.

## 1.2. Micotoxinas producidas por *Fusarium* spp

Las micotoxinas son metabolitos secundarios tóxicos de bajo peso molecular, aproximadamente de < 1000 Da, producidos por muchas especies de hongos que colonizan una variedad de cultivos, incluidos; cebada, avena, arroz, centeno, trigo y maíz (Escrivá et al., 2015; Santini et al., 2009), conduciendo al desarrollo de enfermedades (micotoxicosis) en humanos y animales, por vía directa (a través de los alimentos de origen vegetal) o indirecta (por alimentos de origen animal, provenientes de animales alimentados con granos contaminados) (Marin et al., 2013). El crecimiento de hongos y la producción de micotoxinas son el resultado de la interacción compleja de varios factores (como la temperatura ambiental, humedad, disponibilidad de agua) (Al-Taher et al., 2017) contaminando los alimentos a lo largo de la cadena alimentaria; en el proceso, transporte o almacenamiento. Por lo tanto, la comprensión de cada factor involucrado es esencial para entender el proceso general y para predecir y prevenir el desarrollo de micotoxinas (Ramirez et al., 2006).

Las especies de *Fusarium* producen tres de las más importantes clases de micotoxinas con respecto a la salud y la producción animal: FUMO, ZEA y TCT (deoxinivalenol (DON), nivalenol (NIV), toxinas T-2 y HT-2), también producen micotoxinas emergentes, como fusaproliferina (FUS), beauvericina (BEA), eniantinas (ENN) y moniliformina (MON), que se han descubierto más

recientemente y son menos estudiadas (Tabla 1-1) (Choi et al., 2021; Jerome Jeyakumar et al., 2018).

Tabla 1-1. Micotoxinas prevalentes producidas por *Fusarium* spp.

<b><i>Fusarium</i> spp</b>	<b>Micotoxinas</b>
<b><i>F. proliferatum</i></b>	FUMO, BEA, FUS
<b><i>F. verticillioides</i></b>	FUMO, ZEA
<b><i>F. oxysporum</i></b>	FUMO
<b><i>F. graminearum</i></b>	DON, NIV, ZEA
<b><i>F. culmorum</i></b>	DON, NIV, ZEA
<b><i>F. poae</i></b>	HT-2, T-2, ENN, FUS
<b><i>F. equiseti</i></b>	T-2
<b><i>F. acuminatum</i></b>	HT-2, T-2

### 1.2.1. Fumonisinias

Las fumonisinias son un grupo de micotoxinas no fluorescentes, solubles en agua y solventes polares, con una fuerte similitud estructural con la esfinganina, el precursor principal de los esfingolípidos, que son lípidos de membrana, que desempeñan un papel importante en la regulación y transporte de las membranas celulares, (Escrivá et al., 2015). Se aislaron inicialmente de cultivos de maíz de *F. moniliforme* en Sudáfrica (Gelderblom et al., 1988). Posteriormente, de otras

especies de *Fusarium* como *F. verticillioides* y *F. proliferatum* que son las principales especies productoras de FUMO (Bezuidenhout et al., 1988).

Las FUMO se dividen en cuatro categorías: FUMO A (A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> y A<sub>3</sub>), FUMO B (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> y B<sub>3</sub>), FUMO C (C<sub>1</sub>, C<sub>3</sub> y C<sub>4</sub>) y FUMO P (P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub> y P<sub>3</sub>), las más importantes son las de la serie B, siendo la fumonisina B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>) la más prevalente en términos de toxicidad y ocurrencia (Ahangarkani et al., 2014). FB<sub>1</sub> es un diéster del ácido propano-1, 2, 3-tricarboxílico (TCA) y 2S-amino-12S, 16R-dimetil-3S, 5R, 10R, 14S, 15R-pentahidroieicosano, donde los grupos hidroxilo C-14 y C-15 están esterificados con el grupo carboxi terminal del ácido propano-1,2,3-tricarboxílico. FB<sub>2</sub> es un 10-desoxi FB<sub>1</sub>, mientras que FB<sub>3</sub> es un 5-desoxi FB<sub>1</sub> (Figura 1-1) (Soriano et al., 2005).

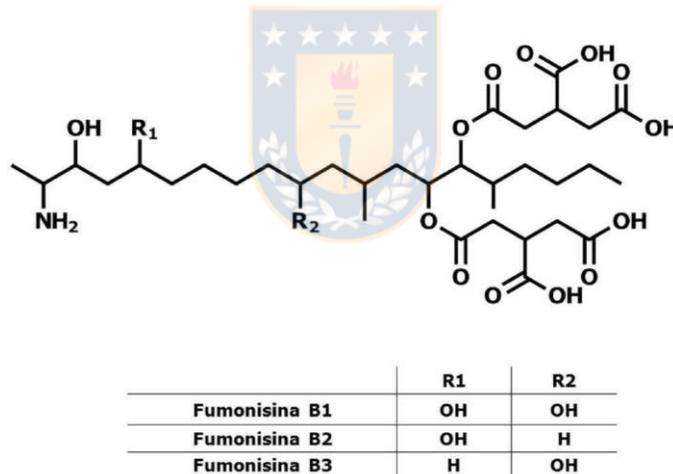


Figura 1-1. Estructura química fumonisinas.

Este grupo de micotoxinas, especialmente FB<sub>1</sub>, inhibe fuertemente la enzima ceramida sintasa que cataliza la acilación de esfinganina y el reciclaje de esfingosina. La inhibición de la enzima ceramida sintasa aumenta la esfingosina intracelular y otras bases esfingoides, que son compuestos altamente citotóxicos.

Este desequilibrio ha sido propuesto como el principal responsable de su toxicidad, basado en estudios celulares y confirmado por estudios en animales (Norred et al., 1992; Marin et al., 2013).

El consumo de alimentos contaminados con FUMO se ha asociado a diversos síntomas que incluyen: leucoencefalomalacia en equinos, toxicidad hepática y renal en roedores, edema pulmonar en cerdos y cáncer de esófago y defectos del tubo neural en humanos (Cendoya et al., 2018; Ji et al., 2019). No tienen mutagenicidad, sin embargo, debido al efecto toxicológico en animales y humanos, las FB<sub>1</sub> y FB<sub>2</sub> han sido clasificadas como carcinógenos del grupo o tipo "2B" "posiblemente cancerígeno en seres humanos" por la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC) (IARC, 1993).



La fumonisina B<sub>1</sub> es la micotoxina más abundante y contaminante que se encuentra en el maíz y productos en base a maíz, especialmente cuando se cultivan en regiones más cálidas. *F. verticillioides* y *F. proliferatum* crecen en un amplio rango de temperaturas, pero solo en actividades de agua relativamente elevadas ( $a_w > 0,9$ ). Las FUMO se forman en el maíz antes de la cosecha o durante la etapa inicial de almacenamiento. Son bastante estables al calor y el contenido de toxinas se reduce significativamente solo durante los procesos en los que la temperatura excede 150 °C (Marin et al., 2013; EFSA, 2005).

La Unión Europea ha legislado los niveles máximos permisibles de FUMO en maíz y productos en base a maíz (Tabla 1-2) (European Commission, 2006). Así como también la legislación chilena, en el Reglamento Sanitario de los Alimentos,

establece un límite máximo para las FUMO de 4000  $\mu\text{g kg}^{-1}$  en maíz no elaborado y 1000  $\mu\text{g kg}^{-1}$  en maíz y sus derivados para consumo directo (Ministerio de Salud, 2021).

Tabla 1-2. Límite máximo permitido de FUMO (FB<sub>1</sub> + FB<sub>2</sub>) por la Unión Europea.

<b>Producto alimenticio</b>	<b>Contenidos máximos (<math>\mu\text{g kg}^{-1}</math>)</b>
<b>Maíz no elaborado</b>	2000
<b>Harina de maíz, maíz molido, maíz triturado, germen de maíz y aceite de maíz refinado</b>	1000
<b>Alimentos a base de maíz destinados al consumo humano directo</b>	400
<b>Alimentos elaborados a base de maíz y alimentos infantiles para lactantes y niños de corta edad</b>	200

### 1.2.2. Tricotecenos

Los tricotecenos son la clase de micotoxinas más importante del género *Fusarium*, se encuentran en diversos tipos de cereales (cebada, maíz, avena, arroz, centeno y trigo), presentan pesos moleculares que oscilan entre 200 y 500 Da, altamente estables, tanto durante el almacenamiento/molienda como en el procesamiento/cocción de los alimentos, y no se degradan con las altas temperaturas (McCormick et al., 2011). Los TCT son químicamente diversos,

incluyen más de 200 toxinas que tienen una estructura sesquiterpenoide cíclica con un grupo 12,13-epoxitricoteceno común responsable de su citotoxicidad y un doble enlace 9,10 con varias sustituciones de la cadena lateral (Pinton & Oswald, 2014). Se pueden clasificar en cuatro categorías (tipos A, B, C y D) según los grupos funcionales característicos (Figura 1-2).

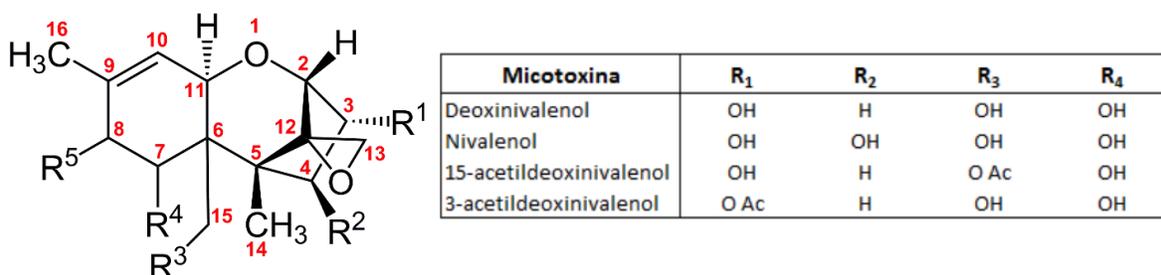


Figura 1-2. Estructura química TCT.

Los tipos A, B y C se pueden diferenciar en función de la sustitución en la posición C-8. Los TCT no macrocíclicos constituyen dos grupos: el tipo A que tiene un grupo de sustitución hidroxilo, éster o sin oxígeno en C-8, que incluye la toxina T-2, HT-2, producidas por *F. sporotrichioides*, *F. langsethiae*, *F. acuminatum* y *F. poae*, y las micotoxinas neosolanol (NeoSol) y diacetoxiscirpenol (DAS), mientras que el grupo de tipo B contiene una función ceto (carbonilo) en C-8 e incluye DON y sus derivados, 3-acetildeoxinivalenol (3-ADON) y 15-acetildeoxinivalenol (15-ADON), y NIV, junto con el precursor acetilado de NIV (4-acetilnivalenol, también denominado Fusarenon-X (FUX)). Las especies características de los tricotecenos de tipo B (TCT-B) son *F. culmorum*, *F. cerealis* y *F. graminearum*. Los tipos C y D incluyen algunos TCT de menor importancia que no son producidos por hongos pertenecientes al género *Fusarium* (Escrivá et al., 2015; Ji et al., 2019).

La toxicidad de los TCT se debe a que son potentes inhibidores de la síntesis proteica, uniéndose a la subunidad ribosómica 60S e interactuando con la enzima peptidiltransferasa. Esta interacción conduce a diversos grados de inhibición de la formación de enlaces peptídicos, la cual depende de la estructura química del tipo de tricoteceno (Marin et al., 2013). Estas micotoxinas pueden causar retraso del crecimiento, trastornos reproductivos, supresión del sistema inmunológico, anorexia, vómitos, hemorragias, diarrea e incluso la muerte en animales (Huang et al., 2019).

Los TCT más comúnmente encontrados son los del grupo B, DON y NIV, seguidos por T-2, HT-2 y por los derivados acetilados 3 y 15-ADON (Huang et al., 2019; Santini et al., 2009).

DON se encuentra en todo tipo de cereales, como: trigo, centeno, cebada y avena, es estable a temperaturas extremas (120-180 °C) y soluble en solventes orgánicos polares como acetonitrilo (ACN), cloroformo (CHCl<sub>3</sub>), metanol (MeOH), etanol (EtOH) y acetato de etilo (AcEt) (EFSA, 2005). La ingestión de alimentos contaminados con DON se ha asociado a alteraciones del sistema intestinal, inmunológico, endocrino y nervioso, dando lugar, en casos de exposición aguda, a enfermedades caracterizadas por vómitos (por eso también es conocido como vomitoxina), dolor de cabeza, mareos, trastornos digestivos, daño oxidativo, y toxicidades reproductivas en animales y seres humanos (Berthiller et al., 2011; Ji et al., 2019). Sin embargo, esta micotoxina es clasificada en el grupo 3 por la IARC como “no carcinógeno en seres humanos” (IARC, 1993). La toxicidad del DON se

basa en su capacidad para cruzar las barreras biológicas y afectar las funciones y la viabilidad de células y órganos (Maresca, 2013). La Organización Mundial de la Salud (OMS) considera al DON como un agente teratógeno, neurotóxico e inmunosupresor.

La Unión Europea ha legislado los niveles máximos permisibles de DON en alimentos para bebés y productos en base a cereales (Tabla 1-3) (European Commission, 2006). La legislación chilena, en el Reglamento Sanitario de los Alimentos, establece un límite máximo para DON de  $750 \mu\text{g kg}^{-1}$  en cereales y sus derivados (Ministerio de Salud, 2021).

Tabla 1-3. Límite máximo permitido de DON por la Unión Europea.

<b>Producto alimenticio</b>	<b>Contenidos máximos (<math>\mu\text{g kg}^{-1}</math>)</b>
<b>Cereales no elaborados que no sean trigo duro, avena y maíz</b>	1250
<b>Trigo duro y avena no elaborados</b>	1750
<b>Maíz no elaborado</b>	1750
<b>Cereales destinados al consumo humano directo, harina de cereales (incluida la harina de maíz, maíz triturado y molido), salvado como producto final comercializado para el consumo humano directo y germen</b>	750

<b>Alimentos elaborados a base de cereales y alimentos infantiles para lactantes y niños de corta edad</b>	200
<b>Pan (incluidos pequeños productos de panadería), pasteles, galletas, aperitivos de cereales y cereales para desayuno</b>	500
<b>Pasta seca</b>	750

El nivalenol suele coexistir con DON en los cultivos de maíz, cebada y trigo, son similares en términos de estructura química, y también comparten muchas propiedades toxicológicas, ambas toxinas inhiben la síntesis de proteínas y aumentan los niveles de MAPKs activadas por estrés y la fosfatasa alcalina sérica (Escrivá et al., 2015). Entre las diversas micotoxinas de *Fusarium*, NIV ejerció uno de los mayores efectos inmunosupresores *in vitro* en células mononucleares de sangre periférica humana (Nagashima & Nakagawa, 2014). La IARC lo clasifica en el grupo 3 de “no carcinógeno en seres humanos” (IARC, 1993).

La Unión Europea y la legislación chilena en el Reglamento Sanitario de los Alimentos, no establecen límites máximos permitidos para NIV en cereales.

La toxina T-2 es la micotoxina de TCT más común del grupo A y uno de los miembros más tóxicos de la familia de los TCT, presente en el trigo, el centeno, el maíz y la soja; aunque se detecta con menor frecuencia en comparación con los otros TCT (Escrivá et al., 2015). El principal efecto de la toxina T-2 es la inhibición

de la síntesis de proteínas, lo que conduce a una alteración secundaria de la síntesis de ADN y ARN (Seeboth et al., 2012). La toxina T-2 causa una amplia gama de efectos tóxicos en los animales, como pérdida de peso, emesis, diarrea, letargo, inhibición de la inmunidad, necrosis, daño de los tejidos cartilagosos, disminución del recuento de células sanguíneas y leucocitos, hemorragia, reducción de la glucosa plasmática y cambios patológicos en el hígado y el estómago (Li et al., 2011). A pesar de que los metabolitos de la toxina T-2 y sus estructuras asociadas son bien conocidos, la toxicidad de estos compuestos en animales y seres humanos no se comprende claramente debido a los limitados estudios en animales (Ji et al., 2019).

La toxina HT-2 se ha identificado como el principal metabolito de la toxina T-2 tanto *in vivo* como *in vitro*, y su toxicidad es bastante similar a la de la toxina T-2, ya que T-2 se metaboliza rápidamente a HT-2 y, por lo tanto, la toxicidad de T-2 puede atribuirse en parte a la eficiencia de la formación de HT-2 (Ndossi et al., 2012).

### 1.2.3. Zearalenona

La zearalenona es una micotoxina estrogénica no esteroidal, se describe químicamente como lactona del ácido 6-(10-hidroxi-6-oxo-trans-1-undecenil)- $\beta$ -resorcílico (Figura 1-3), es producida por varias especies de hongos de *Fusarium*. El principal productor de ZEA es *F. graminearum*. Otras especies del género *Fusarium* capaces de producirla incluyen *F. culmorum*, *F. verticillioides*, *F. sporotrichioides*, *F. semitectum*, *F. equiseti* y *F. oxysporum* (Frizzell et al., 2011).

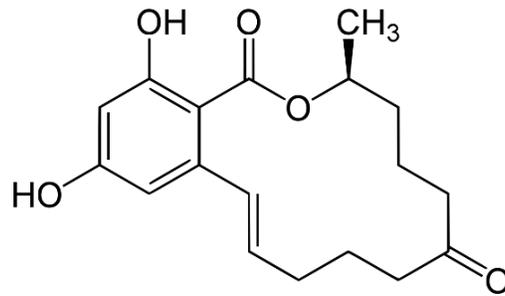


Figura 1-3. Estructura química ZEA.

La zearalenona se considera, después del DON, la segunda micotoxina más común que se encuentra en muestras de granos de maíz sin procesar, también contamina cebada, avena, trigo, mijo, arroz, malta, soja y cerveza, pero en menor proporción (Streit et al., 2012). El maíz es un hospedador importante, y dado que las mismas condiciones de cultivo favorecen la formación de aflatoxinas (AF) y de FUMO, pudiese contaminarse simultáneamente con AF, FUMO, TCT y ZEA. Existen múltiples estudios que muestran la coexistencia de ZEA con otras micotoxinas e indica que estas micotoxinas podrían estar involucradas en una amplia gama de interacciones sinérgicas y aditivas (Vandicke et al., 2019).

La zearalenona es una toxina cristalina blanquecina con un punto de fusión de 164 °C a 165 °C, es liposobuble, insoluble en agua, soluble en álcalis y varios solventes orgánicos. ZEA es termoestable durante el almacenamiento, la molienda, el procesamiento y la cocción (EFSA, 2005).

El principal objetivo de esta micotoxina es el sistema reproductivo debido a la similitud estructural de ZEA y algunos de sus metabolitos ( $\alpha$ -ZEN y  $\beta$ -ZEN) con las

hormonas estrogénicas (Koraichi et al., 2012). En animales de laboratorio, principalmente en cerdos que son considerados las especies animales más sensibles, los efectos tóxicos incluyeron cambios en el tracto reproductivo, agrandamiento uterino, reducción de la fertilidad, aumento de la reabsorción embrionaria letal y cambios en niveles séricos de progesterona y estradiol (Zhang et al., 2014). En humanos, algunos estudios muestran una relación entre la pubertad precoz o la incidencia de adenocarcinomas de endometrio. La zearalenona es inmunotóxica, hematotóxica, hepatotóxica y nefrotóxica y un potenciador de la peroxidación lipídica, es clasificada en el grupo 3 como “no carcinógeno en seres humanos” por la IARC (IARC, 1993).

Los niveles de ZEA están regulados por la Unión Europea estableciendo como límites máximos permitidos los presentes en la Tabla 1-4. La legislación chilena, en el Reglamento Sanitario de los Alimentos, establece un límite máximo para ZEA de 200  $\mu\text{g kg}^{-1}$  en cereales y sus derivados (Ministerio de Salud, 2021).

Tabla 1-4. Límite máximo permitido de ZEA por la Unión Europea.

<b>Producto alimenticio</b>	<b>Contenidos máximos (<math>\mu\text{g kg}^{-1}</math>)</b>
<b>Cereales no elaborados distinto al maíz</b>	100
<b>Maíz no elaborado</b>	200

<b>Cereales destinados al consumo humano directo, harina de cereales (incluida la harina de maíz, maíz triturado y molido), salvado como producto final comercializado para el consumo humano directo y germen</b>	75
<b>Maíz destinado al consumo humano directo, harina de maíz, maíz molido, maíz triturado y aceite de maíz refinado</b>	200
<b>Aperitivos de maíz y cereales para el desayuno a base de maíz</b>	50
<b>Pan (incluidos pequeños productos de panadería), pasteles, galletas, aperitivos de cereales y cereales para desayuno, excluidos los aperitivos de maíz y los cereales para el desayuno a base de maíz</b>	50
<b>Alimentos elaborados a base de cereales (excluidos los alimentos elaborados a base de maíz) y alimentos infantiles para lactantes y niños de corta edad</b>	20
<b>Alimentos elaborados a base de maíz para lactantes y niños de corta edad</b>	20

### 1.3. Biosíntesis

#### 1.3.1. Fumonisinias

Las FUMO son micotoxinas estructuralmente simples, pero su biosíntesis requiere un complejo grupo de genes de 42 kb de longitud (Desjardins & Proctor, 2007). F.

*verticillioides* reveló la presencia de dos genes adicionales (*FUM20* y *FUM21*) en el grupo FUM, como resultado el grupo FUM contiene 17 genes co-regulados (Figura 1-4). Las funciones bioquímicas generales de los genes *FUM* se predijeron basándose en similitudes de sus secuencias de aminoácidos deducidas con proteínas con funciones conocidas (Figura 1-4) (Gil-Serna et al., 2020).

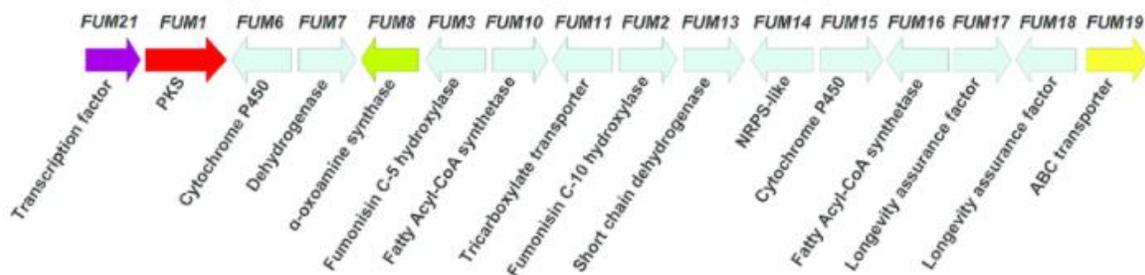


Figura 1-4. Esquema y funciones del grupo biosintético de FUMO en *F. verticillioides*, *F. oxysporum* y *F. proliferatum*.

El primer *FUM1*, considerado el gen clave de esta vía, que codifica el complejo enzimático policétido sintasa que cataliza el paso inicial para la biosíntesis de FUMO, por lo tanto, su disrupción produce el bloqueo de la producción de FUMO en especies de *Fusarium* (Alexander et al., 2009). Además, se ha identificado una correlación positiva entre la proporción de transcripciones de *FUM1* que se estiman mediante RT-PCR en tiempo real y la proporción de FUMO biosintetizadas (López-Errasquín et al., 2007).

El gen *FUM8* codifica una  $\alpha$ -oxoamina sintasa que media si la especie de *Fusarium* produce FUMO del tipo B (FB) o C (FC), al catalizar la condensación del policétido

lineal con alanina para producir FB o con glicina para producir FC. El gen *FUM19* se encuentra a una distancia de 35 kb del gen *FUM1* que expresa un transportador de unión a ATP responsable de exportar FUMO extracelulares. Además, la expresión de una aminotransferasa por *FUM8* funciona para mantener la molécula FB<sub>1</sub> biológicamente activa (Madhu Kamle et al., 2019). Ha sido descrito un regulador transcripcional, *FUM21*, primero en *F. verticillioides* y luego en otros miembros del complejo de especies de *F. fujikuroi* como *F. proliferatum*. La proteína del gen *FUM21*, Fum21p, presenta un dominio de unión a Zn (II) 2Cys6DNA que sugiere su participación en la regulación transcripcional, aunque no hay informes que describan los elementos promotores reconocidos para activar la transcripción de genes biosintéticos de FUMO. Sin embargo, la participación de *FUM21* en la regulación de la síntesis de FUMO es evidente, ya que sus mutantes tienen una expresión drásticamente modificada de genes biosintéticos como *FUM1* y *FUM8* (Brown et al., 2007; Madhu Kamle, et. al, 2019).

El número, orden y orientación de los genes dentro de los grupos *FUM* en *F. verticillioides*, *F. oxysporum* y *F. proliferatum* son los mismos. Sin embargo, las secuencias que flanquean los grupos difieren, lo que indica que el grupo se encuentra en una ubicación genómica diferente en estas tres especies (Proctor et al., 2013). Aparte de estas especies incluidas en el complejo de especies de *F. fujikuroi*, se ha informado de otras especies relacionadas filogenéticamente distantes como productoras de FUMO. Se detectó FB<sub>2</sub> en cultivos de tres cepas de

*Aspergillus niger* que consta de once homólogos de los genes *FUM* de *Fusarium* (Pel et al., 2007).

La ruta biosintética para FUMO se ha sugerido basándose en estudios de genética molecular, bioquímica y química analítica (Figura 1-5) (Alexander et al., 2009). Sin embargo, se ha encontrado que existen diferencias en la biosíntesis de FUMO dependiendo de las condiciones ambientales, como la temperatura, la longitud de onda de la luz, la actividad de agua, tipo de soluto y la humedad (Fanelli et al., 2012).

La ruta biosintética propuesta para FUMO comienza cuando la proteína Fum1p del gen *FUM1* cataliza la condensación de 9 unidades de acetato y 2 de metilo para formar un policétido lineal de 18 carbonos de longitud (Gerber et al., 2009). En el segundo paso de la ruta, la proteína del gen *FUM8*, Fum8p, cataliza la condensación del policétido lineal y la alanina para producir una molécula lineal que tiene 20 carbonos de largo y tiene una amina en C-2, un carbonilo en C-3 y funciones metilo en C-12 y C-16 (Du et al., 2008).

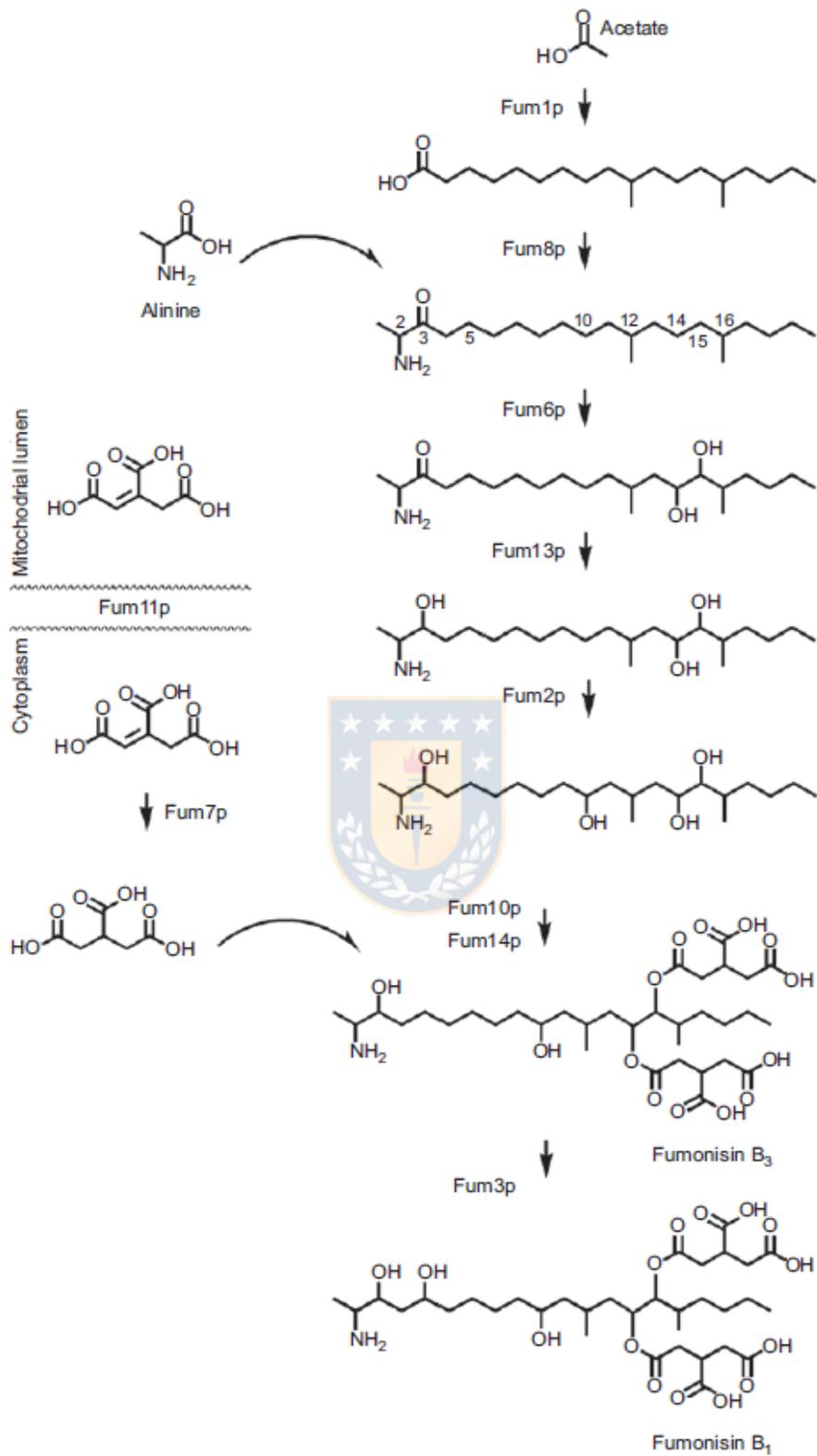


Figura 1-5. Ruta biosintética propuesta para FUMO.

El tercer paso es catalizado por la proteína *FUM6*, Fum6p, y consiste en la hidroxilación del producto de condensación policétido-aminoácido en C-14 y C-15. La reducción del carbonilo en C-3 es catalizada por Fum13p (Butchko et al., 2003), y lo más probable es que la hidroxilación de C-10 sea catalizada por Fum2p. La evidencia de esto es que los mutantes por delección de *FUM2* y las variantes naturales producen FUMO que carecen del hidroxilo en C-10. Además, la secuencia de aminoácidos predicha de Fum2p es muy similar a las monooxigenasas del citocromo P450, que son enzimas que a menudo catalizan reacciones de hidroxilación (Proctor et al., 2006).

La esterificación de los restos tricarbóxicos a los hidroxilos en C-14 y C-15 de las FUMO son catalizados por Fum14p. La esterificación catalizada por Fum14p de la cadena principal de fumonisina indica que la formación de enlaces éster y amida puede implicar mecanismos enzimáticos similares. Aunque Fum14p cataliza la esterificación en C-14 y C-15, el análisis de delección de genes indica que Fum7p, Fum10p y Fum11p también contribuyen a la formación de los ésteres tricarbóxicos. Fum10p es una acil-CoA sintetasa/acil-proteína sintetasa, un grupo de enzimas que catalizan la formación de tioésteres de ácidos carboxílicos a coenzima A (CoA) y proteínas. (Alexander et al., 2009; Proctor et al., 2006). Los mutantes por delección de *FUM7* producen análogos de FUMO con un solo doble enlace carbono-carbono en cada uno de los ésteres tricarbóxicos. Fum7p es más similar a las deshidrogenasas que contienen hierro, una clase de enzimas que a veces catalizan la reducción de los dobles enlaces carbono-carbono. Fum11p es similar a las

proteínas incrustadas en la membrana mitocondrial interna que transportan intermediarios de ácido tricarbóxico desde el ciclo de Krebs fuera del lumen mitocondrial. Con base en estos datos, se propuso que Fum11p transporta ácido tricarbóxico fuera del lumen mitocondrial interno con el fin de hacerlos disponibles para la biosíntesis de FUMO en el citoplasma y en la membrana del retículo endoplasmático (Brown et al., 2007). La producción de niveles reducidos de FB<sub>1</sub>, FB<sub>2</sub>, FB<sub>3</sub> y FB<sub>4</sub> por mutantes *FUM11* sugiere que otros transportes de ácido tricarbóxico en *F. verticillioides* pueden compensar parcialmente la ausencia de Fum11p. El paso final en la ruta biosintética de FUMO es la hidroxilación catalizada por Fum3p del esqueleto de fumonisina en C-5.

Los otros genes del grupo FUM (*FUM15*, *FUM16*, *FUM17*, *FUM18*, *FUM19* y *FUM21*) tienen papeles indirectos en la biosíntesis de FUMO o no son esenciales para la producción de FB<sub>1</sub>, FB<sub>2</sub>, FB<sub>3</sub> o FB<sub>4</sub> (Alexander et al., 2009; Ding et al., 2004).

### 1.3.2. Tricotecenos

La ruta biosintética de los TCT se ha analizado principalmente en especies patógenas pertenecientes al género *Fusarium* (Aoki et al., 2014). Las enzimas implicadas en la biosíntesis de los TCT junto con sus elementos reguladores están codificadas por 15 genes distribuidos en 3 loci diferentes (Merhej et al., 2012). El grupo TRI central presenta 10 genes co-regulados, incluido el gen *TRI5* codifica la enzima tricodieno sintasa y que fue clonado desde *F. sporotrichioides* en 1989 (Moretti et al., 2013). Estos 10 genes codificaron 7 genes de vías estructurales, 2

genes reguladores y 1 transportador (Figura 1-6) (Kimura et al., 2007). Además, 2 regiones genómicas adicionales presentan genes implicados en la biosíntesis de TCT en *F. sporotrichioides* y *F. graminearum*: el locus de 2 genes *TR1-TR16* y el locus *TR101* de un solo gen (Gil-Serna et al., 2020).

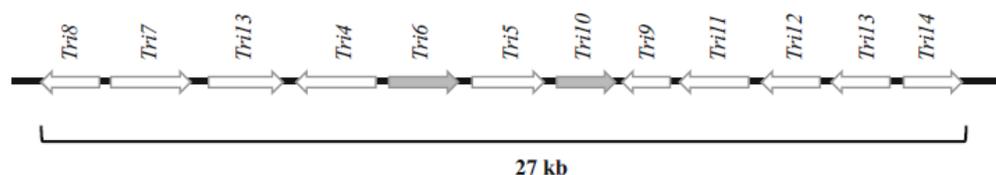


Figura 1-6. Esquema del grupo biosintético de TCT en *F. graminearum*.

La biosíntesis de TCT es iniciada por un sesquiterpeno ciclasa que produce tricodieno desde su sustrato, pirofosfato de farnesilo (Canevascini et al., 1996). Un citocromo P450 monooxigenasa multifuncional, codificado por *TRI4*, cataliza los siguientes cuatro pasos en la ruta (Figura 1-7): hidroxilación C-2, epoxidación C-12,13, seguida de hidroxilación en C-11 y C-3 (Tokai et al., 2007). El producto, isotricotriol, se somete a dos etapas de isomerización no enzimática formando el anillo central de isotricodermol, que consiste en la estructura del esqueleto del TCT base con un grupo hidroxilo C-3 (Nora A. Foroud et al., 2019).

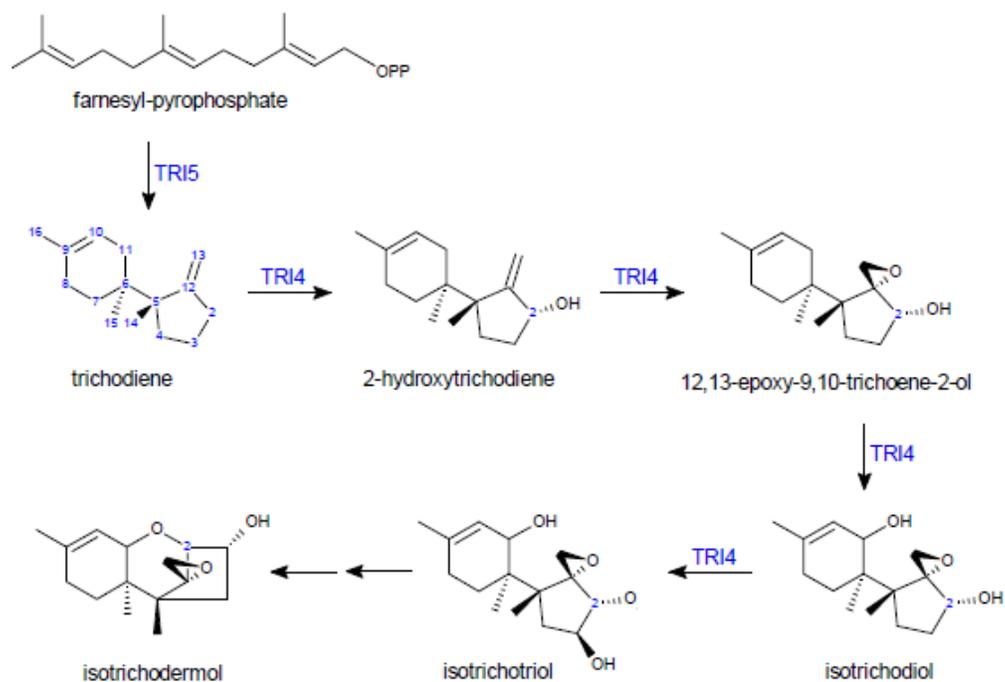


Figura 1-7. Primeras etapas de la biosíntesis de TCT.

El grupo *TRI1-TRI16* es responsable de coordinar el grupo funcional en C-8 y, por lo tanto, participa en la diferenciación de los TCT de tipo A y de tipo B. *TRI1* es necesario para la oxigenación en C-8, catalizando la adición de un grupo hidroxilo (Meek et al., 2003), en *F. graminearum* este grupo puede esterificarse mediante *TRI16* a un grupo isovalerato, como se encuentra en la toxina T-2 y la toxina HT-2, mientras que el gen *TRI16* no es funcional en *F. graminearum* (Figura 1-8) (Nora A. Foroud et al., 2019).

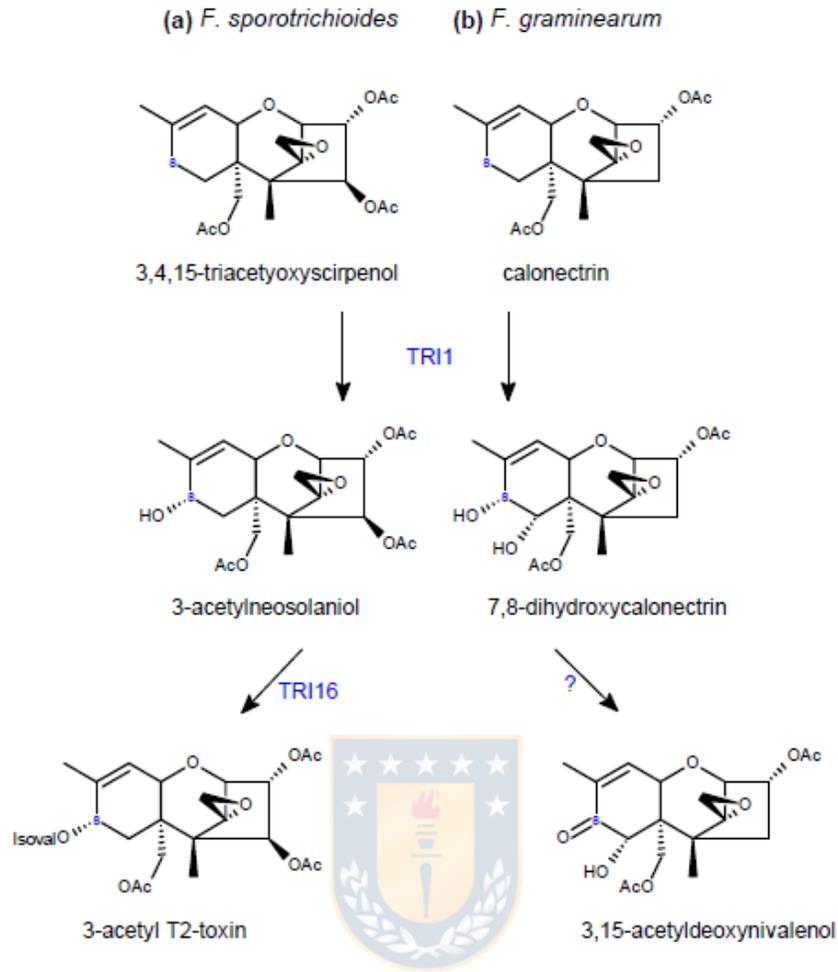


Figura 1-8. Diferenciación TCT-A y TCT-B en (a) *F. sporotrichioides* (b) *F. graminearum*.

*TRI13* es necesario para la oxigenación y *TRI7* para la acetilación en C-4, desempeñando papeles claves en la producción de NIV en *F. graminearum* y la producción de toxina T-2 en *F. sporotrichioides* (Figura 1-9) (Brown et al., 2007).

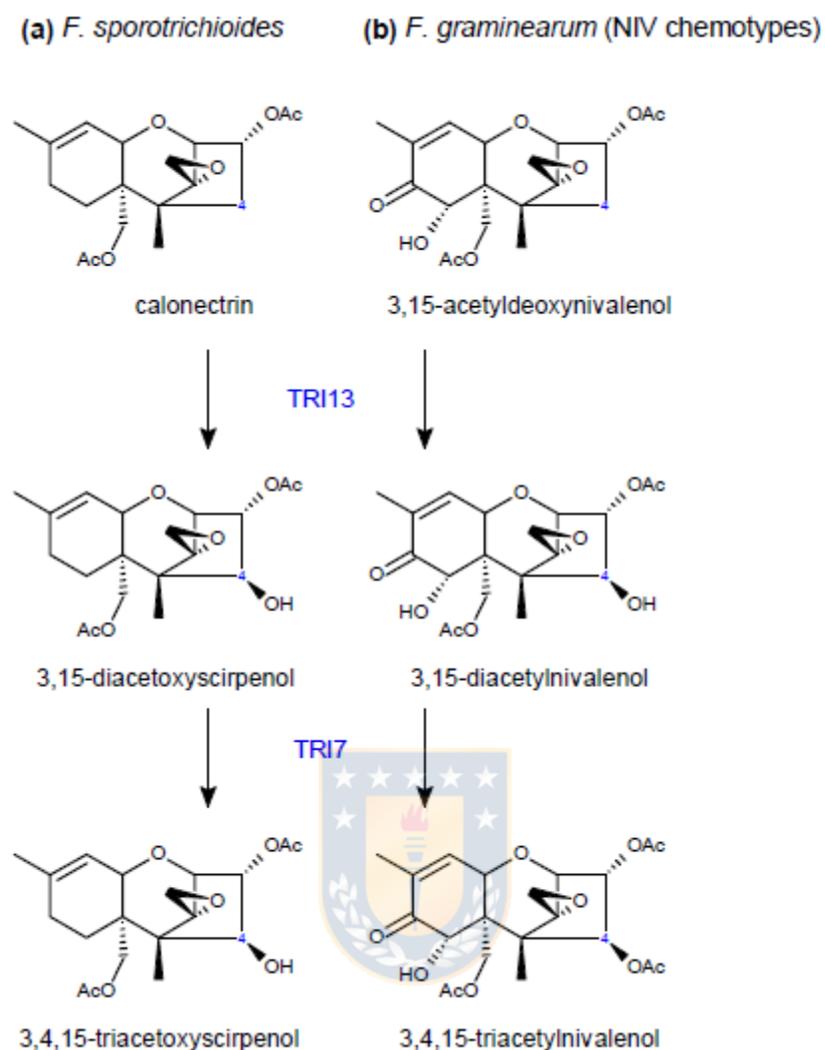


Figura 1-9. Biosíntesis de (a) T-2 en *F. sporotrichioides*; (b) NIV en *F. graminearum* (quimiotipo NIV).

Ambos genes han perdido funcionalidad en los quimiotipos DON, de ahí la ausencia del hidroxilo C-4 en esta toxina. Los quimiotipos DON también producen derivados acetilados, 3-ADON o 15-ADON, mediante la desacetilación en C-3 o C-15 de 3-ADON o 15-ADON, respectivamente, que originalmente está acetilado por *TRI101* y *TRI3* (Alexander et al., 2009; Nora A. Foroud et al., 2019).

Las variaciones alélicas de *F. graminearum* *TRI8* determinan la estereoespecificidad de la esterasa codificada, determinando así si el quimiotipo DON en una cepa de *F. graminearum* dada produce 3-ADON o 15-ADON (Figura 1-10). En *F. sporotrichioides*, *TRI8* es una esterasa en C-3 necesaria para la biosíntesis de la toxina T-2, que lleva un grupo hidroxilo en esta posición (McCormick et al., 2011).

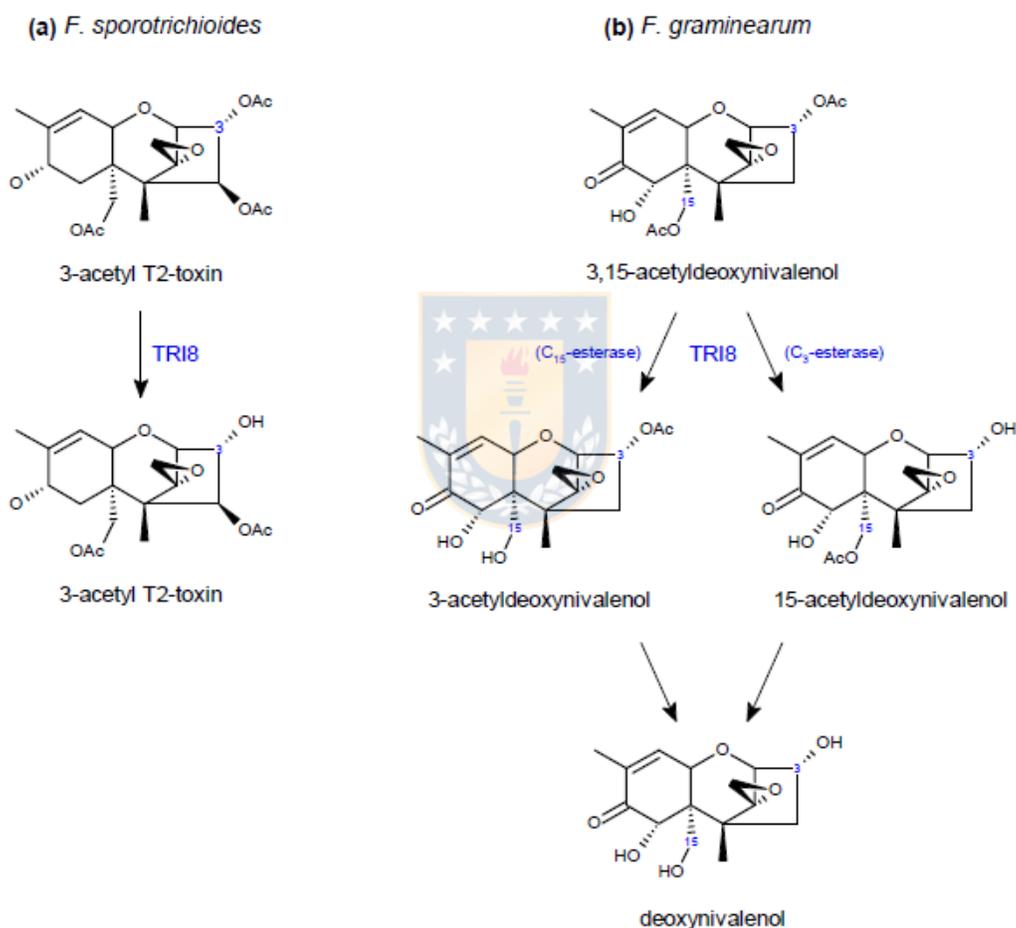


Figura 1-10. Biosíntesis de (a) T-2 en *F. sporotrichioides*; (b) 3-ADON y 15-ADON en *F. graminearum* (quimiotipo 3-ADON y 15-ADON).

Los análisis de secuencia de genes TRI se utilizan para predecir quimiotipos de TCT de diferentes cepas de *Fusarium*, aunque es necesario un análisis bioquímico para confirmar la producción de micotoxinas (Anne E. Desjardins, 2008).

#### 1.3.2.1. Quimiotipos de *F. graminearum*

Los quimiotipos de *Fusarium* son fuertemente influenciados por factores climáticos y el estado nutricional de los granos de cereales o del sustrato (Nora A. Foroud et al., 2014; Pasquali et al., 2016). *F. graminearum* se caracteriza por ser productor de TCT-B y dependiendo el tipo de micotoxina producida, se pueden distinguir tres quimiotipos (Yörük & Albayrak, 2012): los quimiotipos de DON que producen los derivados acetilados: 3-ADON o 15-ADON, los cuales históricamente se aislaron en Eurasia, siendo el quimiotipo 15-ADON más abundante en América del Norte y en el norte y centro de Europa (Mirocha et al., 1989), mientras que el quimiotipo 3-ADON es más frecuente en regiones del noroeste de Europa (Aamot et al., 2015). Sin embargo, se han identificado ambos quimiotipos en ambos continentes (Ward et al., 2008). En América de Sur, países como Brasil, Uruguay y Argentina señalan un predominio del quimiotipo 15-ADON en trigo (Chen et al., 2013; Ponte et al., 2015; Reynoso et al., 2011). Los quimiotipos 3-ADON comúnmente producen más DON que el quimiotipo 15-ADON y esta diferencia se ha reflejado en la abundancia de micotoxina acumulada en espigas de trigo y cebada inoculadas con cualquiera de los quimiotipos (Gilbert et al., 2010). Las diferencias en la patogenicidad se han informado en algunos experimentos de invernadero entre los quimiotipos 3 y 15-

ADON, donde el quimiotipo 3-ADON es más agresivo en algunos genotipos o métodos de inoculación en trigo (Serajazari et al., 2019).

El otro quimiotipo producido es el NIV, el cual no produce DON y su capacidad de producción de micotoxinas en el cereal tiende a ser más baja que los quimiotipos DON. NIV es menos fitotóxico que DON y este quimiotipo suele ser menos agresivo en el trigo y el centeno (N A Foroud et al., 2012). La mayoría de los quimiotipos de NIV se encuentran en Europa Occidental y aunque los productores de DON siguen siendo el quimiotipo dominante en esta y otras regiones, existen lugares donde este quimiotipo toma el relevo, por ejemplo, el quimiotipo NIV representa casi el 80% de las poblaciones identificadas en el estado de Louisiana, Estados Unidos y en diferentes regiones del norte de Irán (Nora A. Foroud et al., 2019).



### 1.3.3. Zearalenona

La zearalenona es un metabolito policétido, sintetizado mediante reacciones secuenciales catalizadas por grandes complejos proteicos multienzimáticos que contienen policétidos sintetasas (PKS), se considera una enzima clave, que participa en la biosíntesis de ZEA de manera similar a otras micotoxinas policétido como FUMO, AF, patulina y ocratoxina A (Nahle et al., 2020). La secuenciación del genoma ha revelado que *F. graminearum* tiene 15 PKS, pero se ha identificado la función de solo 8 PKS. Entre ellos, un PKS reductor (PKS4) y uno no reductor (PKS13) que son esenciales para la producción de ZEA (Gaffoor & Trail, 2006).

Los genes PKS fúngicos generalmente residen en grupos de genes que codifican factores de transcripción, enzimas metabólicas y transportadores. Se requieren cuatro genes vecinos (PKS4, PKS13, ZEB1 y ZEB2) para la biosíntesis de ZEA y constituyen el grupo de genes biosintéticos de ZEA. ZEB1 codifica una isoamil alcohol oxidasa que se requiere para la conversión de  $\beta$ -zearalenol en ZEA. ZEB2 es un factor de transcripción que lleva un dominio de unión al ADN de cremallera de leucina básica (bZIP) y regula la actividad de otros genes de agrupación biosintética de ZEA (Y.-T. Kim et al., 2005). Con base en los resultados de los análisis genéticos moleculares de estos genes, se propone que la vía biosintética de zearalenona sea iniciada por PKS4, que cataliza la condensación de carbonos a partir de una sola acetil-CoA y cinco moléculas de malonil-CoA, lo que da como resultado la formación de una hexaketida (Figura 1-11). En el siguiente paso, PKS13 completa tres interacciones que extienden la cadena ZEA agregando tres moléculas de malonil-CoA, lo que da como resultado un nonaketide. Luego, las cetonas no reducidas se someten a dos rondas de reacciones aromáticas intramoleculares, lo que provoca la formación de un anillo aromático y una estructura de anillo macrólido que contiene un enlace lactona. La conversión final de zearalenol en ZEA es catalizada por ZEB1. Los genes biosintéticos de ZEA no son esenciales para otros rasgos de *F. graminearum* como el crecimiento de hifas, conidiación, pigmentación, producción de TCT, virulencia o reproducción sexual (Gaffoor & Trail, 2006; J.-E. Kim et al., 2018).

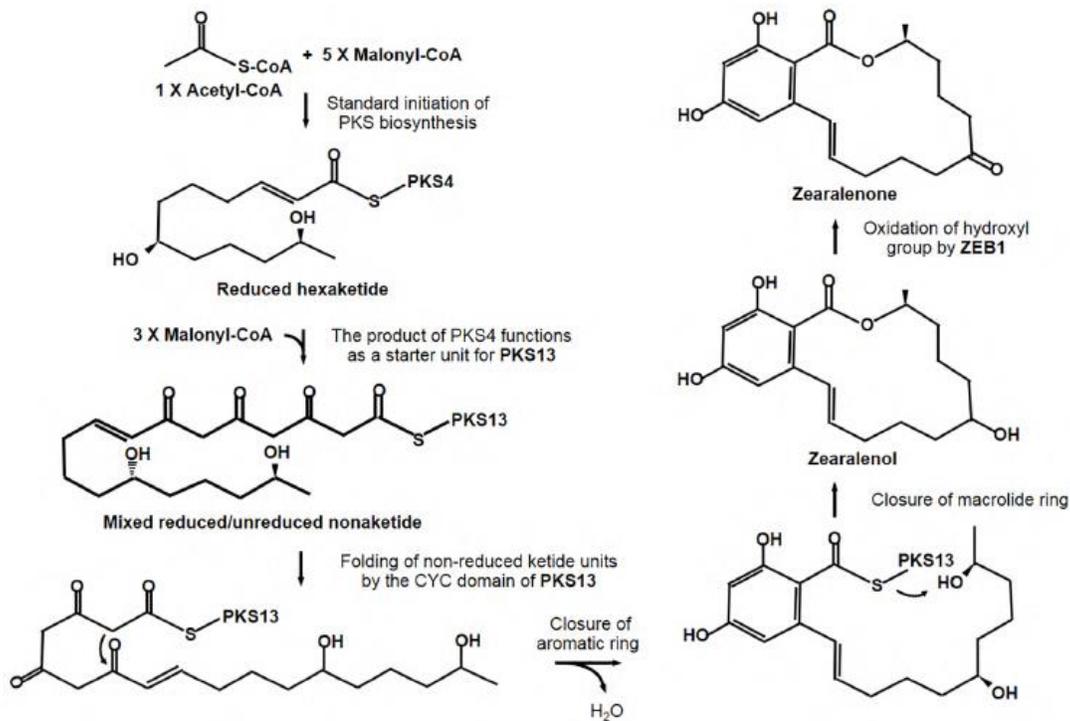


Figura 1-11. Ruta biosintética propuesta para ZEA.

#### 1.4. Métodos de análisis *Fusarium* toxinas

Normalmente los métodos de análisis implican una cierta cantidad de pasos, como la molienda, homogeneización, limpieza, extracción de compuestos y la separación y detección de las micotoxinas objetivos (Biselli & Hummert, 2007).

En la molienda se obtienen tamaños de muestra de grano para la extracción que están en el rango de 20 a 50 g, lo que favorece la interacción entre el disolvente de extracción y la matriz, para permitir la ruptura de los complejos matriz-analito. En este contexto, es bien conocido que un tamaño de partícula más pequeño aumenta la superficie disponible para el disolvente en una extracción sólido-líquido (Krska et al., 2007). El muestreo, es el paso previo más crítico en la determinación de la

contaminación por micotoxinas en lotes de granos de cereales, ya que generalmente su distribución no es homogénea, y con ello no hay un muestreo representativo, afectando la veracidad de los resultados analíticos (Tittlemier et al., 2011).

Las micotoxinas de *Fusarium* constituyen un grupo muy heterogéneo de compuestos con diferentes propiedades fisicoquímicas, y normalmente se han optimizado procedimientos específicos de extracción y limpieza para una micotoxina, aunque en los últimos años se han desarrollado métodos extractivos para la extracción simultánea de varias micotoxinas (Malachová et al., 2018). Respecto a la limpieza de los extractos para reducir el efecto matriz, se han probado QuEChERS (rápido, fácil, barato, efectivo, robusto y seguro) (Miró et al., 2019), microextracción en fase sólida (SPME) (Vargas et al., 2021), extracción en dispersión en fase sólida (dSPE) (Dzuman et al., 2014), columnas de inmunoafinidad (IAC) (Solfrizzo et al., 2018) o extracción en fase sólida (SPE) (Mirón-Mérida et al., 2021). A pesar de los nuevos métodos de extracción que existen en la actualidad, SPE sigue siendo una de las técnicas más utilizadas (Jedziniak et al., 2019). Generalmente en matrices sólidas como cereales, SPE también se puede utilizar para la etapa de limpieza y/o concentración de la muestra después del procedimiento de extracción, principalmente debido a la extrema complejidad de los extractos. En esta técnica la muestra se pasa a través de un “cartucho” o “columna” relleno de un material sólido (sorbente), donde se retienen las micotoxinas y luego se eluyen con un solvente adecuado, permitiendo así su

separación de posibles interferentes (Pereira et al., 2015). Diversos autores han informado que altas concentraciones de MeOH o ACN ( $\geq 75\%$ ) en el solvente de extracción son adecuados para la extracción de la mayoría de las micotoxinas, como TCT y ZEA, mientras que se pueden obtener altas eficiencias de extracción para FUMO aumentando la fracción de agua y/o disminuir el pH de la mezcla de extracción (Paepens et al., 2005). Hoy en día existen diferentes sorbentes y su elección de material sorbente dependerá de los analitos, los interferentes y el disolvente de extracción utilizado. Por ejemplo, las columnas de intercambio aniónicos fuertes (SAX) se siguen empleando para la extracción de FUMO (Bordin et al., 2015), al igual que las Bond Elut Mycotoxin®, que han sido diseñadas para la limpieza simultánea de 12 TCT de tipo A y B y ZEA (Meneely et al., 2011), ambas se utilizan debido a su reproducibilidad, simplicidad, menor costo y similar rendimiento con relación a las IAC. Además, las IAC tienen una limitación en la variabilidad de los analitos y podrían promover la interacción con los constituyentes de la matriz (Zuo et al., 2018).

Para la separación, detección y cuantificación de las micotoxinas de *Fusarium* se deben conocer los valores máximos establecidos por la regulación, junto con los niveles de contaminación esperados en las muestras, ya que es crucial durante el diseño de los métodos analíticos (Shanakhat et al., 2018).

Los métodos de análisis más comunes involucran principalmente los de inmunoensayo y los cromatográficos (Tang et al., 2019). En los métodos de inmunoensayo, las micotoxinas actúan como antígeno al interactuar con un

anticuerpo. Este grupo incluye el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) y dispositivos de flujo lateral (LFD) (Shanakhat et al., 2018). ELISA es simple, rápido y de bajo costo, además es capaz de entregar resultados semicuantitativos, ha sido utilizado para determinar diversas micotoxinas como FUMO en maíz (Coronel et al., 2016), TCT-B y ZEA en trigo (Hendrickson et al., 2017). Sin embargo, aunque los anticuerpos interactúan con grupos específicos de un compuesto, pueden mostrar una reactividad cruzada considerable, porque pueden reconocer análogos estructurales (toxinas similares o componentes de la matriz) y actuar con estos, dando como resultados falsos positivos o negativos (Shanakhat et al., 2018).

Las técnicas cromatográficas para el análisis simultáneo de micotoxinas incluyen: cromatografía en capa fina (TLC), cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC), cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y cromatografía de gases (GC) (Vargas et al., 2021). TLC es el método cualitativo más antiguo utilizado en la separación e identificación de micotoxinas. Recientemente se desarrolló un método analítico por HPTLC-MS para identificar TCT-B y ZEA en arroz, maíz y trigo, siendo su principal ventaja el análisis simultáneo de varias muestras en poco tiempo, además de ser un método económico, sencillo, confiable y eficiente (Jorquera-Pereira, 2021). En los últimos años, HPLC acoplada al espectrómetro de masas (MS) (Campone et al., 2020; Zadeike et al., 2021), al detector ultravioleta (UV) (Y. Liu et al., 2019; Seus et al., 2018) y de fluorescencia (FLD) (Z. Liu et al., 2020), han ido reemplazando cada vez más la cromatografía de gases (GC) acoplada a los

detectores de ionización de llama (FID) (Cerveró et al., 2007) y captura de electrones (ECD) (Eke et al., 2004), ya que la GC generalmente requiere de una etapa de derivatización de los compuestos antes del análisis. Los métodos más populares para la detección de micotoxinas en cereales son HPLC-FLD y HPLC-MS. HPLC-FLD ha sido utilizado para cuantificar FUMO en granos de cereales, en donde se requiere un paso de derivatización para incorporar un cromóforo en la estructura química para una detección sensible por emisión o absorción de luz. Los reactivos de derivatización han incluido el uso de anhídrido maleico, fluorescamina, cloruro de dansilo, 4-fluoro-7-nitrobenzofurano y o-ftaldialdehído (OPA)/2-mercaptoetanol (Smith et al., 2017). Los tricotecenos de tipo B y la zearalenona se han determinado en forma simultánea en trigo por HPLC/MS, en comparación con el método HPLC/UV, se suele observar que los límites de cuantificación (LOQ) son inferiores, favoreciendo el análisis de trazas de diversas micotoxinas. En particular, la técnica de MS es un método útil para el análisis de multimicotoxinas, que elimina la necesidad de derivatizar las muestras, permite entregar la información estructural del analito, con requisitos mínimos para la preparación de muestras, la posibilidad de identificar la amplia gama de analitos en diferentes polaridades, una cuantificación más precisa, mejor selectividad y mayor sensibilidad en comparación con otros métodos cromatográficos (Tittlemier et al., 2019).

## 1.5. Estudios de micotoxinas en Chile

La presencia de micotoxinas se ha detectado en el país en diferentes matrices alimentarias y biológicas, por ejemplo: Vega (1995) mediante el proyecto Fondecyt 1951139, detectó en granos nacionales de trigo, arroz y maíz en las Regiones del Maule y Biobío, especies de *Fusarium* productoras de TCT, FUMO y ZEA. Posteriormente, Vega et al., (2003) participó en el proyecto INCO ICA4.CT-2002-10043 cuyo objetivo principal fue desarrollar un sistema de gestión de la calidad de los alimentos para el control de micotoxinas en las cadenas de producción y procesamiento de cereales en los países del Cono Sur de América Latina. En el año 2009, Vega et al., (2009) detectaron por cromatografía líquida OTA en productos de cereales en el mercado chileno (Vega et al., 2009).

En fluidos biológicos, Muñoz et al., (2006) realizaron un estudio preliminar de OTA en plasma humano en zonas agrícolas de Chile y su relación con el consumo alimentario, en el cual la presencia de OTA fue confirmada por la formación de éster metílico de ocratoxina, en rangos de 0,07 a 2,75  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . Muñoz, et al., (2010) (2014), detectaron la presencia de OTA en leche materna, suero sanguíneo y orina de lactante. Estudios recientes por Foerster et al., (2019) analizaron la ocurrencia de AF (16%), aflatoxina M1 (6%), OTA (30%), patulina (7%), FUMO (21%), ZEA (2%) y DON (12%) en alimentos consumidos en Chile entre los años 2008 y 2017. Foerster et al., (2021) evaluaron la exposición y el riesgo de aflatoxina B<sub>1</sub>, OTA, ZEA y DON en 172 participantes de la Cohorte del Maule (MAUCO) mediante análisis de biomarcadores en orina y asociaron su exposición con el consumo de alimentos y

su ocupación, obteniendo como resultados una alta exposición de AF (10%), DON (62%) y ZEA (8%) en orina.

Con relación a la producción de micotoxinas en Chile, Ríos (2000) determinó la capacidad toxicogénica de *Fusarium* spp. aislados desde maíz. De estos aislamientos se caracterizaron diversas especies de *Fusarium*: *F. culmorum*; *F. sambucinum*; *F. sporotrichioides*; y *F. graminearum*; capaces de producir DON y 3-ADON; DON y ZEA; Toxina T-2; y DON, 15-ADON y ZEA, respectivamente. En estudios más recientes Caro, et al., (2015) caracterizaron especies de *Fusarium* aisladas de trigo nacional respecto a su capacidad micotoxigénica, en donde determinaron que el aislamiento FUS 2013-7, correspondía a *F. graminearum* con la capacidad de producir principalmente las micotoxinas 15-ADON, DON y 3-ADON, clasificando al aislado en el quimiotipo 15-ADON. Por lo tanto, se han encontrado especies de *Fusarium* chilenos con la capacidad de producir micotoxinas, por lo que en el presente trabajo se pretende determinar la influencia que tienen los parámetros de humedad del grano y la temperatura en la producción de micotoxinas en especies de *Fusarium* aislados desde cereales nacionales.

## 2. HIPÓTESIS

- La producción de micotoxinas de las especies de *Fusarium* aisladas desde cereales nacionales se ve afectada por los parámetros de humedad del grano y de la temperatura.



### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo general

- Evaluar la influencia de la humedad del grano y la temperatura en la producción de micotoxinas de especies de *Fusarium* aisladas desde cereales nacionales.

#### 3.2. Objetivos específicos

- Aislar y purificar especies de *Fusarium* provenientes de cereales nacionales.
- Caracterizar molecularmente las especies de *Fusarium* aisladas.
- Implementar las metodologías analíticas para la detección y cuantificación de las micotoxinas producidas.
- Determinar la capacidad micotoxigénica, *in vitro*, de la(s) especie(s) aislada(s).
- Evaluar el efecto de la humedad del grano y la temperatura en la producción de las micotoxinas en estudio.

## 4. MATERIALES

### 4.1. Equipos y materiales

- Agitador magnético BOECO (Alemania).
- Agitador orbital BOECO (Alemania).
- Autoclave AV-100, Phoenix Luferco (Brasil).
- Balanza electrónica analítica BOECO (Alemania).
- Cámara de flujo laminar ZHJH-C1106C, Zhicheng (China).
- Cámara de vacío Visiprep™ Supelco (EE.UU.).
- Cartuchos de extracción en fase sólida Bond Elut Mycotoxin Agilent Technologies (EE.UU.).
- Cartuchos de extracción en fase sólida SEP-PAK, Waters (Irlanda).
- Columna XB-C18 Kinetex 2,6 μm, 100 x 4,6 mm (EE.UU.).
- Columna XB-C18 Kinetex 5,0 μm, 150 x 4,6 mm (EE.UU.).
- Cromatógrafo de líquidos Shimadzu (Japón) equipado con: Bomba binaria LC-20AT, unidad de desgasificación DGU-20A5R, autosampler SIL-20AC, módulo de comunicación CBM-20A, Horno CTO-20AC y espectrómetro de masas de triple cuadrupolo MS 8030 con fuente de electropulverización (ESI).

- Cromatógrafo de líquidos Waters (EE.UU.) equipado con: Bomba binaria HPLC Waters 1525, Horno Serie 1500 Column Heater Waters y FLD Waters 2475.
- Espectrofotómetro para microplacas Epoch 2, BioTek (EE.UU.).
- Estufa Memmert GmbH HPP 110 (Alemania).
- Estufa WTB Binder (Alemania).
- Evaporador Reacti-Therm III, Thermo Scientific (EE.UU.).
- Incubadora Biobase (China).
- Incubadora Shaking JJSI-20, JSR (Corea del Sur).
- Licuadora Somela (Chile).
- Material volumétrico clase A.
- Micropipetas Brand Transferpette 10 - 100  $\mu$ L, 100 - 1000  $\mu$ L, 1 - 10 mL (Alemania).
- Molinillo Sindelen (Chile).
- Papel filtro Whatman N° 4 (EE.UU.).
- Sistema purificador de agua Simplicity de Millipore (EE.UU.).
- Sonicator VWR Aquasonic (EE.UU.).
- Tamizadora vibratoria Jel Engelsmann (Alemania).
- Termociclador Maxygene II, Axygen (Australia).
- Vortex Maxi Mix II (Reino Unido).

#### 4.2. Reactivos

- Estándar de DON, NIV, 3-ADON, 15-ADON, ZEA, FB<sub>1</sub>, FB<sub>2</sub>, α-OTA (≥ 98% pureza), Sigma-Aldrich (EE.UU.).
- ACN y MeOH, grado HPLC, ácido acético glacial (AcAcét), ácido fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) > 85%, hidróxido de sodio (NaOH), fosfato monosódico hidratado (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O), tetraborato de sodio decahidratado (Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> x 10H<sub>2</sub>O), 2-mercaptoetanol (HSCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH), o-ftalaldehído (OPA), grado analítico, Merck (Alemania). Agar papa dextrosa (PDA) (EP/USP/JP/BP), Oxoid (UK). Agua ultrapura (18,2 MΩcm) producida por el sistema Simplicity.



#### 4.3. Medio de cultivo

- PDA: Se disolvieron 39 g de PDA en un litro de agua destilada estéril. Se dejó reposar durante 10 a 15 minutos y se calentó agitando hasta disolver completamente el polvo. Luego, se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Al medio de cultivo se le adicionó 200 mg L<sup>-1</sup> de sulfato de estreptomicina para evitar el desarrollo de bacterias.

#### 4.4. Soluciones

##### 4.4.1. Solución tampón

- Tampón fosfato 0,1 M: Se disolvieron 3,45 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$  en 250 mL de agua ultrapura.

##### 4.4.2. Soluciones extractivas

- MeOH:H<sub>2</sub>O (75:25, v/v): Se adicionaron 75 mL de MeOH grado HPLC con 25 mL de agua ultrapura.
- ACN:H<sub>2</sub>O (80;20, v/v): Se adicionaron 80 mL de ACN grado HPLC con 20 mL de agua ultrapura.

##### 4.4.3. Soluciones reactivo de derivatización

- Tetraborato de sodio decahidratado 0,1 M: Se disolvieron 3,8 g  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times 10\text{H}_2\text{O}$  en 100 mL de agua ultrapura.
- Reactivo OPA: Se disolvieron 40 mg de OPA en 1 mL de MeOH, se diluyó con 5 mL de  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times 10\text{H}_2\text{O}$  0,1 M. Finalmente se adicionaron 50  $\mu\text{L}$  de 2-mercaptoetanol y se mezcló.



#### 4.4.4. Solución patrón

- Estándar interno: Se preparó una solución madre de  $\alpha$ -OTA  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  en MeOH grado HPLC. A partir de esta solución se preparó una solución diluida de  $15 \mu\text{g L}^{-1}$  la cual se utilizó como estándar interno. Estos estándares se almacenaron a  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ .
- Fumonisinas B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub>: Se prepararon soluciones madres de FB<sub>1</sub> y FB<sub>2</sub> en ACN:H<sub>2</sub>O (50:50, v/v) a una concentración de  $400 \text{ mg L}^{-1}$  y  $100 \text{ mg L}^{-1}$  respectivamente. De cada solución madre se tomaron alícuotas para obtener estándares intermedios de FB<sub>1</sub> a  $20, 10$  y  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ , y de FB<sub>2</sub> a  $10 \text{ mg L}^{-1}$ . Estos estándares fueron almacenados a  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ .
- TCT-B y ZEA: Se prepararon soluciones madres de cada micotoxina a una concentración de  $200 \text{ mg L}^{-1}$  en ACN grado HPLC, a excepción de ZEA que se disolvió en MeOH HPLC. A partir de estas soluciones madres, se prepararon soluciones de trabajo de concentraciones a  $10$  y  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ . Todas las soluciones se almacenaron a  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ .

## 5. METODOLOGÍA

### 5.1. Aislamiento y purificación de especies de *Fusarium* provenientes de cereales nacionales

Se trabajó con una mazorca de maíz<sup>1</sup> obtenida del Mercado de Chillán, Región de Ñuble, 2018 y con un aislado fúngico desde trigo<sup>1</sup> proveniente de Santa Rosa, Chillán, Región de Ñuble, 2016.

Desde la mazorca, se tomaron los granos de maíz visiblemente afectados (granos agrietados, decolorados o de color marrón), y se les realizó desinfección superficial con hipoclorito de sodio 1%. Los granos desinfectados se cortaron longitudinalmente y se sembraron en medio PDA para el crecimiento del hongo. Posterior a 48 horas se repicaron los diferentes aislados en una nueva placa en medio PDA hasta obtener un aislado puro del hongo.

Del aislado de trigo se tomó una porción de una determinada colonia y se colocó en una placa en medio PDA para el crecimiento y posterior purificación del hongo.

---

<sup>1</sup> Muestras obtenidas por Dr. Ernesto Moya Elizondo, Laboratorio de Fitopatología, Departamento de Producción Vegetal, Facultad de Agronomía, Universidad de Concepción Campus Chillán, Chile.

## 5.2. Caracterización molecular de las especies de *Fusarium* aisladas

La caracterización molecular de las especies de *Fusarium* aisladas se realizó bajo la supervisión del Dr. Ernesto Moya Elizondo, Laboratorio de Fitopatología, Departamento de Producción Vegetal, Facultad de Agronomía, Universidad de Concepción Campus Chillán, Chile.

### 5.2.1. Extracción del ADN

Se extrajo ADN de aproximadamente 100 mg de micelio de cada aislado mediante el método CTAB modificado (Doyle & Doyle, 1987) utilizando molienda mecánica con pistilos plásticos estériles, usando acetato de amonio 7,5 M e isopropanol para la precipitación del ADN. De las muestras obtenidas se midió la concentración y el índice de pureza, mediante espectrofotometría a través del espectrofotómetro Epoch™ 2 (Biotek®). El índice de pureza se calcula en base a la relación entre la A260/A280, en donde un valor entre 1,8 y 2,1 es generalmente aceptado como “puro” en cuanto a ADN. Las muestras se diluyeron a 10 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  y se almacenaron a -20 °C hasta su utilización.

### 5.2.2. PCR punto final

Mediante PCR se amplificó el ADN de la zona ITS, del TEF-1 $\alpha$  y de la subunidad pequeña del ARN ribosomal 16s (SSU rRNA), utilizando los partidores descritos en la Tabla 5-1. Para cada amplificación se utilizó tampón 1X, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM

dNTP, 0,2  $\mu$ M de cada partidor, 0,5 U de ADN Polimerasa Taq Platinum (Thermo Scientific™), 20 ng ADN del hongo y agua para completar a volumen final de 25  $\mu$ L.

Las amplificaciones se realizaron en un termociclador MaxyGene™ II (Axygen®) y se usaron los perfiles de amplificación descritos por White *et al.*, 1990 y O'Donnell *et al.*, 1980.

Los productos de PCR fueron observados en geles de agarosa al 1%, utilizando tampón TBE al 0,5X y el agente de visualización SYBR® Safe DNA gel Stain (Thermo Scientific™). Se cargó 5  $\mu$ L de producto de PCR con 1,5  $\mu$ L del tampón de carga 6X DNA Loading Dye y se utilizó 5,0  $\mu$ L de marcador de peso molecular GeneRuler™ 1 Kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific™).



Tabla 5-1. Descripción de partidores utilizados en la amplificación de las zonas ITS, TEF 1- $\alpha$  y SSU rRNA.

Zona	Partidor	Secuencia (5'-3')	Largo amplificación (pb)	Referencia
ITS	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	550	(White et al., 1990)
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC		
TEF 1- $\alpha$	EF1	ATGGGTAAGGARGACAAGAC	680	(O'Donnell et al., 1998)
	EF2	GGARGTACCAGTSATCATGTT		
SSU rRNA	NS1	GTAGTCATATGCTTGTCTC	1130	(White et al., 1990)
	NS4	CTTCCGTCAATTCCTTTAAG		

### 5.2.3. Secuenciación Sanger y alineamiento local

Los productos de PCR de cada aislado se enviaron a secuenciar mediante el método Sanger a la empresa Macrogen Inc. en Corea del Sur. Las secuencias sentido y antisentido obtenidas para cada hongo se alinearon con el algoritmo de alineamiento global Needleman-Wunsch para obtener una secuencia consenso. Estas secuencias se compararon con las secuencias en la base de datos del National Center of Biotechnology Information (NCBI) mediante el algoritmo de alineamiento local BLAST.

### 5.3. Implementación de las metodologías analíticas para la determinación y cuantificación de micotoxinas

Se desarrollaron dos métodos de análisis para la determinación y cuantificación de micotoxinas, el primero para especies de *Fusarium* productoras de fumonisinas B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub> y el segundo para especies productoras de TCT-B y ZEA.

#### 5.3.1. Extracción y limpieza

##### 5.3.1.1. Fumonisinas B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub>

La extracción de las fumonisinas B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub> se realizó según el procedimiento descrito por la AOAC con algunas modificaciones (AOAC, 2005). Se pesaron 50 g de arroz (arroz blanco, marca Tucapel grado 2), previamente molido y tamizado con un tamaño de partícula entre 250 y 500 µm, se le adicionaron 100 mL de MeOH:H<sub>2</sub>O (75:25, v/v) utilizado como solvente de extracción y se homogeneizó por una hora a

temperatura ambiente, usando un agitador horizontal. El extracto se filtró (Papel filtro Whatman N° 4), se midió su pH y de ser necesario se ajustó entre 5,8 y 6,5 con NaOH 1 M. La limpieza del extracto se llevó a cabo en columnas SAX, la cual se acondicionó con 5 mL de MeOH, seguidos de 5 mL de MeOH:H<sub>2</sub>O (75:25, v/v). Luego, se tomó una alícuota de 10 mL del filtrado para realizar su limpieza por la columna. Posteriormente, se lavó la columna con 5 mL MeOH:H<sub>2</sub>O (75:25, v/v) y 3 mL de MeOH. Las FUMO se eluyeron con 10 mL AcAcét:MeOH (1:99, v/v), de los cuales se tomaron 4 mL del eluato y se evaporaron a sequedad bajo corriente de nitrógeno a 60 °C. Finalmente, al extracto seco se le agregó 1 mL de MeOH, se evaporó con nitrógeno para eliminar los restos de AACét y se reconstituyó con 200 µL de MeOH.



#### 5.3.1.2. Tricotecenos de tipo B y Zearalenona

La extracción de TCT-B y ZEA desde las muestras de arroz se realizó según el procedimiento descrito por Klötzel et. al. (Klötzel et al., 2006), con algunas modificaciones. Se pesaron 25 g de muestra molida y tamizada a un tamaño entre 250 y 500 µm, se extrajeron con 100 mL de ACN:H<sub>2</sub>O (80:20, v/v) durante una hora a temperatura ambiente utilizando un agitador horizontal. Posteriormente, se filtró el extracto (Papel filtro Whatman N° 4) y se limpiaron 4 mL del filtrado con columnas de SPE Bond Elut Mycotoxin. Finalmente, se tomaron 2 mL del eluato y se evaporaron a sequedad bajo corriente de nitrógeno. Se disolvió y reconstituyó con 500 µL de ACN.

### 5.3.2. Condiciones cromatográficas

#### 5.3.2.1. Fumonisin B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub>

Para el análisis de las muestras se empleó cromatografía líquida con detector de fluorescencia, utilizando las siguientes condiciones cromatográficas (AOAC, 2005):

- Columna: Columna XB-C18 Kinetex 5,0  $\mu\text{m}$ , 150 x 4,6 mm.
- Temperatura horno columna: 25 °C.
- Fase móvil: MeOH:NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (77:23, v/v), pH de la fase acuosa: 3,3 ajustado con H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>.
- Flujo: 1,0 mL min<sup>-1</sup>.
- Detector: Fluorescencia:  $\lambda$  excitación: 335 nm,  $\lambda$  emisión: 440 nm.
- Volumen de inyección: 20  $\mu\text{L}$ .
- Derivatización: A 25  $\mu\text{L}$  del estándar o muestra, se le adicionan 225  $\mu\text{L}$  de OPA, se mezclan y se inyecta luego de un minuto de agregado el reactivo OPA.

#### 5.3.2.2. Tricotecenos de tipo B y Zearalenona

Para el análisis de las muestras se empleó cromatografía líquida acoplada con un espectrómetro de masas como detector, usando las siguientes condiciones cromatográficas (Foerster et al., 2021):

- Columna: Columna XB-C18 Kinetex 2,6  $\mu\text{m}$ , 100 x 4,6 mm.
- Temperatura horno columna: 30  $^{\circ}\text{C}$ .
- Fase móvil: A:  $\text{H}_2\text{O}$  (0,1% AcAcét), B: ACN (0,1% AcAcét), método en gradiente (Tabla 5-2):

Tabla 5-2. Método en gradiente, fase móvil A:  $\text{H}_2\text{O}$  (0,1% AcAcét), B: ACN (0,1% AcAcét).

<b>Tiempo (min)</b>	<b>% B</b>
<b>0</b>	10
<b>5</b>	50
<b>8</b>	95
<b>15</b>	95
<b>17</b>	10
<b>20</b>	10

- Flujo: 0,4  $\text{mL min}^{-1}$ .
- Volumen de inyección: 20  $\mu\text{L}$ .
- Detector: MS de triple cuadrupolo, con las siguientes condiciones:
  - Fuente de ionización: Electrospray.
  - Velocidad gas de secado ( $\text{N}_2$ ): 15  $\text{L min}^{-1}$ .

- Temperatura de bloque de ionización: 400 °C.
- Temperatura de línea de solvatación: 250 °C.
- Gas de colisión: Argón.
- Modo de trabajo: Monitoreo de reacción múltiple (MRM).
- *m/z*: 100-2000.

### 5.3.3. Determinación de parámetros analíticos

En la determinación de los parámetros analíticos se contemplaron: linealidad, límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ), precisión y exactitud. En la Tabla 5-3 se indica qué parámetro se evaluó para cada micotoxina.

Tabla 5-3. Parámetro analítico evaluado por cada micotoxina.

<b>Parámetro analítico</b>	<b>Micotoxina</b>
<b>Linealidad</b>	FB <sub>1</sub> , FB <sub>2</sub> , TCT-B, ZEA
<b>LOD</b>	FB <sub>1</sub> , FB <sub>2</sub>
<b>LOQ</b>	FB <sub>1</sub> , FB <sub>2</sub> , TCT-B, ZEA
<b>Precisión</b>	FB <sub>1</sub> , TCT-B, ZEA
<b>Exactitud</b>	FB <sub>1</sub> , TCT-B, ZEA

Nota: La determinación de FB<sub>2</sub> no estaba contemplada inicialmente en la tesis, sin embargo, se encontró la presencia de ella en las muestras contaminadas con *F. proliferatum*, por lo cual se incluyó cuantitativamente su evaluación.

#### 5.3.3.1. 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 (International Conference on Harmonisation, 2005).

Para evaluar la linealidad de la respuesta del detector con respecto a la concentración de las micotoxinas, se confeccionó una curva de calibración empleando el método de estándar externo para FB<sub>1</sub> y FB<sub>2</sub> y de estándar interno para TCT-B y ZEA.

Las curvas de calibración se construyeron utilizando distintos niveles de concentración dependiendo de cada micotoxina, para FB<sub>1</sub> a 7 niveles de concentración en el rango de 250 a 20000 µg L<sup>-1</sup>, FB<sub>2</sub> a 5 niveles de concentración en el rango de 200 a 5000 µg L<sup>-1</sup>, DON a 5 niveles de concentración en el rango de 100 a 1000 µg L<sup>-1</sup>, NIV a 6 niveles de concentración en el rango de 50 a 1000 µg L<sup>-1</sup> y 3-ADON, 15-ADON y ZEA a 8 niveles de concentración en el rango de 10 a 1000 µg L<sup>-1</sup>. En las curvas de calibración de los TCT-B y la ZEA se utilizó un estándar interno α-OTA de 30 µg L<sup>-1</sup>. Las mediciones se realizaron en tres días diferentes y por duplicado a cada nivel de concentración.

La ecuación de la recta que describe el comportamiento lineal de FB<sub>1</sub> y FB<sub>2</sub> se obtuvo graficando la relación entre el área del analito (A<sub>A</sub>), versus la concentración de este. Para TCT-B y ZEA se obtuvieron graficando la relación entre la proporción de área del analito (A<sub>A</sub>) y el área del estándar interno (A<sub>IS</sub>), versus la concentración del analito.

Para evaluar el efecto de la matriz sobre la linealidad, se confeccionaron curvas de calibración sobrecargando arroz libre de las micotoxinas en estudio, el cual fue previamente analizado. La extracción del arroz se realizó de acuerdo con los procedimientos descritos anteriormente (ver sección 5.3.1.1 y 5.3.1.2).

En las FUMO, se evaluó solo la linealidad en matriz de la FB<sub>1</sub>, en donde al extracto seco se le adicionó una cantidad adecuada de estándar para obtener concentraciones de 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 2000 µg kg<sup>-1</sup>. Luego, se evaporó el solvente bajo corriente de nitrógeno y se reconstituyó el extracto.

Al extracto seco de las muestras de TCT-B y ZEA, se le agregó una cantidad adecuada de estándar para obtener concentraciones de 100, 250, 500, 750, 1000 µg kg<sup>-1</sup> para DON; 50, 100, 250, 500, 750, 1000 µg kg<sup>-1</sup> para NIV y 10, 25, 50, 100, 250, 500, 750, 1000 µg kg<sup>-1</sup> para 3-ADON, 15-ADON y ZEA. Finalmente, se evaporó el solvente bajo corriente de nitrógeno y se reconstituyó el extracto.

Las curvas de calibración en matriz se midieron en duplicado en tres días distintos y las ecuaciones correspondientes se obtuvieron de la forma señalada anteriormente.

#### 5.3.3.2. Límite de detección y límite de cuantificación

El límite de detección es la cantidad más baja de analito en una muestra que puede ser detectable, pero no necesariamente cuantificada con un valor exacto. El límite de cuantificación es la cantidad más baja de analito en una muestra que puede ser determinada cuantitativamente con precisión y exactitud adecuadas (International

Conference on Harmonisation, 2005). Estos parámetros se determinaron en base al método de señal/ruido, para esto se sobrecargó un extracto de arroz libre de FB<sub>1</sub> a una concentración de 25 µg kg<sup>-1</sup> y se evaluó en conjunto con un blanco de arroz. En FB<sub>2</sub> se determinó midiendo soluciones estándar a niveles cercanos al valor más bajo de la curva de calibración (200 µg L<sup>-1</sup>). Para TCT-B y ZEA se sobrecargó una muestra de arroz libre de estas micotoxinas a sus niveles más bajos de la curva de calibración. Los límites se determinaron considerando una relación señal/ruido de 3,3:1 para el LOD y de 10:1 para el LOQ.

#### 5.3.3.3. Precisión

La precisión de un procedimiento analítico expresa el grado de dispersión de una serie de medidas obtenidas bajo condiciones establecidas. Esta puede considerarse a tres niveles: repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad (International Conference on Harmonisation, 2005).

Para la determinación de la precisión en FB<sub>1</sub>, se sobrecargaron blancos de arroz a dos concentraciones de 25 y 50 µg kg<sup>-1</sup>. La extracción se realizó según lo señalado en la sección 5.3.1.1 y analizada por cromatografía líquida (sección 5.3.2.1). La determinación de este parámetro en TCT-B y ZEA, se llevó a cabo sobrecargando blancos de arroz a una concentración de 250 µg kg<sup>-1</sup>, la extracción se siguió según el protocolo indicado en la sección 5.3.1.2 y el análisis por cromatografía líquida (sección 5.3.2.2). La evaluación de cada nivel de concentración se realizó en triplicado durante tres días distintos.

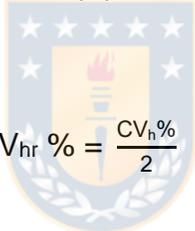
La precisión bajo condiciones de repetibilidad y de precisión intermedia se verificó comparando el coeficiente de variación (CV %) con el coeficiente de variación de Horwitz (CV<sub>h</sub> %). El CV<sub>h</sub> % se calcula según la Ecuación 5-1.

$$CV_h \% = 2^{(1-0,5 \log c)} \quad \text{Ecuación 5-1}$$

Donde:

c: Concentración real del analito expresado en potencia de 10.

Para la repetibilidad se acepta un  $CV < CV_{hr}$  (Ecuación 5-2) y para la precisión intermedia un  $CV < CV_{hRi}$  (Ecuación 5-3) (Instituto de Salud Pública, 2010).


$$CV_{hr} \% = \frac{CV_h \%}{2} \quad \text{Ecuación 5-2}$$

$$CV_{hRi} \% = \frac{2 CV_h \%}{3} \quad \text{Ecuación 5-3}$$

#### 5.3.3.4. Exactitud

La exactitud expresa la proximidad entre el valor que se acepta como un valor verdadero y el valor experimentalmente encontrado (International Conference on Harmonisation, 2005).

Se emplearon los valores obtenidos en las pruebas de precisión para verificar la exactitud del método.

La exactitud se expresó en porcentaje de recuperación (%R) (Ecuación 5-4):

$$\%R = \frac{\text{valor medido} \times 100}{\text{valor real}} \quad \text{Ecuación 5-4}$$

Se utilizó el criterio de aceptabilidad establecido por la Unión Europea siendo el rango de aceptación entre 70 y 110% para FB<sub>1</sub>, DON y ZEA (Reglamento de la Unión Europea CE 519/2014, 2014), mientras que el *Codex Alimentarius* fija valores de recuperación entre 80 a 110% para FB<sub>1</sub>, TCT-B y ZEA (Comisión del Codex Alimentarius, 2015).



#### 5.4. Determinación de la capacidad micotoxigénica, *in vitro*, de la(s) especie(s) aislada(s)

##### 5.4.1. Contaminación de arroz

La capacidad micotoxigénica de las especies de *Fusarium* se evaluó utilizando las condiciones empleadas por Caro, et. al (2015) con algunas modificaciones (Tabla 5-4).

Tabla 5-4. Condiciones experimentales para la producción de micotoxinas *in vitro*.

Condición	Temperatura (°C)	Cantidad de agua (mL)
1	15	40
2	15	80
3	25	40
4	25	80
5	30	40
6	30	80

$n = 5$ , más un blanco de arroz libre de micotoxinas en cada condición.

En un frasco de vidrio de 500 mL se agregaron 100 g de arroz (arroz blanco, marca Tucapel grado 2, grano largo - ancho) con la cantidad de agua destilada respectiva. Esta mezcla se esterilizó en autoclave a una temperatura de 121 °C por 15 minutos y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Luego, el arroz se contaminó con 10 discos (1 cm de diámetro) de una colonia de *Fusarium* crecida en medio PDA durante 7 días a 25 °C. Posteriormente, los arroces contaminados con las especies de hongos se incubaron en estufa con las temperaturas evaluadas durante 4 semanas. Finalizado el tiempo de incubación, el arroz se trasvasió a un plato de cartón y se secó en una estufa a 50 °C por 72 horas. Finalmente, todas las muestras se guardaron en bolsas herméticas y se almacenaron a -20 °C hasta su análisis por HPLC-FLD y HPLC-ESI-MS/MS.

#### 5.4.2. Detección y cuantificación de las micotoxinas producidas

Se molieron 100 g de la muestra de arroz previamente contaminados, se homogeneizaron y se siguieron los protocolos de las extracciones descritas en las secciones 5.3.1.1. y 5.3.1.2. Para el análisis cromatográfico se utilizaron las condiciones especificadas en los puntos 5.3.2.1. y 5.3.2.2.

#### 5.5. Evaluación del efecto de la humedad del grano y de la temperatura en la producción de las micotoxinas

##### 5.5.1. Determinación de la humedad

El procedimiento para determinar la humedad del grano de arroz blanco estéril, adicionado con 40 y 80 mL de agua destilada consiste en:

Una cápsula limpia y seca se colocó en una estufa a 130 °C por una hora, luego la cápsula se trasladó a un desecador, se dejó enfriar por 20 minutos, se pesó y la pesada se registró como  $m_1$ . Posteriormente, se taró la cápsula, se pesaron alrededor de 5,00 g de muestra de arroz (previamente molido y tamizado) distribuidos uniformemente en la cápsula y se registró su valor como  $m_2$ . La cápsula se colocó en la estufa por una hora a 130 °C y se procedió de igual manera que la cápsula vacía. Una vez enfriada en el desecador y con peso constante, se registró su pesada como  $m_3$  (Instituto de Salud Pública, 1998).

El cálculo del % de humedad se indica en la ecuación 5-5.

$$\% \text{ humedad} = \frac{(m_3 - m_1) \times 100}{m_2} \quad \text{Ecuación 5-5}$$

Donde:

$m_1$ : masa cápsula vacía.

$m_2$ : masa muestra.

$m_3$ : masa muestra con cápsula tarada.

#### 5.5.2. Diseño de experimentos

Para evaluar el efecto de las variables en la producción de micotoxinas se llevó a cabo un diseño de experimentos (DoE) de tipo factorial completo mixto (full factorial mixed design). En este DoE se realizaron 24 experimentos y se estudiaron las variables temperatura ( $X_1$ ) y cantidad de agua ( $X_2$ ), con las respuestas de las micotoxinas producidas a partir de los experimentos diseñados. Desde el DoE se calibró un modelo de interacción por medio de regresión de cuadrados parciales mínimos (PLS). De esta forma, se estudió el efecto de cada factor de forma independiente y sus interacciones entre sí.

### 5.5.3. 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, EE.UU.). Para los análisis estadísticos de datos correspondientes a *t*-student y test de Fisher se utilizó el software GraphPad Prism® 8.0.1 (GraphPad, EE.UU.). Para la elaboración del diseño experimental se usó el software MODDE® 12 (Satorius Stedim Biotech, Suecia).



## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1. Aislamiento y purificación de *Fusarium* provenientes de cereales nacionales

Los hongos aislados desde los segmentos de tejido se repicaron y se observaron bajo microscopio. Los aislados que presentaron diferencias visuales en su crecimiento y que mostraron diferentes estructuras reproductivas se utilizaron para la identificación molecular (Figura 6-1). Se seleccionaron dos aislados de *Fusarium* spp. identificados como “FGRAM” del aislado de trigo y “FMID” del aislado de maíz.

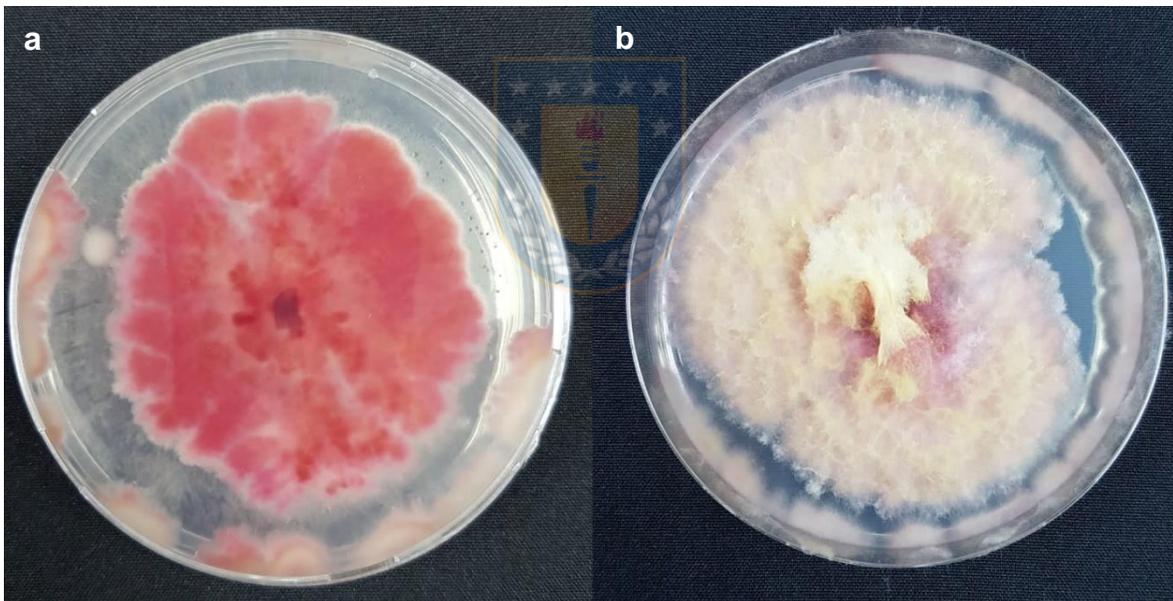


Figura 6-1. (a) Crecimiento micelar de FGRAM sobre medio PDA. (b) Crecimiento micelar de FMID sobre medio PDA; 7 días de incubación.

## 6.2. Caracterización molecular de las especies de *Fusarium* aisladas

### 6.2.1. Extracción del ADN

Las mediciones por espectrofotometría de las extracciones de ADN arrojaron un mínimo de 25 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  de ADN, y una relación de A260/A280 máxima de 2,2, lo que significa que las extracciones lograron producir ADN puro e integro para realizar la reacción de PCR. Todas las muestras se estandarizaron a 10 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  de ADN.

### 6.2.2. PCR punto final

Los productos de PCR fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 1% corridos por 45 minutos a 80 V. En la Figura 6-2, se observa el producto de amplificación obtenido para las zonas ITS, SSU rRNA y TEF 1- $\alpha$ , en donde "M" representa al marcador de peso molecular GeneRuler™ 1 Kb, "B" al control negativo que no contiene ADN, "FGRAM" y "FMID" a los aislados de *Fusarium* desde trigo y maíz, respectivamente. Los ensayos se realizaron en duplicado.

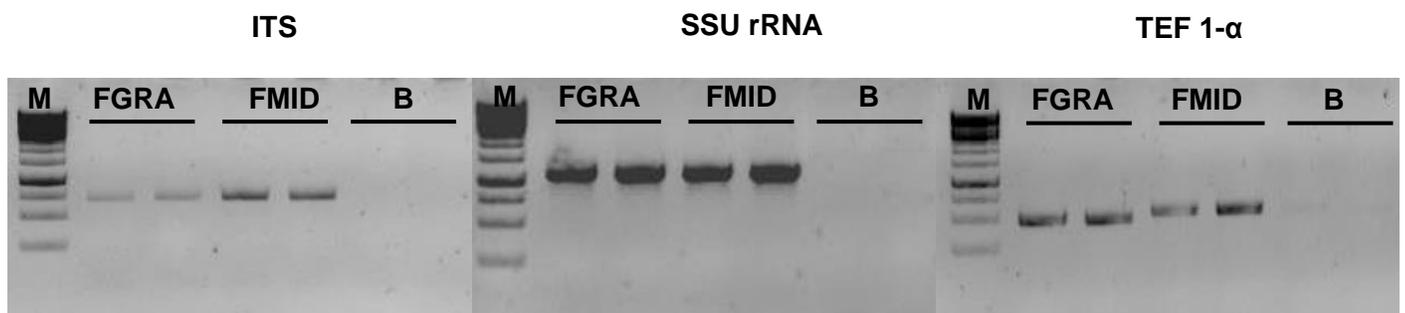


Figura 6-2. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de productos de PCR para zonas ITS, SSU rRNA y TEF 1- $\alpha$ .

Se obtuvo que todos los amplicones mostraron bandas del tamaño esperado para las muestras de ADN y que no se observó amplificación de productos inespecíficos. Finalmente, estos productos se utilizaron en la etapa de secuenciación.

### 6.2.3. Secuenciación Sanger y alineamiento local

Del alineamiento local BLAST se seleccionaron los organismos que presentaron la mayor identidad, cobertura y valor E, con respecto a la secuencia consultada. Con el resultado de la secuenciación de los genes se seleccionó un organismo consenso para cada una de las muestras (Tabla 6-1).



Tabla 6-1. Identificación molecular de aislados mediante algoritmo de alineamiento local BLAST.

Código Aislado	Gen	Identificación	Max Score	Total Score	Cobertura	Valor E	Identidad	Accesión	Organismo Consenso
<b>FGRAM</b>	ITS	<i>Fusarium graminearum</i>	953	953	100%	0,0	100%	MH108142.1	<b><i>Fusarium graminearum</i></b>
	SSU rRNA	<i>Fusarium graminearum</i>	1895	1895	100%	0,0	100%	KX132126.1	
	TEF 1 $\alpha$	<i>Fusarium graminearum</i>	1238	1238	100%	0,0	100%	MG670538.1	
<b>FMID</b>	ITS1	<i>Fusarium proliferatum</i>	963	963	100%	0,0	100%	KC254041.1	<b><i>Fusarium proliferatum</i></b>
	SSU rRNA	<i>Fusarium proliferatum</i>	1912	1912	100%	0,0	100%	MF522215.1	
	TEF 1 $\alpha$	<i>Fusarium proliferatum</i>	1240	1240	100%	0,0	100%	MG826879.	

### 6.3. Implementación de las metodologías analíticas para la determinación y cuantificación de micotoxinas

#### 6.3.1. Condiciones cromatográficas

Se evaluaron las condiciones cromatográficas descritas en la sección 5.3.2.1. para el análisis de FB<sub>1</sub> y FB<sub>2</sub> asociadas a la producción de *F. proliferatum*, y en la sección 5.3.2.2. para el análisis de TCT-B y ZEA relacionadas a la producción de *F. graminearum*.

##### 6.3.1.1. Fumonisin B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub>

En la Figura 6-3 se presenta el cromatograma obtenido, en el cual se observa una separación adecuada de FB<sub>1</sub> y FB<sub>2</sub>, con un pico cromatográfico bien definido, sin presencia de interferentes ni picos aledaños que pudieran afectar la lectura y con un tiempo de retención ( $t_R$ ) de 4,51 minutos para FB<sub>1</sub> y 9,53 minutos para FB<sub>2</sub>. Además, se evidencia que no hay interferencias entre la matriz y una sobrecarga de arroz con FB<sub>1</sub>. Por lo tanto, para la utilización del método analítico se emplearon las condiciones descritas en la sección 5.3.2.1.

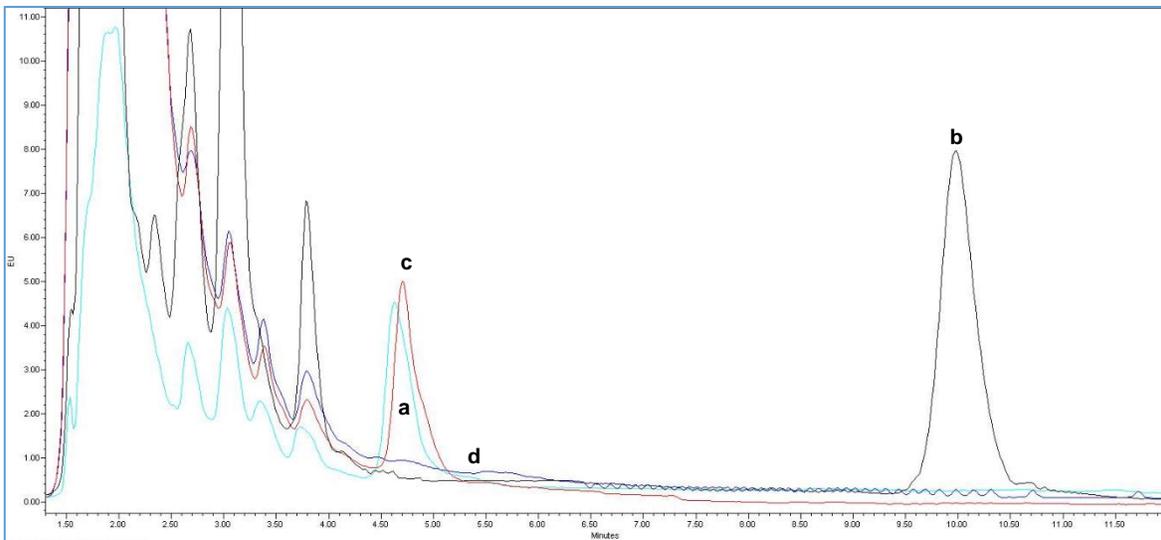


Figura 6-3. Cromatograma de (a) estándar de FB<sub>1</sub> (250 µg L<sup>-1</sup>), (b) FB<sub>2</sub> (200 µg L<sup>-1</sup>), (c) arroz sobrecargado con FB<sub>1</sub> (25 µg kg<sup>-1</sup>) y (d) arroz blanco derivatizados con OPA.



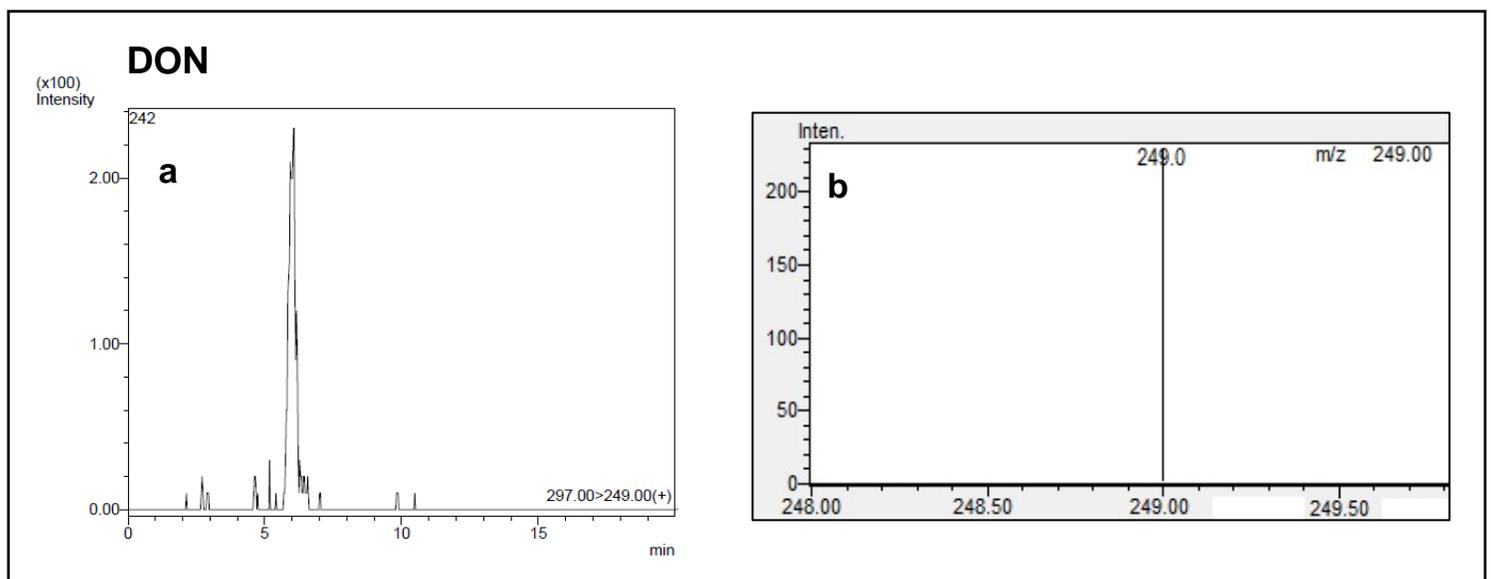
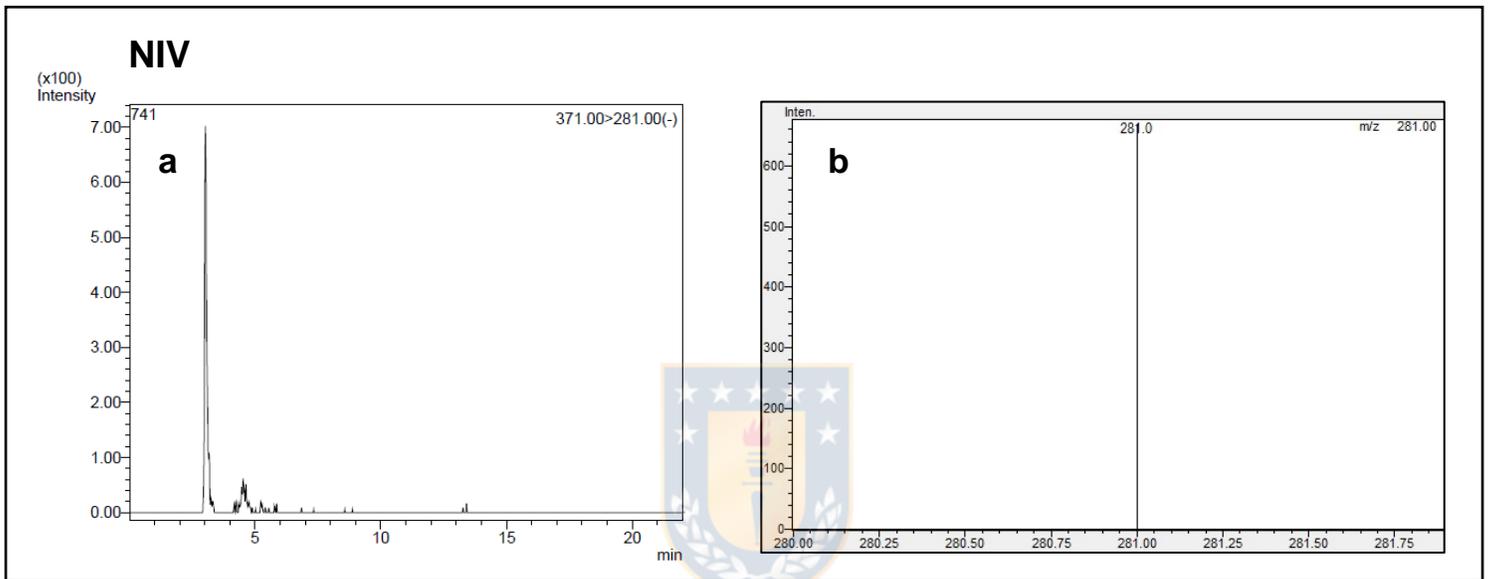
### 6.3.1.2. Tricotecenos de tipo B y Zearalenona

Se evaluaron las condiciones empleadas por Foerster et. al (Foerster et al., 2021) en la matriz de arroz, utilizando las indicadas en la Tabla 6-2. Los resultados en el modo de barrido completo mostraron una buena respuesta con baja interferencia y ruido químico para todos los analitos. Para cada micotoxina se seleccionó la transición de masa con la mayor abundancia. NIV presentó una masa carga ( $m/z$ ) de 371 > 281, DON una  $m/z$  de 297 > 249, 3-ADON y 15-ADON una  $m/z$  de 397 > 337, ZEA una  $m/z$  de 317 > 175 y una  $m/z$  de 255 > 167 para  $\alpha$ -OTA. Se utilizó como estándar interno de  $\alpha$ -OTA para compensar el efecto de la matriz

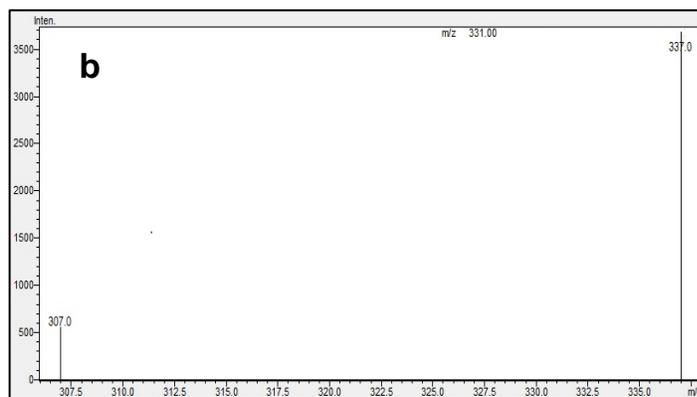
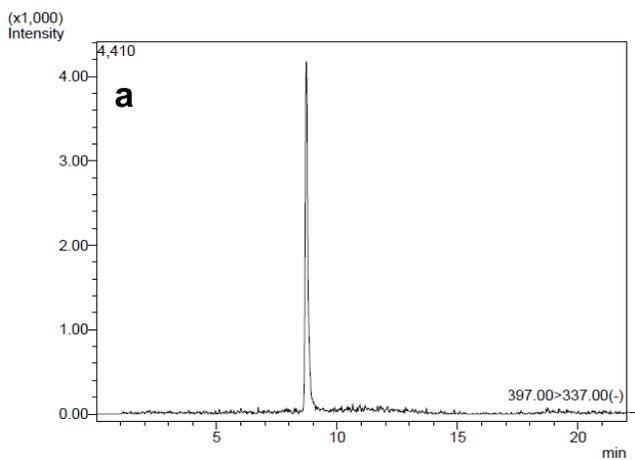
Tabla 6-2. Parámetros de detección de las micotoxinas en estudio.

Micotoxina	Fórmula química	Peso molecular (g mol <sup>-1</sup> )	Polaridad ESI	Energía interfase (kv)	Energía colisión (V)	Ion precursor (m/z)	Ion cuantitativo (m/z)
<b>NIV</b>	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> O <sub>7</sub>	312,3	(-)	-3,5	12	371	281
<b>DON</b>	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> O <sub>6</sub>	296,3	(+)	2,5	-12	297	249
<b>3-ADON</b>	C <sub>17</sub> H <sub>22</sub> O <sub>7</sub>	338,3	(-)	-3,5	4	397	337
<b>15-ADON</b>	C <sub>17</sub> H <sub>22</sub> O <sub>7</sub>	338,3	(-)	-3,5	4	397	337
<b>ZEA</b>	C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> O <sub>5</sub>	318,3	(-)	-3,5	20	317	175
<b>α-OTA</b>	C <sub>11</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> Cl	256,6	(-)	-3,5	20	255	167

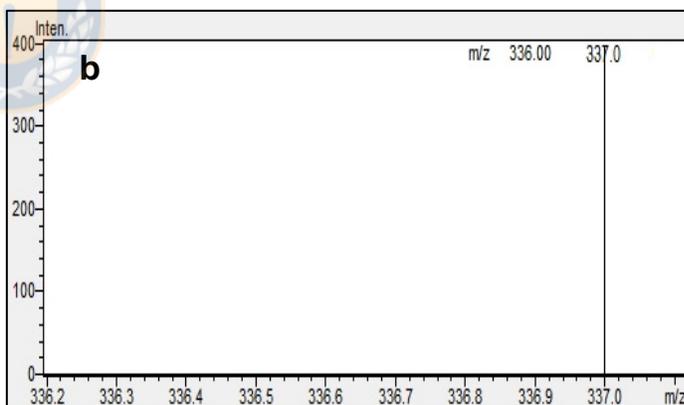
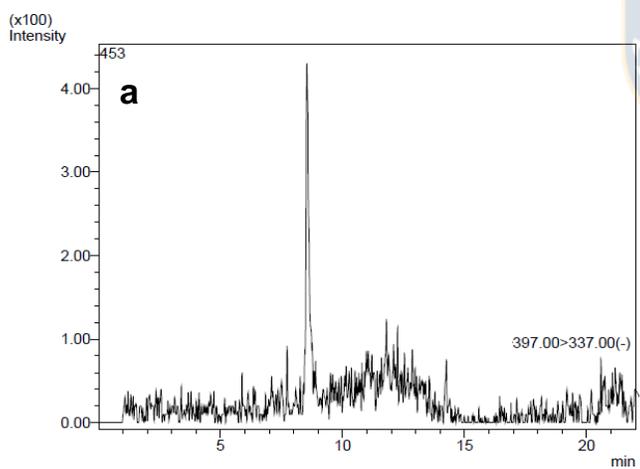
Todas las micotoxinas consiguieron picos bien definidos con un  $t_R$  de 3,0; 6,2; 8,6; 8,6; 11,9 y 12,2 minutos para NIV, DON, 3-ADON, 15-ADON, ZEA y  $\alpha$ -OTA, respectivamente. En la Figura 6-4 se presentan los espectros en modo SCAN y los cromatogramas obtenidos de los estándares de las micotoxinas en estudio en modo MRM.



### 3-ADON



### 15-ADON



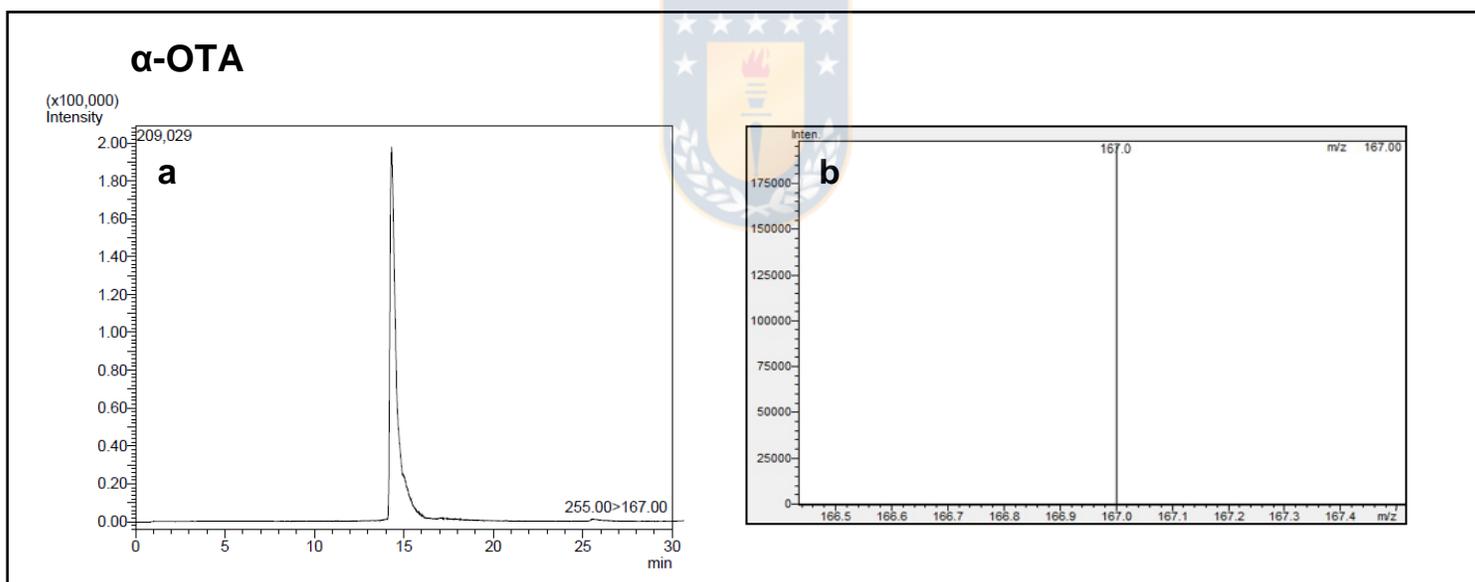
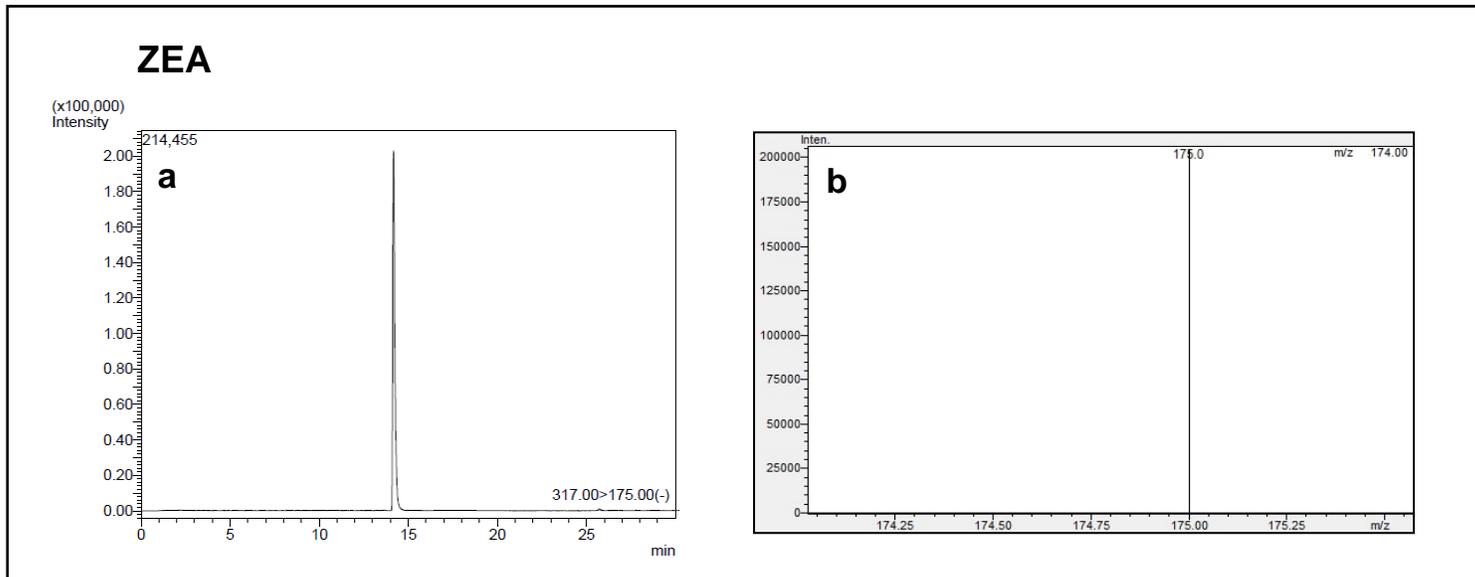


Figura 6-4. UPLC-ESI-MS/MS (a) Espectros en modo SCAN, (b) Cromatogramas en modo MRM: estándar de NIV  $350 \mu\text{g L}^{-1}$ ; estándar de DON  $350 \mu\text{g L}^{-1}$ , estándar de 3-ADON  $350 \mu\text{g L}^{-1}$ , estándar de 15-ADON  $350 \mu\text{g L}^{-1}$ , estándar de ZEA  $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ , y estándar de  $\alpha$ -OTA  $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ .

## 6.3.2. Determinación de parámetros analíticos

### 6.3.2.1. Linealidad

#### 6.3.2.1.1. Curva de calibración estándar

##### 6.3.2.1.1.1. Fumonisinias B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub>

En la Figura 6-5 se observan las curvas de calibración de FB<sub>1</sub> y FB<sub>2</sub>. En la Tabla 6-3 se presenta la ecuación de la recta, el coeficiente de correlación (r) y el coeficiente de determinación (r<sup>2</sup>) de FB<sub>1</sub> y FB<sub>2</sub>.

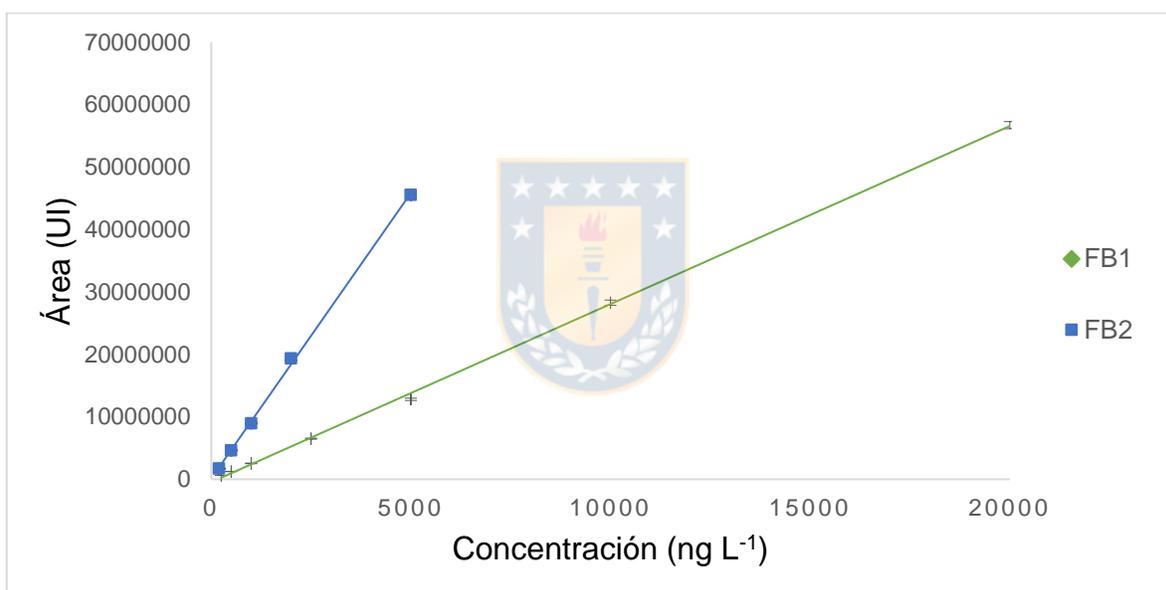


Figura 6-5. Curva de calibración de estándar FB<sub>1</sub> y FB<sub>2</sub>.  $n = 2$ ; 3 días distintos.

Tabla 6-3. Linealidad de FB<sub>1</sub> y FB<sub>2</sub> en estándar.

Micotoxina	Ecuación de la recta	Coefficiente de correlación (r)	Coefficiente de determinación (r <sup>2</sup> )
FB <sub>1</sub> <sup>a</sup>	y = 28511x - 461825	0,9995	0,9991
FB <sub>2</sub> <sup>b</sup>	y = 9140,5x + 123046	0,9997	0,9995

<sup>a</sup> Rango lineal: 250 a 20000 ng L<sup>-1</sup>, equivalentes a 25 a 2000 µg kg<sup>-1</sup> en matriz.

<sup>b</sup> Rango lineal: 200 a 5000 ng L<sup>-1</sup>, equivalentes a 20 a 500 µg kg<sup>-1</sup> en matriz.

Los resultados obtenidos tanto para FB<sub>1</sub> y FB<sub>2</sub> demuestran que existe una relación lineal entre las variables en el rango ensayado, presentando un coeficiente de determinación (r<sup>2</sup>) superior a 0,99.



#### 6.3.2.1.1.2. Tricotecenos de tipo B y Zearalenona

En la Figura 6-6 se observan las curvas de calibración para 3-ADON, 15-ADON y ZEA y en la Figura 6-7 las curvas de calibración de DON y NIV. En la Tabla 6-4 se presenta la ecuación de la recta, el coeficiente de correlación (r) y el coeficiente de determinación (r<sup>2</sup>) de los TCT-B y ZEA.

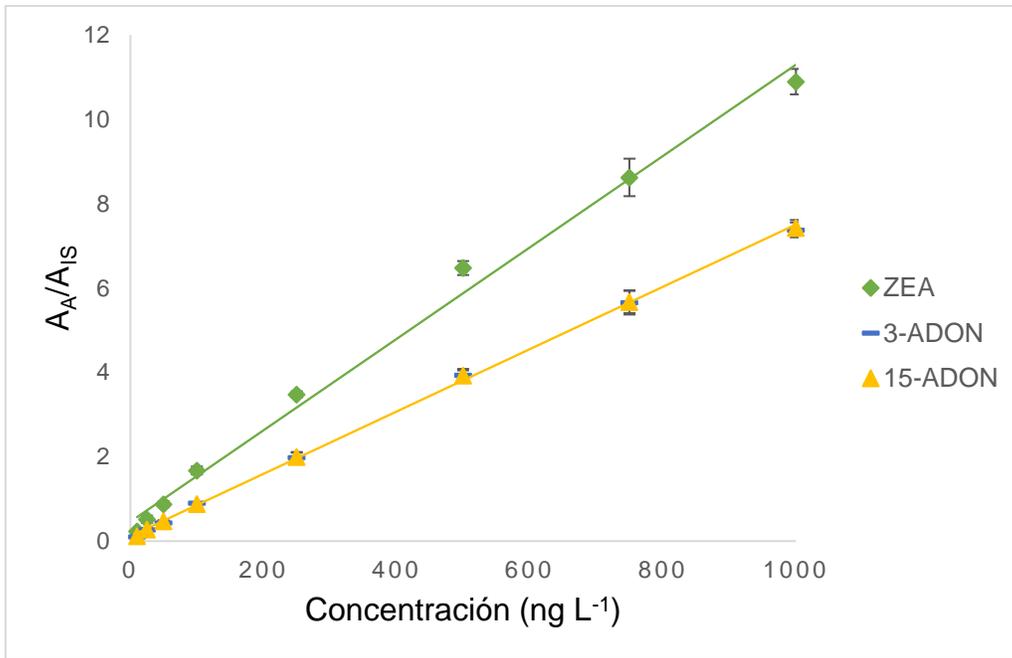


Figura 6-6. Curva de calibración de estándar 3-ADON, 15-ADON y ZEA.  $n=2$ ; 3 días distintos.

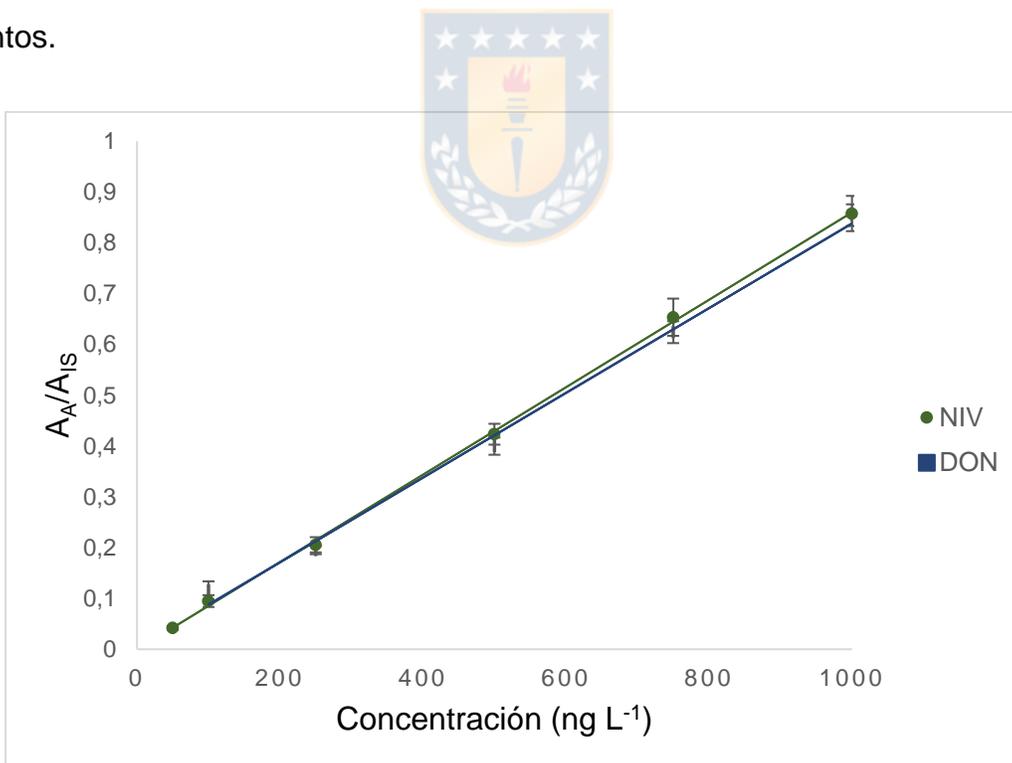


Figura 6-7. Curva de calibración de estándar NIV y DON.  $n=2$ ; 3 días distintos.

Tabla 6-4. Linealidad de TCT-B y ZEA en estándar.

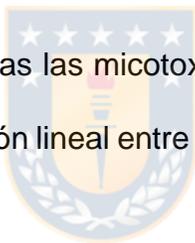
Micotoxina	Ecuación de la recta	Coefficiente de correlación (r)	Coefficiente de determinación (r <sup>2</sup> )
<b>DON<sup>a</sup></b>	$y = 0,0250x + 0,0044$	0,9975	0,9950
<b>NIV<sup>b</sup></b>	$y = 0,0215x - 0,0005$	0,9997	0,9995
<b>3-ADON<sup>c</sup></b>	$y = 0,2210x + 0,1111$	0,9996	0,9992
<b>15-ADON<sup>c</sup></b>	$y = 0,2217x + 0,1166$	0,9997	0,9995
<b>ZEA<sup>c</sup></b>	$y = 0,3251x + 0,4593$	0,9965	0,9931

<sup>a</sup> Rango lineal: 100 - 1000 ng L<sup>-1</sup>, equivalentes a 100 - 1000 µg kg<sup>-1</sup> en matriz.

<sup>b</sup> Rango lineal: 500 - 1000 ng L<sup>-1</sup>, equivalentes a 500 - 1000 µg kg<sup>-1</sup> en matriz.

<sup>c</sup> Rango lineal: 10 - 1000 ng L<sup>-1</sup>, equivalentes a 10 - 1000 µg kg<sup>-1</sup> en matriz.

Las ecuaciones de la recta de todas las micotoxinas presentan un r<sup>2</sup> mayor a 0,99 demostrando que existe una relación lineal entre las variables en el rango ensayado.



#### 6.3.2.1.2. Curva de calibración en matriz

##### 6.3.2.1.2.1. Fumonisina B<sub>1</sub>

En la Figura 6-8 se observa la curva de calibración en matriz y en la Tabla 6-5 se presenta la ecuación de la recta, el coeficiente de correlación (r) y el coeficiente de determinación (r<sup>2</sup>) de FB<sub>1</sub>.

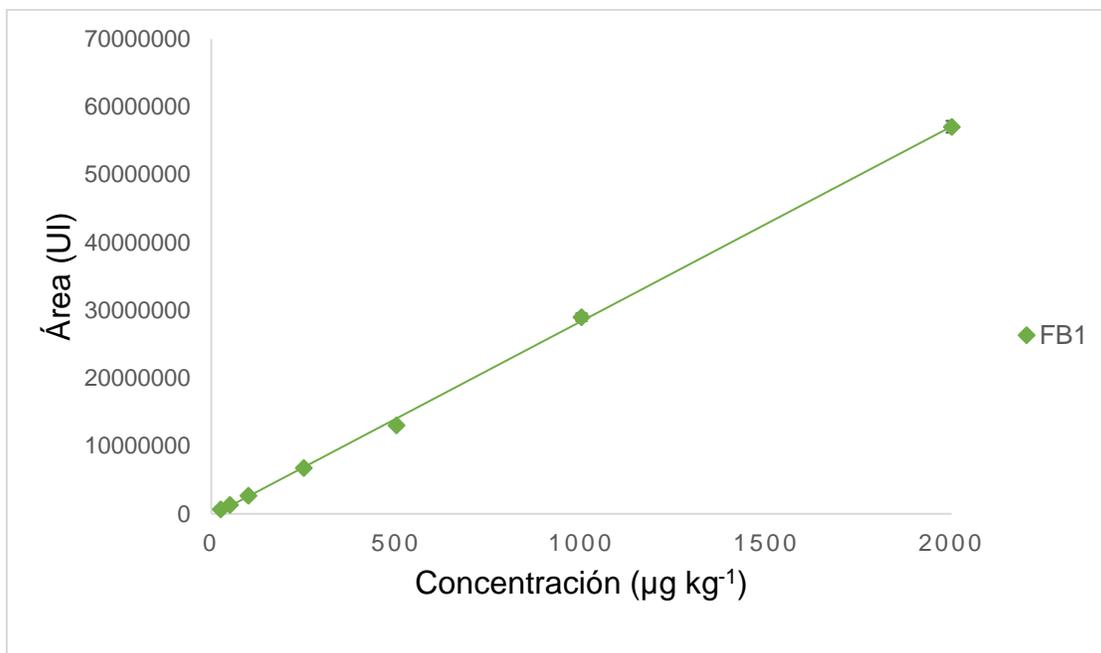


Figura 6-8. Curva de calibración en matriz FB<sub>1</sub>.  $n = 2$ ; 3 días distintos.

Tabla 6-5. Linealidad de FB<sub>1</sub> en matriz.

Micotoxina	Ecuación de la recta	Coefficiente de correlación (r)	Coefficiente de determinación (r <sup>2</sup> )
FB <sub>1</sub> <sup>a</sup>	$y = 28703x - 295265$	0,9997	0,9994

<sup>a</sup> Rango lineal: 25 - 2000 µg kg<sup>-1</sup>.

La ecuación de la recta de FB<sub>1</sub> presenta un  $r^2$  mayor a 0,99 demostrando que existe una relación lineal entre las variables en el rango ensayado.

Posteriormente, se procedió a comparar la pendiente de la curva de calibración de estándar con la curva de calibración en matriz mediante un test de Fisher ( $\alpha = 0,05$ ).

La comparación muestra que las pendientes de ambas curvas no tienen diferencias

significativas ( $p = 0,6565$ ), como se puede observar gráficamente en la Figura 6-9. Este resultado demuestra que no hay un efecto matriz para  $FB_1$ , sin embargo, se decidió utilizar la curva de calibración en matriz para su cuantificación en arroz, debido a que permite minimizar posibles efectos de la línea base, en los resultados obtenidos. La validación del método analítico solo contemplaba el análisis de  $FB_1$ , sin embargo, se encontró la presencia de  $FB_2$  en las muestras contaminadas con *F. proliferatum*, por lo cual se incluyó cuantitativamente su evaluación, mediante curva de calibración en estándar.

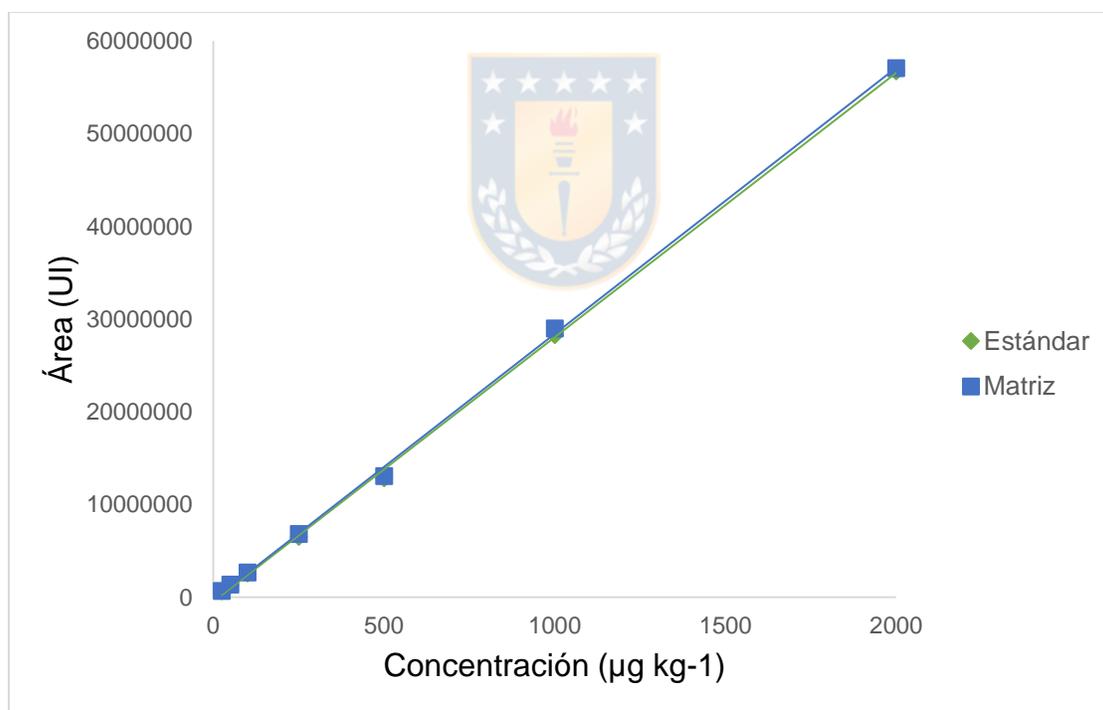


Figura 6-9. Comparación curva de calibración en estándar y matriz para  $FB_1$ .

### 6.3.2.1.2.2. Tricotecenos de tipo B y Zearalenona

En la Figura 6-10 se observa la curva de calibración en matriz para los TCT-B y ZEA. En la Tabla 6-6 se presenta la ecuación de la recta, el coeficiente de correlación ( $r$ ) y el coeficiente de determinación ( $r^2$ ) de estas micotoxinas.

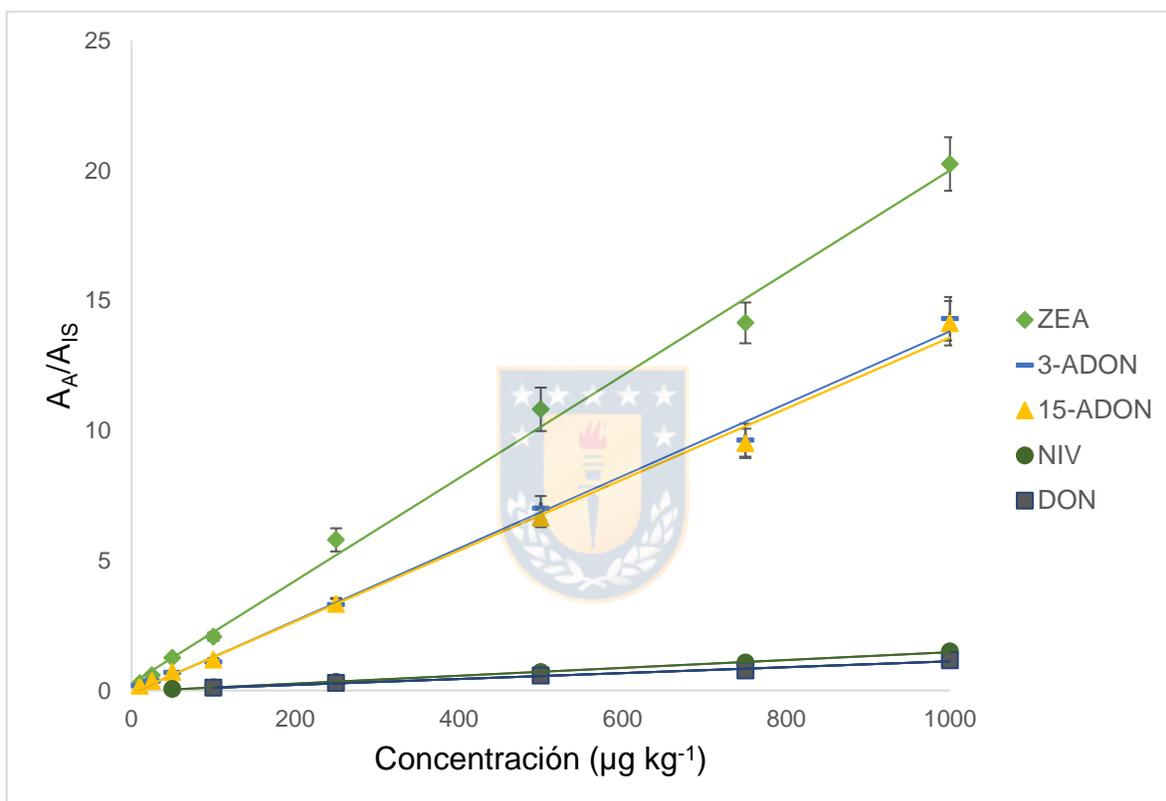


Figura 6-10. Curva de calibración en matriz TCT-B y ZEA.  $n=2$ ; 3 días distintos.

Tabla 6-6. Linealidad de TCT-B y ZEA en matriz.

Micotoxina	Ecuación de la recta	Coefficiente de correlación (r)	Coefficiente de determinación (r <sup>2</sup> )
<b>DON<sup>a</sup></b>	$y = 0,0011x - 0,0074$	0,9953	0,9906
<b>NIV<sup>b</sup></b>	$y = 0,0015x - 0,0316$	0,9993	0,9987
<b>3-ADON<sup>c</sup></b>	$y = 0,0139x - 0,0959$	0,9978	0,9956
<b>15-ADON<sup>c</sup></b>	$y = 0,0137x - 0,0792$	0,9978	0,9957
<b>ZEA<sup>c</sup></b>	$y = 0,0197x + 0,2775$	0,9976	0,9952

<sup>a</sup> Rango lineal: 100 - 1000 µg kg<sup>-1</sup>

<sup>b</sup> Rango lineal: 500 - 1000 µg kg<sup>-1</sup>

<sup>c</sup> Rango lineal: 10 - 1000 µg kg<sup>-1</sup>

Los resultados obtenidos muestran que hay una relación lineal entre las variables en el rango ensayado ( $r^2 > 0,99$ ) para todas las micotoxinas.

Posteriormente, se procedió a comparar la pendiente de la curva de calibración de estándar con la curva de calibración en matriz mediante un test de Fisher ( $\alpha = 0,05$ ) para cada una de las micotoxinas. La comparación muestra que ambas pendientes son significativamente diferentes, con un valor  $p = 0,0061$  para DON, y un  $p < 0,00001$  para NIV, 3-ADON, 15-ADON y ZEA, observándose gráficamente en las Figuras 6-11 a la 6-15. Este resultado demuestra que hay efecto matriz, por lo tanto, se debe utilizar la curva de calibración en matriz para la cuantificación de todas las micotoxinas en arroz.

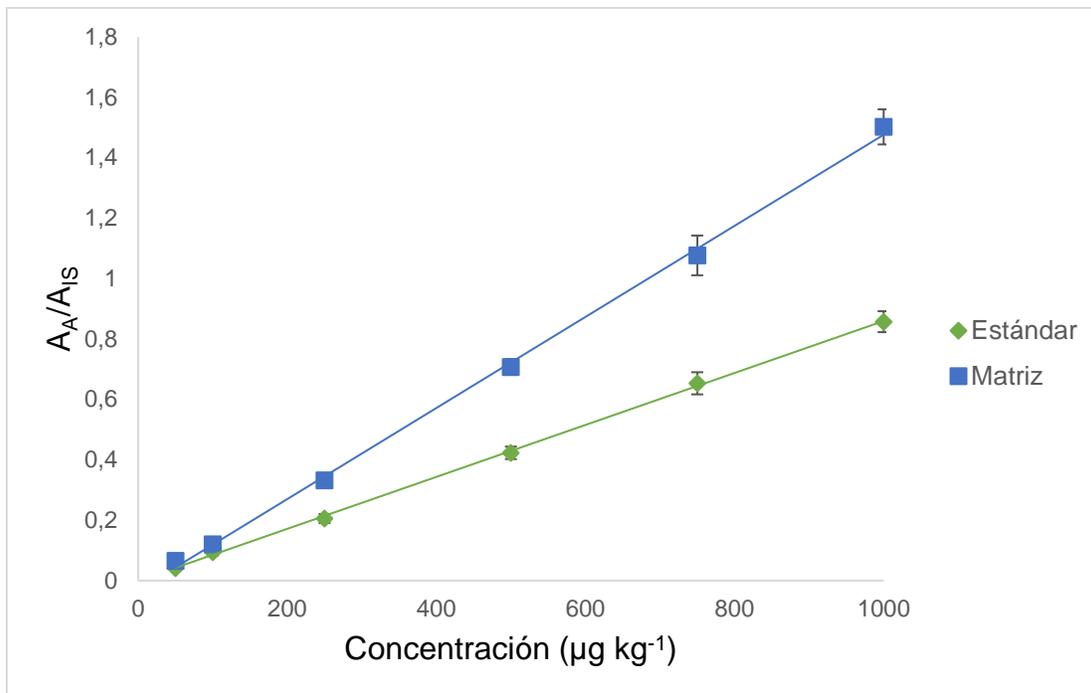


Figura 6-11. Comparación curva de calibración en estándar y matriz para NIV.

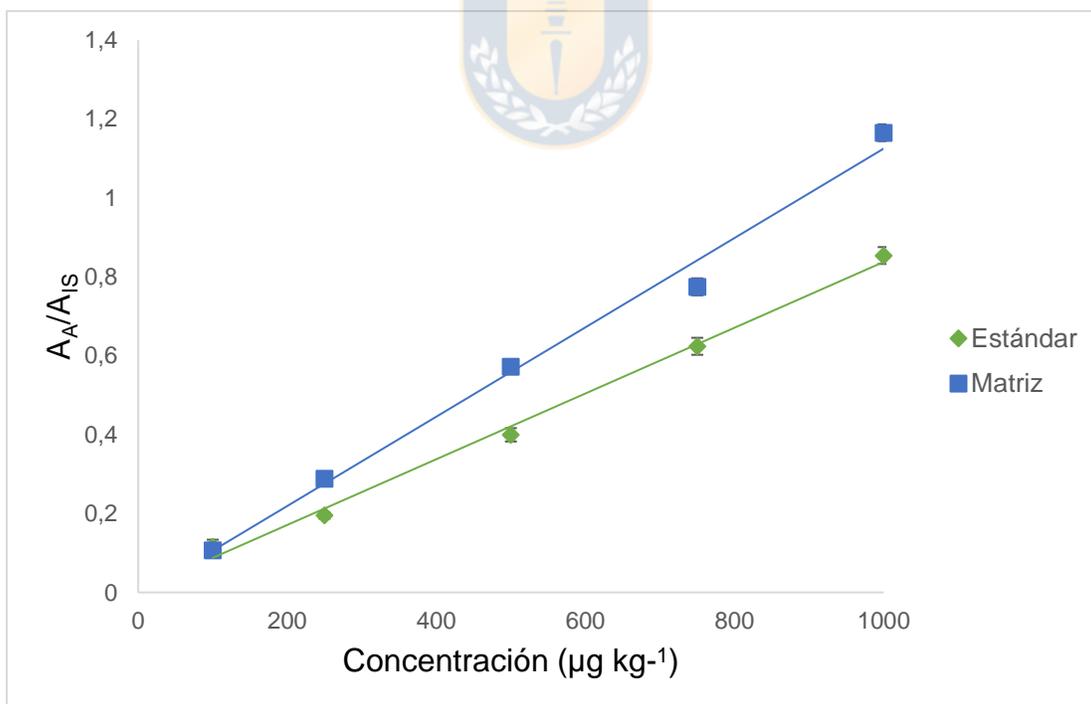


Figura 6-12. Comparación curva de calibración en estándar y matriz para DON.

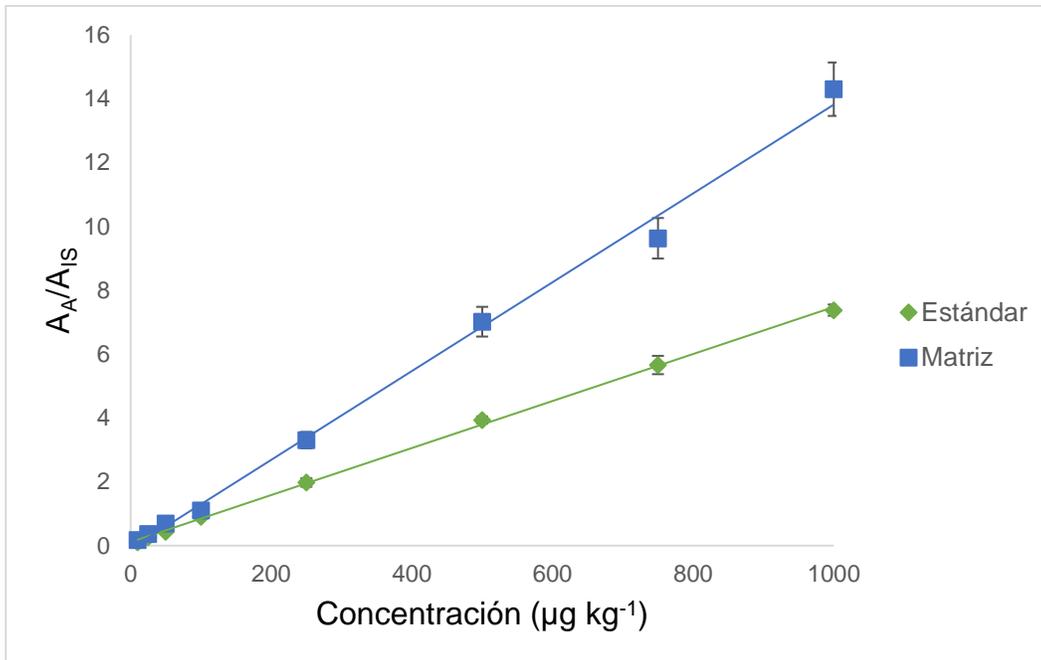


Figura 6-13. Comparación curva de calibración en estándar y matriz para 3-ADON.

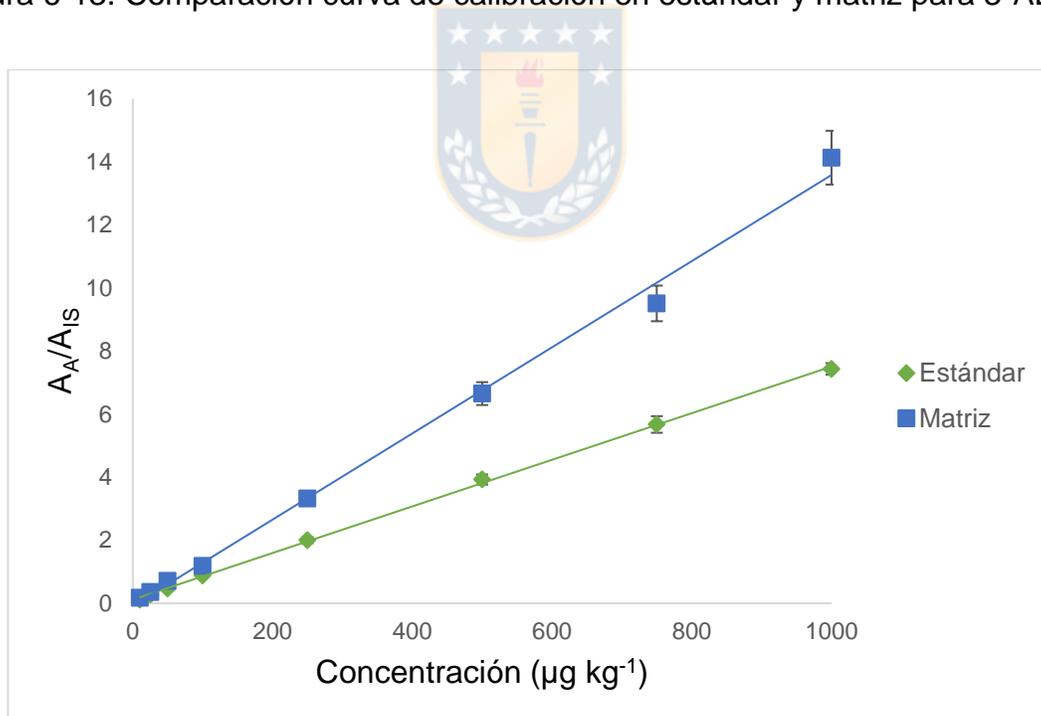


Figura 6-14. Comparación curva de calibración en estándar y matriz para 15-ADON.

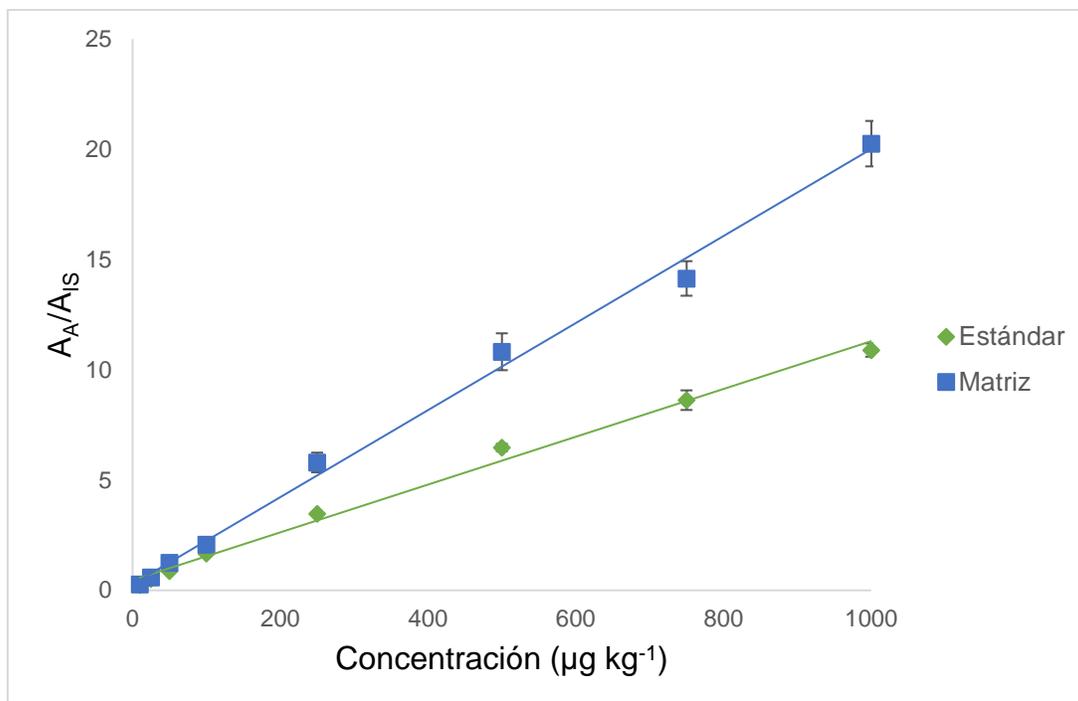


Figura 6-15. Comparación curva de calibración en estándar y matriz para ZEA.

### 6.3.2.2. Límite de detección y límite de cuantificación

#### 6.3.2.2.1. Fumonisinias B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub>

Estos parámetros se evaluaron en matriz para FB<sub>1</sub> y en estándar para FB<sub>2</sub> utilizando el método de señal/ruido, obteniéndose un LOD de 7,6 µg kg<sup>-1</sup> para FB<sub>1</sub> y de 61,0 µg L<sup>-1</sup> (equivalentes a 6,1 µg kg<sup>-1</sup> en arroz) para FB<sub>2</sub>; y un LOQ de 25,0 µg kg<sup>-1</sup> y 200,0 µg L<sup>-1</sup> (equivalentes a 20,0 µg kg<sup>-1</sup> en arroz) para FB<sub>1</sub> y FB<sub>2</sub> respectivamente, como se señala en la Tabla 6-7.

Tabla 6-7. LOQ de FB<sub>1</sub> y FB<sub>2</sub> en arroz.

	<b>FB<sub>1</sub></b>	<b>FB<sub>2</sub></b>
<b>Concentración (µg kg<sup>-1</sup>)</b>	25,0	20,0
<b>Área (EU)</b>	664569,7	1697262,4
<b>SD</b>	11628,4	57706,9
<b>CV %</b>	1,8	3,4
<i>n</i> = 5		

#### 6.3.2.2.2. Tricotecenos de tipo B y Zearalenona

Estos parámetros se evaluaron en matriz para todas las micotoxinas utilizando el método de señal/ruido, obteniéndose un LOQ entre 10,0 µg kg<sup>-1</sup> y 100,0 µg kg<sup>-1</sup> como se señala en la Tabla 6-8.

Para verificar experimentalmente si el LOQ tiene correspondencia con la capacidad real del método, se sobrecargó en quintuplicado un blanco de arroz a la concentración de 10 µg kg<sup>-1</sup> para 3-ADON, 15-ADON y ZEA, 50 µg kg<sup>-1</sup> para NIV y 100 µg kg<sup>-1</sup> en DON, todos los valores correspondieron a 10 veces la señal del ruido, demostrando que el LOQ obtenido es el adecuado.

Tabla 6-8. LOQ de TCT-B y ZEA en arroz.

	<b>NIV</b>	<b>DON</b>	<b>3-ADON</b>	<b>15-ADON</b>	<b>ZEA</b>
<b>Concentración (<math>\mu\text{g kg}^{-1}</math>)</b>	50,0	100,0	10,0	10,0	10,0
<b>Área (Intensidad)</b>	673,4	1305,3	1776,2	1758,1	2746,6
<b>SD</b>	26,2	28,9	58,2	49,5	86,9
<b>CV %</b>	3,9	2,2	3,3	2,8	3,3

*n* = 5

### 6.3.2.3. Precisión

#### 6.3.2.3.1. Fumonisina B<sub>1</sub>

Se midió repetibilidad y precisión intermedia del método analítico en arroz según lo descrito en 5.3.3.3. Los resultados obtenidos para FB<sub>1</sub> se presentan en la Tabla 6-9 y en la Tabla 6-10 para el estudio de repetibilidad (*n* = 6) y precisión intermedia (*n* = 3; 3 días), respectivamente.

Tabla 6-9. Repetibilidad de FB<sub>1</sub> en arroz sobrecargado (*n* = 6).

<b>Micotoxina</b>	<b>Sobrecarga (<math>\mu\text{g kg}^{-1}</math>)</b>	<b>Promedio (<math>\mu\text{g kg}^{-1}</math>)</b>	<b>CV %</b>	<b>CV<sub>hr</sub> %</b>
<b>FB<sub>1</sub></b>	25,0	21,3	1,8	13,9
	50,0	40,3	4,2	12,6

*n* = 6

Los valores obtenidos del CV % de la metodología analítica en arroz fueron comparados con el CV<sub>hr</sub> %, siendo el CV % < CV<sub>hr</sub> % en ambos niveles de sobrecargas. Por lo tanto, el método analítico es preciso bajo condiciones de repetibilidad para las sobrecargas de 25,0 y 50,0 µg kg<sup>-1</sup>.

Tabla 6-10. Precisión intermedia de FB<sub>1</sub> en arroz sobrecargado (*n* = 3; 3 días).

Micotoxina	Sobrecarga (µg kg <sup>-1</sup> )	Promedio (µg kg <sup>-1</sup> )	CV %	CV <sub>hRi</sub> %
FB <sub>1</sub>	25,0	21,2	2,3	18,6
	50,0	40,4	4,4	16,7

*n* = 3; 3 días

Los valores obtenidos del CV % del método analítico en arroz fueron comparados con el CV<sub>hRi</sub> %, siendo el CV % < CV<sub>hr</sub> % en ambos niveles de sobrecargas. Por lo tanto, la metodología analítica es precisa bajo condiciones de precisión intermedia para las sobrecargas de 25,0 y 50,0 µg kg<sup>-1</sup>.

#### 6.3.2.3.2. Tricotecenos de tipo B y Zearalenona

Se midió repetibilidad y precisión intermedia del método analítico en arroz según lo descrito en 5.3.3.3. Los resultados obtenidos para TCT-B y ZEA se presentan en la Tabla 6-11 y en la Tabla 6-12 para el estudio de repetibilidad (*n* = 6) y precisión intermedia (*n* = 4; 3 días), respectivamente.

Tabla 6-11. Repetibilidad de TCT-B y ZEA en arroz sobrecargado ( $n = 6$ ).

<b>Micotoxina</b>	<b>Sobrecarga (<math>\mu\text{g kg}^{-1}</math>)</b>	<b>Promedio (<math>\mu\text{g kg}^{-1}</math>)</b>	<b>CV %</b>	<b>CV<sub>hr</sub> %</b>
<b>NIV</b>	250,0	180,5	8,3	9,9
<b>DON</b>	250,0	215,1	7,3	9,9
<b>3-ADON</b>	250,0	227,5	4,8	9,9
<b>15-ADON</b>	250,0	230,2	4,2	9,9
<b>ZEA</b>	250,0	216,9	8,0	9,9

$n = 6$

Los valores obtenidos del CV % de la metodología analítica en arroz fueron comparados con el CV<sub>hr</sub> %, siendo en todas las micotoxinas el CV % < CV<sub>hr</sub> %. Por lo tanto, el método analítico es preciso bajo condiciones de repetibilidad para la sobrecarga de 250  $\mu\text{g kg}^{-1}$ .

Tabla 6-12. Precisión intermedia de TCT-B y ZEA en arroz sobrecargado ( $n = 4$ ; 3 días).

<b>Micotoxina</b>	<b>Sobrecarga (<math>\mu\text{g kg}^{-1}</math>)</b>	<b>Promedio (<math>\mu\text{g kg}^{-1}</math>)</b>	<b>CV %</b>	<b>CV<sub>hRi</sub> %</b>
<b>NIV</b>	250,0	180,5	8,4	13,1
<b>DON</b>	250,0	215,3	6,5	13,1
<b>3-ADON</b>	250,0	229,6	4,8	13,1
<b>15-ADON</b>	250,0	230,1	4,6	13,1
<b>ZEA</b>	250,0	218,8	7,4	13,1

$n = 4$ ; 3 días

Los valores obtenidos del CV % del método analítico en arroz fueron comparados con el CV<sub>hRi</sub> %, siendo el CV % < CV<sub>hRi</sub> % para todas las micotoxinas en el nivel de sobrecarga estudiado. Por lo tanto, la metodología analítica es precisa bajo condiciones de precisión intermedia para las sobrecargas en arroz de 250 µg kg<sup>-1</sup>.

#### 6.3.2.4. Exactitud

##### 6.3.2.4.1. Fumonisina B<sub>1</sub>

Se evaluó la exactitud mediante el porcentaje de recuperación (% R) del proceso extractivo a dos niveles de concentración. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 6-13.

Tabla 6-13. Recuperación de FB<sub>1</sub> en arroz sobrecargado ( $n = 3$ ; 3 días).

Micotoxina	Sobrecarga (µg kg <sup>-1</sup> )	Recuperación (%)	SD	CV %
FB <sub>1</sub>	25,0	84,6	1,0	1,2
	50,0	80,8	0,3	0,4

$n = 3$ ; 3 días

Los % de recuperación obtenidos del método extractivo se compararon con los criterios empleados por el *Codex Alimentarius* (80 a 110%) y el Reglamento de la Unión Europea (70 a 110%), los cuales están dentro del rango de aceptación. Los valores coinciden con los obtenidos en literatura, por ejemplo, la AOAC reporta una recuperación para FB<sub>1</sub> en maíz entre 81,1% y 84,2% (AOAC, 2005) y Coronel et. al, valores mayores a 80% en maíz (Coronel et al., 2016).

#### 6.3.2.4.2. Tricotecenos de tipo B y Zearalenona

Se evaluó la exactitud mediante el porcentaje de recuperación (% R) del proceso extractivo de una sobrecarga de 250  $\mu\text{g kg}^{-1}$  en arroz. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 6-14.

Tabla 6-14. Recuperación de TCT-B y ZEA en arroz sobrecargado ( $n = 4$ ; 3 días).

<b>Micotoxina</b>	<b>Sobrecarga (<math>\mu\text{g kg}^{-1}</math>)</b>	<b>Recuperación (%)</b>	<b>SD</b>	<b>CV %</b>
<b>NIV</b>	250,0	72,0	7,7	8,1
<b>DON</b>	250,0	86,1	5,7	6,1
<b>3-ADON</b>	250,0	91,9	3,3	4,0
<b>15-ADON</b>	250,0	92,2	3,9	4,3
<b>ZEA</b>	250,0	87,5	5,6	6,9

( $n = 4$ ; 3 días)

Los % de recuperación obtenidos del método extractivo se compararon con los criterios empleados por el *Codex Alimentarius* (80 a 110%) para todas las micotoxinas y por el Reglamento de la Unión Europea (60 a 120%) para DON y ZEA. Las micotoxinas DON, 3-ADON, 15-ADON y ZEA cumplen con los rangos de aceptación establecidos. En cambio, NIV presenta un %R inferior a lo señalado por el *Codex Alimentarius*. Estos valores de NIV coinciden con los obtenidos en literatura con la columna SPE Bond Elut Mycotoxin para trigo, por ejemplo, Klötzel et al. reportaron una recuperación del 67% (Klötzel et al., 2006), Schothorst & Jekel,

un %R del 79% (Schothorst & Jekel, 2003) y Biselli & Hummert, una recuperación del 65% (Biselli & Hummert, 2007). Por lo tanto, el método extractivo no es exacto para la determinación de NIV, no obstante, debido a la similitud estructural sesquiterpenoides de los TCT-B, podría aceptarse el %R de NIV, en base al criterio establecido por el Reglamento de la Unión Europea.

#### 6.4. Determinación de la capacidad micotoxigénica, *in vitro*, de la(s) especie(s) aislada(s)

##### 6.4.1. Producción de micotoxinas *in vitro*

Para determinar la producción de micotoxinas de los diferentes aislados con las condiciones descritas en la sección 5.4.1, se analizaron las muestras de arroz contaminadas con las cepas “FMID” y “FGRAM” correspondiente a *F. proliferatum* y *F. graminearum*, respectivamente.

##### 6.4.1.1. Aislamiento de *F. proliferatum*

En las Tabla 6-15 y Tabla 6-16 se presentan los resultados obtenidos para el aislamiento “FMID”.

Tabla 6-15. Producción de FB<sub>1</sub> por *Fusarium proliferatum* cepa FMID en arroz.

Concentración FB <sub>1</sub> (µg kg <sup>-1</sup> )						
Réplicas	15 °C		25 °C		30 °C	
	40 mL	80 mL	40 mL	80 mL	40 mL	80 mL
<b>1</b>	869,7	112,3	572,9	189,8	138,7	98,2
<b>2</b>	586,8	614,9	709,3	147,2	124,4	78,6
<b>3</b>	1377,9	451,2	1993,5	55,8	136,1	71,8
<b>4</b>	1339,6	368,1	887,9	149,1	271,6	111,7
<b>Promedio</b>	1042,7	386,6	1040,9	135,5	167,7	90,1
<b>SD</b>	383,4	209,7	648,1	56,6	69,5	18,3
<b>CV %</b>	36,8	54,2	62,3	41,8	41,5	20,3

Tabla 6-16. Producción de FB<sub>2</sub> por *Fusarium proliferatum* cepa FMID en arroz.

Concentración FB <sub>2</sub> (µg kg <sup>-1</sup> )						
Réplicas	15 °C		25 °C		30 °C	
	40 mL	80 mL	40 mL	80 mL	40 mL	80 mL
<b>1</b>	493,6	49,7	311,1	154,0	75,9	36,5
<b>2</b>	318,6	342,1	466,9	146,0	59,5	13,6
<b>3</b>	753,3	390,6	950,0	54,0	81,3	12,0
<b>4</b>	914,6	177,0	665,5	83,0	182,8	64,3
<b>Promedio</b>	620,0	239,9	598,4	109,3	99,9	31,6

<b>SD</b>	265,4	156,3	275,7	48,6	56,1	24,5
<b>CV %</b>	42,8	65,2	46,1	44,5	56,1	77,5

Según los resultados obtenidos en la Tabla 6-15 y la Tabla 6-16, se aprecia que *F. proliferarum* cepa FMID, es capaz de producir las micotoxinas FB<sub>1</sub> y FB<sub>2</sub>, característico de esta especie de *Fusarium* (Cendoya et al., 2018; Coronel et al., 2016; Damiani et al., 2019; Smith et al., 2017). La dispersión de los resultados se debe a que los discos tomados de la colonia para la inoculación no presentan la misma cantidad de conidias.

#### 6.4.1.2. Aislamiento de *F. graminearum*

En las Tabla 6-17, Tabla 6-18, Tabla 6-19 y Tabla 6-20, se presentan los resultados obtenidos para el aislamiento "FGRAM".

Tabla 6-17. Producción de DON por *F. graminearum* cepa FGRAM en arroz.

<b>Réplicas</b>	<b>Concentración DON (<math>\mu\text{g kg}^{-1}</math>)</b>					
	15 °C		25 °C		30 °C	
	40 mL	80 mL	40 mL	80 mL	40 mL	80 mL
<b>1</b>	1219,4	339,7	1922,1	497,3	3401,1	2410,9
<b>2</b>	750,5	314,1	2917,9	1040,9	5412,4	2107,4
<b>3</b>	1004,0	596,0	2061,2	706,1	3053,2	1312,8

<b>4</b>	496,0	105,9	2749,1	1710,6	3561,1	2743,7
<b>Promedio</b>	867,5	338,9	2412,6	988,7	3856,9	2146,2
<b>SD</b>	313,1	200,8	494,2	530,8	1058,9	613,4
<b>CV %</b>	36,1	59,3	20,5	53,7	27,4	28,6

Tabla 6-18. Producción de 3-ADON por *F. graminearum* cepa FGRAM en arroz.

Concentración 3-ADON ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )						
Réplicas	15 °C		25 °C		30 °C	
	40 mL	80 mL	40 mL	80 mL	40 mL	80 mL
<b>1</b>	102,3	94,6	141,6	136,7	100,1	122,1
<b>2</b>	105,1	104,9	145,7	208,4	110,2	150,7
<b>3</b>	78,4	136,4	156,6	114,3	108,6	188,9
<b>4</b>	33,3	110,4	134,7	280,7	148,8	159,7
<b>Promedio</b>	79,8	111,6	144,6	185,0	116,9	155,3
<b>SD</b>	33,2	17,8	9,2	75,4	21,7	27,5
<b>CV %</b>	41,7	15,9	6,3	40,7	18,6	17,7

Tabla 6-19. Producción de 15-ADON por *F. graminearum* cepa FGRAM en arroz.

Concentración 15-ADON ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )						
Réplicas	15 °C		25 °C		30 °C	
	40 mL	80 mL	40 mL	80 mL	40 mL	80 mL
1	100,3	113,7	138,1	136,5	98,2	121,3
2	101,3	96,1	148,2	210,6	97,6	155,6
3	77,0	101,9	203,0	113,2	113,6	182,3
4	34,1	76,6	138,8	288,9	114,9	154,4
<b>Promedio</b>	78,2	97,1	157,0	187,3	106,0	153,4
<b>SD</b>	31,5	15,5	31,0	79,5	9,4	25,0
<b>CV %</b>	40,3	15,9	19,8	42,4	8,9	16,3

Tabla 6-20. Producción de ZEA por *F. graminearum* cepa FGRAM en arroz.

Concentración ZEA ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )						
Réplicas	15 °C		25 °C		30 °C	
	40 mL	80 mL	40 mL	80 mL	40 mL	80 mL
1	7,4	3,3	22,5	4,4	6,6	7,2
2	5,5	3,6	27,9	25,8	4,2	6,1
3	5,4	4,3	21,2	3,8	4,3	nd
4	4,7	Nd	34,7	29,6	10,5	10,4

<b>Promedio</b>	5,8	3,7	26,6	15,9	6,4	7,9
<b>SD</b>	1,2	0,5	6,2	13,7	3,0	2,3
<b>CV %</b>	20,0	13,0	23,2	86,2	46,1	28,9

En los resultados obtenidos en las Tabla 6-17 a la Tabla 6-20, se observa que la cepa FGRAM, caracterizado como *F. graminearum*, es capaz de producir las micotoxinas DON, 3-ADON, 15-ADON y ZEA. Además, se detectó NIV bajo el límite de cuantificación, confirmando su identidad por UHPLC-ESI-MS/MS. La producción simultánea de DON, 3-ADON, 15-ADON y NIV es característico de esta especie de *Fusarium* (Belizán et al., 2019; Ferreira Geraldo et al., 2006; Garcia et al., 2012; Winter et al., 2019), siendo un hallazgo frecuente al utilizar un medio de cultivo sólido (arroz, trigo) para evaluar su capacidad micotoxigénica (Castañares et al., 2014; Ramírez Albuquerque et al., 2021). El aislamiento de *F. graminearum*, cepa FGRAM, no puede ser clasificado en el quimiotipo 3-ADON o 15-ADON, ya que se aprecia que la cantidad producida de los derivados acetilados es similar, sin embargo, no corresponde al quimiotipo NIV, pues la producción *in vitro* de esta micotoxina, solo pudo ser detectada a bajas concentraciones. En relación con la dispersión de los resultados se debe a que los discos tomados desde la colonia para la inoculación no presentan la misma cantidad de conidias.

6.5. Evaluación del efecto de la humedad del grano y temperatura en la producción de micotoxinas

6.5.1. Determinación de humedad

Se determinó el contenido de humedad del arroz estéril adicionando 40 mL y 80 mL de agua destilada. En las Tabla 6-21 y Tabla 6-22, se observan los resultados obtenidos para el control de humedad.

Tabla 6-21. Control de humedad en arroz estéril adicionando 40 mL de agua destilada ( $n = 3$ ).

<b>Muestra</b>	<b>Humedad (%)</b>
<b>1</b>	68,7
<b>2</b>	69,7
<b>3</b>	70,0
<b>Promedio</b>	69,5
<b>SD</b>	1,4
<b>CV %</b>	2,0

Tabla 6-22. Control de humedad en arroz estéril adicionando 80 mL de agua destilada ( $n = 3$ ).

<b>Muestra</b>	<b>Humedad (%)</b>
<b>1</b>	51,1
<b>2</b>	46,9
<b>3</b>	53,7
<b>Promedio</b>	50,6
<b>SD</b>	6,0
<b>CV %</b>	3,0

Los valores obtenidos en las Tabla 6-21 y 6-22 permite conocer el % de humedad presente en el arroz estéril y ver numéricamente como esta variable influye en la producción de micotoxinas en las especies de *Fusarium* caracterizadas.

#### 6.5.2. Diseño de experimentos

Se realizó un DoE tipo factorial completo mixto para evaluar el impacto de las variables temperatura y humedad en la producción de micotoxinas. Para esto se utilizaron los resultados obtenidos de los aislamientos “FMID” y “FGRAM” en la sección 6.4.1.1. y 6.4.1.2, respectivamente.

Posteriormente, para modelar la relación existente entre las variables estudiadas y las respuestas medidas, se generó un modelo de interacción utilizando regresión por cuadrados parciales mínimos (PLS).

PLS encuentra la relación entre una matriz “Y” (variables de respuesta) y una matriz “X” (variables predictoras o factoriales) expresada como:

$$Y = X B + E \qquad \text{Ecuación 6-1}$$

La matriz “Y” se refiere a las características de interés (respuestas). La matriz “X” se refiere a las variables predictoras y a sus cuadrados y/o términos cruzados si estos se han agregado al modelo.

Al ajustar el modelo de regresión, la herramienta de diagnóstico más importante consiste en los dos parámetros complementarios  $R^2$  y  $Q^2$ . El parámetro  $R^2$  se denomina bondad de ajuste y es una medida de qué tan bien se puede hacer que el modelo de regresión se ajuste a los datos experimentales.  $R^2$  varía entre 0 y 1, donde 1 indica un modelo perfecto y 0 que no se ajusta a ningún modelo. Por tanto, cuanto mayor sea el valor de  $R^2$ , mayor es el ajuste del modelo con las mediciones reales de las respuestas. La principal desventaja de  $R^2$  es que se puede acercar arbitrariamente a 1. Por lo tanto,  $R^2$  por sí solo no es un indicador suficiente para probar la validez de un modelo.

El parámetro  $Q^2$  proporciona una indicación mucho mejor de la validez de un modelo de regresión. Este parámetro se denomina bondad de predicción y estima el poder predictivo del modelo. Este es un indicador de rendimiento más realista y útil, ya

que refleja el objetivo final del modelado: las predicciones de nuevos experimentos. Como  $R^2$ ,  $Q^2$  tiene el límite superior 1, pero su límite inferior es menos infinito. Para que un modelo pase esta prueba de diagnóstico, tanto  $R^2$  como  $Q^2$  deben ser altos, y preferiblemente no separados por más de 0,2 a 0,3 unidades. Una diferencia sustancialmente mayor constituye una advertencia de un modelo con bajo poder predictivo. Otros parámetros que permiten complementar la información de la calidad del modelo son de reproducibilidad y los valores de validación. La reproducibilidad es una medida del control del error experimental, y cuando este valor es alto (mayor a 0,5) se tiene un buen control del error experimental. Si 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 (Eriksson et.al., 2000).



#### 6.5.2.1. Aislamiento de *F. proliferatum*

La validación estadística del modelo de interacción obtenido con los 24 experimentos se realizó mediante un test ANOVA con un nivel de confianza del 95%. En la Tabla 6-23 se muestra los parámetros del modelo correspondiente a la producción *in vitro* de las micotoxinas FB<sub>1</sub> y FB<sub>2</sub>.

Tabla 6-23. Evaluación estadística del modelo tras 2 PLS-componentes, ensayo de producción *in vitro* de *F. proliferatum* cepa FMID.

Parámetros del modelo	Y-respuestas		Modelo total
	FB <sub>1</sub>	FB <sub>2</sub>	
<b>R<sup>2</sup></b>	0,648976	0,605247	0,627112
<b>Q<sup>2</sup></b>	0,627005	0,581726	0,604366
<b>Validez del modelo</b>	- 0,2	- 0,159798	
<b>Reproducibilidad</b>	0,779775	0,737857	
<b>p de regresión</b>	0,000	0,000	
<b>p de lack of fit</b>	0,006	0,010	

Los resultados presentados en la Tabla 6-23 muestran que la significancia del modelo de regresión, para cada una de las respuestas medidas, tiene un valor de  $p < 0,000$  y una diferencia entre  $R^2$  y  $Q^2$  menor de 0,2 a 0,3 unidades (con valores de  $R^2 > 0,60$  y de  $Q^2 > 0,58$ ) lo que indica que es un modelo satisfactorio y significativo. La reproducibilidad tiene valores mayores a 0,73, teniendo un buen control del error experimental. Sin embargo, la validez del modelo tiene un valor negativo y la comparación del error del modelo con el error de réplicas arroja un valor de  $p < 0,05$ , lo que indica que hay falta de ajuste en el modelo.

Un medio eficaz para interpretar el modelo PLS es el gráfico de *loadings*, en el cual se grafican todas las variables estudiadas con sus interrelaciones y todas las

respuestas medidas en un solo gráfico. En la interpretación del modelo se considera la distancia al origen. Cuanto más lejos del origen del gráfico se encuentra una variable  $X$ , más fuerte es el impacto del modelo que tiene esa variable en particular, y mientras más cerca del origen del gráfico menor es su impacto. También se debe considerar el signo de la carga PLS, que informa sobre la correlación entre las variables. Debido a que PLS da como resultado un solo modelo, es posible revisar las relaciones entre todos los factores y todas las respuestas al mismo tiempo (Eriksson et.al., 2000).

En la Figura 6-16 se presenta el gráfico de *loadings* en el cual se grafican las variables estudiadas y las respuestas, mostrando así sus interrelaciones. Se observa que las  $FB_1$  y  $FB_2$  están agrupadas, por lo tanto, hay una similitud en el impacto de las variables en la producción de estas. La temperatura (Temp) y la cantidad de agua (Vol) tienen un gran impacto y como se encuentran en un cuadrante distinto a las respuestas, están correlacionadas negativamente, es decir, a menor temperatura y menor cantidad de agua utilizada mayor producción de micotoxinas. El impacto de la interacción Temp\*Vol no es significativa sobre las respuestas, ya que la intersección de esta pasa cerca del origen del gráfico.

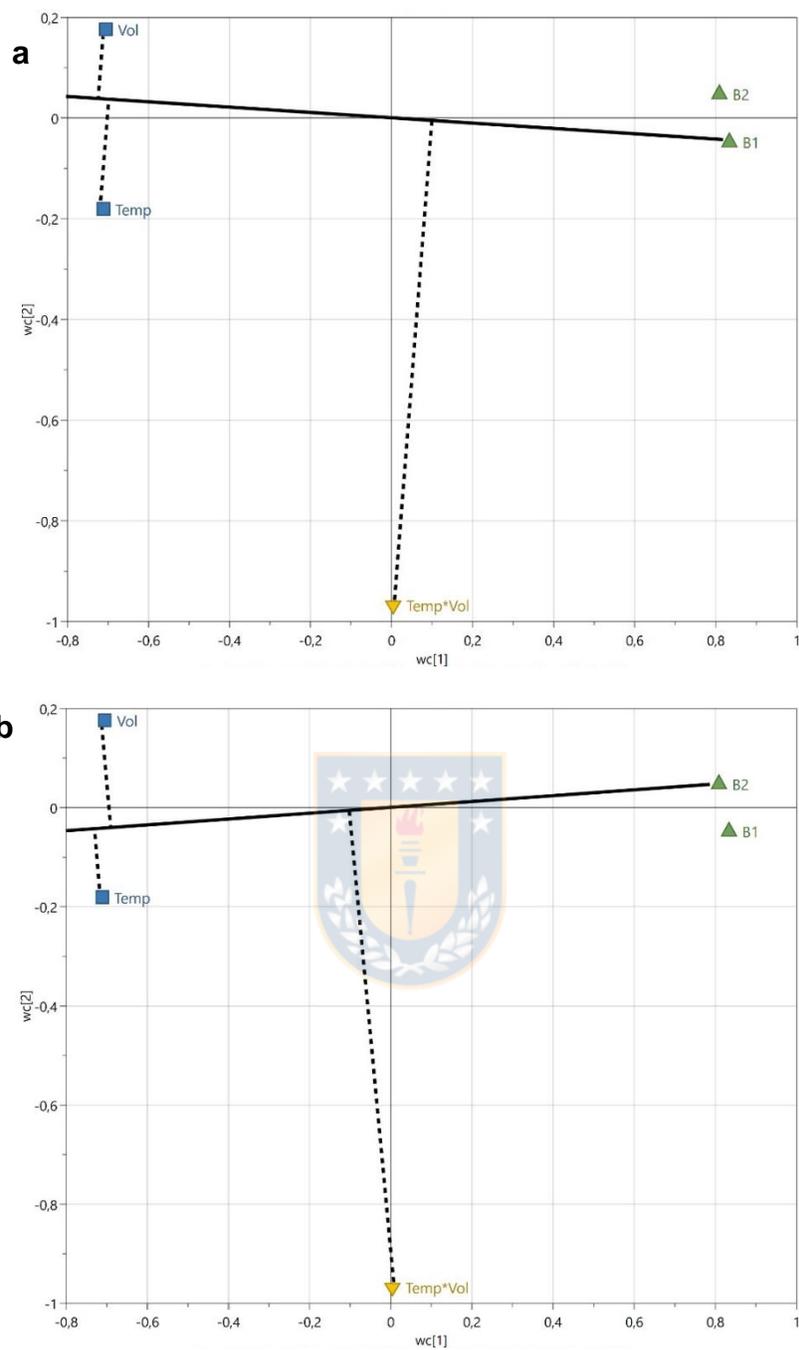


Figura 6-16. Gráfico PLS *loadings* para las respuestas (a)  $FB_1$  y (b)  $FB_2$ , ensayo de producción *in vitro* de micotoxinas por *F. proliferatum* cepa FMID.

Por lo tanto, se establece que la cantidad de agua adicionada al medio de arroz y la temperatura influyen significativamente en la producción *in vitro* de estas micotoxinas. Estos resultados coinciden con lo reportado en literatura, por ejemplo, Ryu et. al (1999), establecieron que *F. proliferatum* parece estar mejor adaptado a bajas temperaturas y puede producir mayores cantidades de FB<sub>1</sub> (Ryu, D et al., 1999). Marín et al (2004), mostró el efecto de diferentes sustratos (maíz, trigo y cebada) y niveles de  $a_w$  (0,93, 0,95 y 0,98) sobre el crecimiento y producción de FB<sub>1</sub> a 25 °C por *F. verticillioides* y *F. proliferatum*, en donde demostraron que, aunque las especies de *Fusarium* productores de FUMO aislados de los granos de maíz pueden colonizar la cebada y el trigo más rápidamente que el maíz, no pudieron producir FB<sub>1</sub> en estos cereales, obteniendo que 25 °C es una temperatura adecuada para la producción de FUMO en maíz (Marín et al., 2004). Un estudio más reciente realizado por Cendoya et. al (2018), compararon el impacto de la temperatura (15, 25 y 30 °C) y de la  $a_w$  (0,65 a 0,995) en la producción de FUMO en granos de trigo irradiados, por tres cepas de *F. proliferatum* aisladas de granos de trigo, en el cual encontraron que las mayores cantidades de FUMO producidas por las cepas de *F. proliferatum* estudiadas fueron a 15 °C y posteriormente a 25 °C (Cendoya et al., 2014, 2018). En relación con la  $a_w$  no se observó producción significativa de ninguna de las toxinas a una  $a_w \leq 0,92$  (equivalentes a 13,9 mL en 100 g de trigo) (Cendoya et al., 2018).

La influencia de las variables temperatura y de  $a_w$  (esta última estudiada en función de la cantidad de agua) en la producción de FUMO, están además condicionadas por la expresión de los genes FUM biosintéticos. Medina et. al (2013), concluyeron

que la temperatura y la  $a_w$  tienen un efecto profundo tanto en la expresión génica como en el crecimiento y la producción fenotípica de los metabolitos secundarios tóxicos en *F. proliferatum* (Medina et al., 2013). Cendoya et. al (2017), analizaron la expresión relativa de *FUM19* y *FUM8* en un trigo de tres cepas de *F. proliferatum* y descubrió que para la expresión de ambos genes a 25 °C se correlacionó con la producción de FUMO (Cendoya et al., 2017).

#### 6.5.2.2. Aislamiento de *F. graminearum*

La validación estadística del modelo de interacción obtenido del DoE con 24 experimentos se realizó mediante un test ANOVA con un nivel de confianza del 95%. En la Tabla 6-24 se muestra los parámetros del modelo correspondiente a la producción *in vitro* de las micotoxinas DON, 3-ADON, 15-ADON y ZEA. NIV no fue detectado.

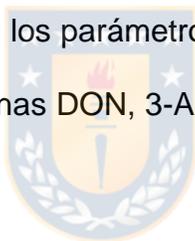


Tabla 6-24. Evaluación estadística del modelo tras 2 PLS-componentes, ensayo de producción *in vitro* de *F. graminearum* cepa FGRAM.

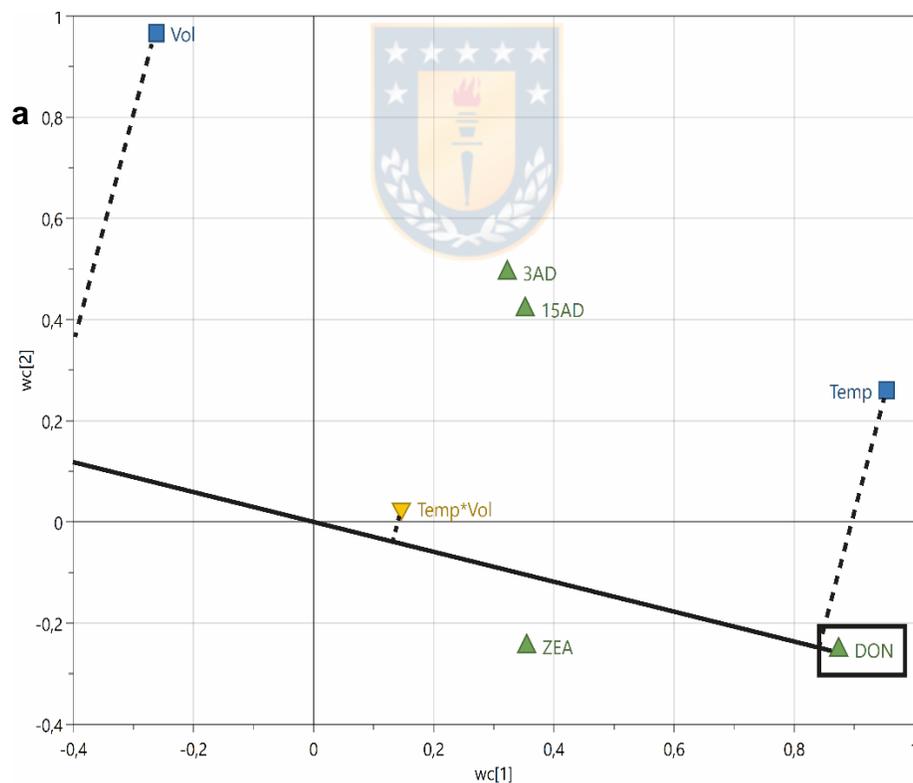
Parámetros del modelo	Y-respuestas				Modelo total
	DON	3-ADON	15-ADON	ZEA	
$R^2$	0,820	0,347	0,291	0,179	0,409
$Q^2$	0,687	0,199	0,137	0,033	0,264
<b>Validez del modelo</b>	0,916314	0,499056	0,123323	- 0,2	

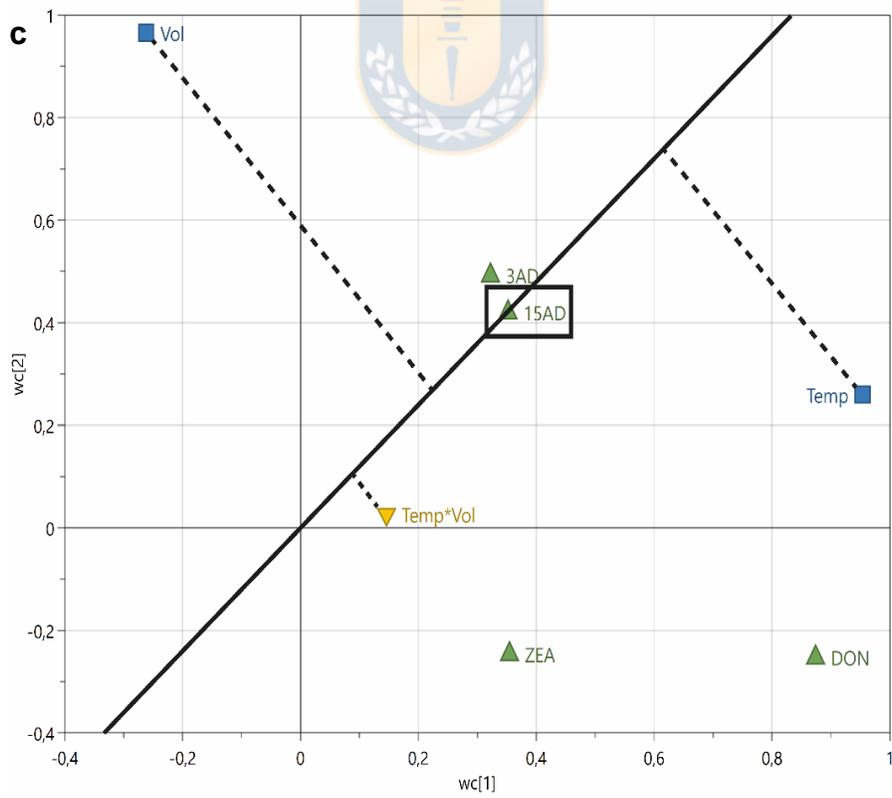
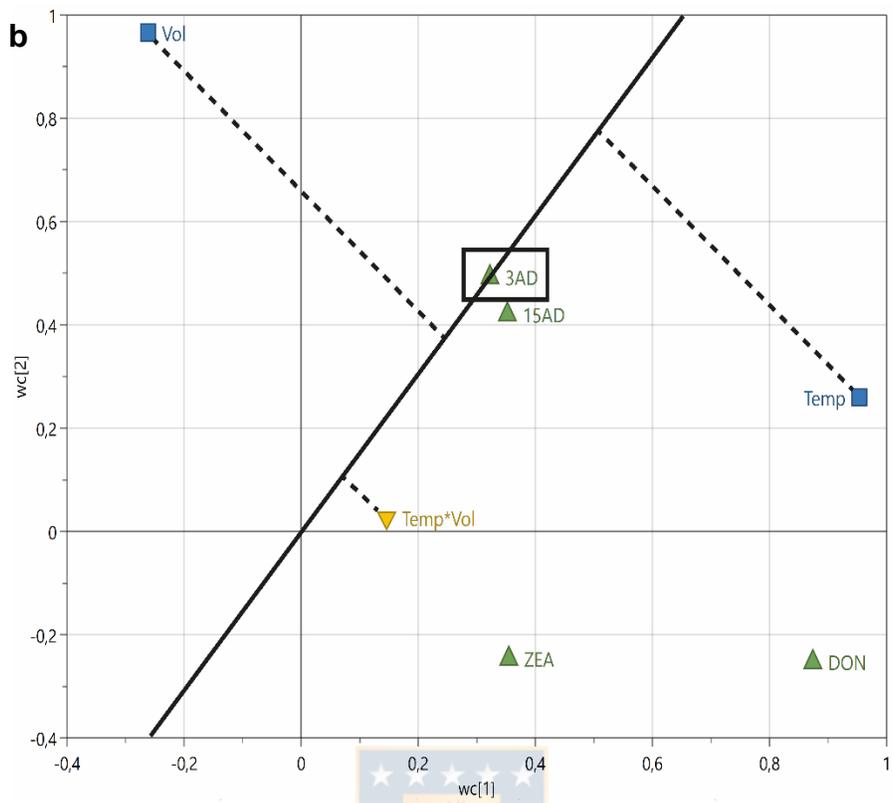
<b>Reproducibilidad</b>	0,785906	0,389114	0,441367	0,486647
<b>p de regresión</b>	0,000	0,011	0,027	0,126
<b>p de lack of fit</b>	0,716	0,124	0,030	0,004

En los resultados presentados en la Tabla 6-24 se aprecia que la significancia del modelo de regresión para las respuestas de DON, 3-ADON y 15-ADON tiene valores de  $p < 0,027$ , y una diferencia entre  $R^2$  y  $Q^2$  menor a 0,2 - 0,3 (con valores para DON de  $R^2 = 0,82$  y de  $Q^2 = 0,69$ ) lo que indica que es un modelo satisfactorio y significativo. La reproducibilidad tiene un valor  $> 0,5$  en DON, teniendo un buen control del error experimental. Se muestra un buen ajuste de los datos del modelo para DON y 3-ADON, ya que la comparación del error del modelo con el error de réplicas arroja valores de  $p > 0,05$  y una validez del modelo con valores  $> 0,25$ . En el caso de la respuesta de ZEA, se aprecia que no hay un buen control del error experimental, con una reproducibilidad  $< 0,5$  y una falta de ajuste en el modelo de regresión, con un valor para la comparación del error del modelo con el error experimental de  $p = 0,004$  y una validez del modelo de  $-0,2$ . Por lo tanto, el modelo es apropiado para obtener información de cuáles son las variables que tienen mayor influencia en la producción *in vitro* de las micotoxinas DON, 3-ADON y 15-ADON y determinar si existen interacciones significativas entre las variables.

En el gráfico de *loadings* (Figura 6-17) se aprecia que DON y ZEA están muy cercanas entre sí, por lo que se comportan de igual manera, ambas variables tienen un gran impacto en la producción de estas. La temperatura se encuentre en el

mismo cuadrante, estando correlacionada positivamente, es decir, a mayor temperatura mayor es la producción de estas micotoxinas, contrario a la cantidad de agua que está en un cuadrante distinto a las respuestas, correlacionándose negativamente, en donde, a menor cantidad de agua, mayor es la producción de DON y ZEA. La producción de 3-ADON y 15-ADON se ve afectada directamente proporcional por las dos variables, ya que ambas micotoxinas están agrupadas y su ubicación en el mismo cuadrante a las respuestas señala que al aumentar la cantidad de agua o la temperatura aumenta la producción de estas micotoxinas. El impacto de la interacción Temp\*Vol no es significativa sobre las respuestas, ya que la intersección de esta pasa cerca del origen del gráfico.





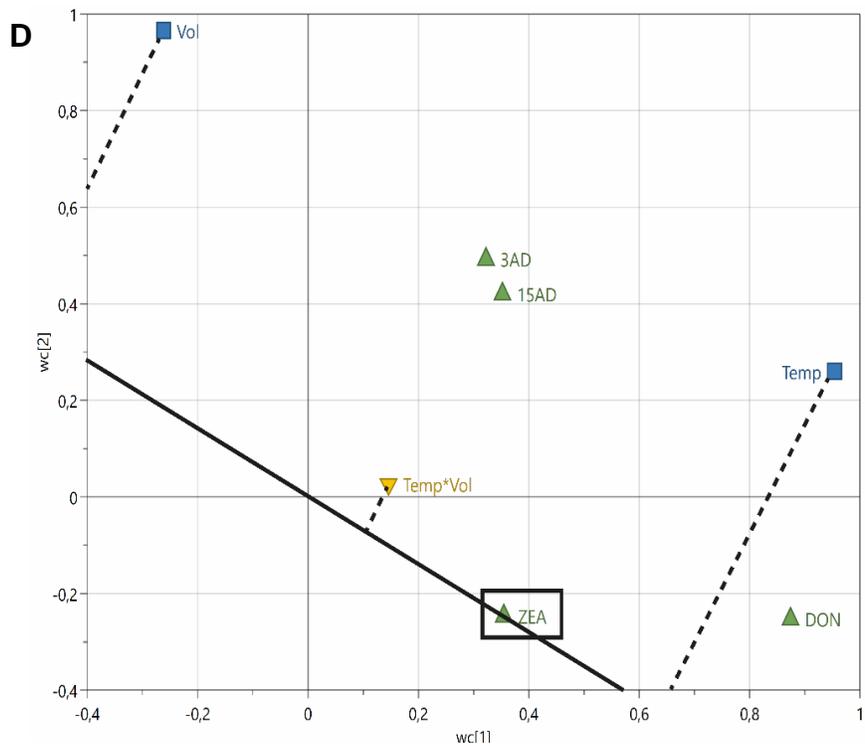


Figura 6-17. Gráfico de *loadings* del primer y segundo PLS-componente con proyecciones para las respuestas (a) DON (b) 3-ADON (c) 15-ADON (d) ZEA; producción *in vitro* de micotoxinas del aislado de *F. graminearum* cepa FGRAM.

Por lo tanto, se establece que la cantidad de agua adicionada al medio de arroz y la temperatura influyen significativamente en la producción de las micotoxinas *in vitro*. Los resultados presentan coincidencias con lo reportado en literatura, por ejemplo, Belizán et al., (2019), analizaron el efecto de la temperatura y actividad de agua en la producción de DON en *F. graminearum*, en donde los niveles más altos de esta micotoxina se situaron a 30 °C y a una  $a_w$  entre 0,995 (equivalente a 40,7 mL de agua en 100 g de trigo, según Cendoya et al., (2018)) y 0,997 (Belizán et al., 2019). Ramírez et al., (2021), mostraron que *F. graminearum* presentó un patrón similar de

producción para DON, 3-ADON y 15-ADON en relación con la temperatura, en donde para todas ellas las altas temperaturas (25 y 30 °C) favorecieron la producción de estas micotoxinas. Sin embargo, también hay estudios que presentan diferencias con los resultados obtenidos, por ejemplo, Caro et al., (2015), determinó que el aislamiento de *F. graminearum*, FUS 2013-7, proveniente desde trigo nacional, produjo mayores concentraciones de DON a una mayor cantidad de agua. Además, la interacción entre las variables temperatura y cantidad de agua provocó el mayor impacto en la producción de 3-ADON, 15-ADON y DON (Caro et al., 2015). García et al., (2012), observaron que *F. graminearum* consiguió los niveles máximos de DON y ZEA después de 15 días de incubación y a una temperatura de 15 °C (García et al., 2012). Las diferencias en los resultados pudiesen deberse a que existen otros parámetros que inciden en la producción de las micotoxinas como: la luminosidad, el tiempo de incubación, ciclos de temperatura, pH, entre otros (Arata et al., 2021). Por lo tanto, sería interesante incluirlos en nuevos estudios.

Con relación a la ZEA, los datos publicados en literatura son muy diversos, varios autores han obtenido que la producción de ZEA es menor a bajas temperaturas y humedad (Martins & Martins, 2002; Milano & Lopez, 1991; Ryu & Bullerman, 1999) y, por el contrario, también se han encontrado que las condiciones óptimas de producción de ZEA fueron a temperaturas y humedades altas (Bresler et al., 1998; Greenhalgh et al., 1983). Sin embargo, estudios más recientes han coincidido con los resultados obtenidos, Lahouar et. al (2017), analizaron el efecto de la temperatura (15 a 35 °C) en la producción de ZEA por *F. graminearum* en trigo, en

donde informaron que la mayor producción de esta micotoxina se observó a 25 y 30 °C y la menor producción en las temperaturas marginales (15 y 35 °C). Por lo tanto, es difícil obtener conclusiones generales sobre el ajuste del modelo para controlar las condiciones de temperatura y humedad del grano en producción *in vitro* de ZEA en diferentes cepas de *Fusarium*.



## 7. CONCLUSIONES

Se logró aislar y caracterizar molecularmente dos especies de *Fusarium* provenientes de cereales nacionales (maíz y trigo) provenientes de la Región de Ñuble, las cuales fueron identificadas como *Fusarium proliferatum* y *Fusarium graminearum*.

Se implementaron metodologías analíticas por HPLC-FD para la determinación y cuantificación de FB<sub>1</sub> y FB<sub>2</sub>, y un método de análisis por HPLC-ESI-MS/MS para cuantificar las micotoxinas NIV, DON, 3-ADON, 15-ADON y ZEA.

Se determinó la capacidad micotoxigénica de *Fusarium proliferatum* y *Fusarium graminearum*, mediante estudios realizados *in vitro* en un medio de cultivo sólido (arroz), bajo las condiciones de humedad del grano (adicionando 40 y 80 mL de agua) y de temperatura (15, 25 y 30 °C).

Se evaluaron los efectos de la humedad del grano y la temperatura en la producción *in vitro* de las micotoxinas, en donde la influencia de estas afectó significativamente y de forma independiente la producción *in vitro* de las micotoxinas. La producción de las fumonisinas B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub> y de DON aumentaron a mayor temperatura y menor cantidad de agua, mientras que para 3-ADON y 15-ADON se necesitaron una mayor temperatura y cantidad de agua. En el caso de la producción *in vitro* de ZEA, el efecto de estas dos variables no fue concluyente.

## 8. GLOSARIO

15-ADON: 15-acetildeoxinivalenol

3-ADON: 3-acetildeoxinivalenol

A<sub>A</sub>: Área del analito

a<sub>w</sub>: Actividad de agua

AcAcét: Ácido acético

AcEt: Acetato de etilo

ACN: Acetonitrilo

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADN<sub>r</sub>: Ácido desoxirribonucleico ribosómico

AF: Aflatoxinas

A<sub>IS</sub>: Área estándar interno

ANOVA: Análisis de varianza

AOAC: Asociación de comunidades analíticas

ARN: Ácido ribonucleico

BLAST: Búsqueda de alineación local básica

BEA: Beauvericina



CHCl<sub>3</sub>: Cloroformo

CoA: Coenzima A

CTAB: Bromuro de cetil-trimetilamonio

CV: Coeficiente de variación

dNPT: Desoxinucleótido trifosfato

dSPE: Dispersión en fase sólida

DAS: Diacetoxiscirpenol

DoE: Diseño de experimentos

DON: Deoxinivalenol

ELISA: Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas

ECD: Detector de captura de electrones

ENN: Eniantinas

ESI: Ionización por electrospray

EtOH: Etanol

F: *Fusarium*

FB: Fumonisina de tipo B

FB<sub>1</sub>: Fumonisina B<sub>1</sub>

FB<sub>2</sub>: Fumonisina B<sub>2</sub>



FB<sub>3</sub>: Fumonisin B<sub>3</sub>

FC: Fumonisin de tipo C

FID: Detector de ionización de llama

FLD: Detector de fluorescencia

FUMO: Fumonisin

FUS: Fusaproliferina

FUX: Fusarenon-X

GC: Cromatografía de gases

H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>: Ácido fosfórico

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución

HPTLC: Cromatografía en capa fina de alta resolución

HSCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH: 2-mercaptoetanol

IAC: Columna de inmovilización

IARC: Agencia internacional de investigación sobre el cáncer

ICH: Conferencia internacional de armonización

IGS: Espaciador intergénico

ITS: Espaciador transcrito interno

LFD: Dispositivos de flujo lateral



LOD: Límite de detección

LOQ: Límite de cuantificación

m/z: Relación masa carga

MAPKs: Proteína quinasa activada por mitógeno

MeOH: Metanol

MON: Moniliformina

MRM: Monitoreo de reacción múltiple

MS: Espectrometría de masas

MgCl<sub>2</sub>: Cloruro de magnesio



Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> x 10H<sub>2</sub>O: Tetraborato de sodio decahidratado

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O: Fosfato monobásico hidratado

NaOH: Hidróxido de sodio

NCBI: National Center of Biotechnology Information

nd: No detectado

NeoSol: Neosolaniol

NIV: Nivalenol

OMS: Organización mundial de la salud

OPA: o-ftalaldehído

OTA: Ocratoxina A

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PDA: Agar papa dextrosa

PKS: Policétidos sintasas

PLS: Regresión por mínimos cuadrados parciales

$Q^2$ : Bondad de predicción del modelo

QuEChERS: Quick Easy Cheap Effective Rugged Safe

r: Coeficiente de correlación

$r^2$ : Coeficiente de determinación

$R^2$ : Bondad de ajuste del modelo



S/R: Señal/Ruido

SAX: Intercambio de aniones fuertes

SD: Desviación estándar

SPE: Extracción en fase sólida

SPME: Microextracción en fase sólida

SSU rRNA: Subunidad pequeña del ARN ribosomal

TBE: Tris-borato-EDTA

TCA: Ácido tricloroacético

TCT: Tricotecenos

TCT-A: Tricotecenos de tipo A

TCT-B: Tricotecenos de tipo B

TEF 1- $\alpha$ : Factor de elongación de traducción 1- $\alpha$

$t_R$ : Tiempo de retención

UK: Reino Unido (United Kingdom)

UV: Ultravioleta

ZEA: Zearalenona

ZEB: Zinc finger E-box binding homeobox

$\alpha$ -ZEN:  $\alpha$ -zearalenona

$\beta$ -ZEN:  $\beta$ -zearalenona

$\lambda$ : Longitud de onda



## 9. BIBLIOGRAFÍA

- Aamot, H. U., Ward, T. J., Brodal, G., Vrålstad, T., Larsen, G. B., Klemsdal, S. S., Elameen, A., Uhlig, S., & Hofgaard, I. S. (2015). Genetic and phenotypic diversity within the *Fusarium graminearum* species complex in Norway. *European Journal of Plant Pathology*, 142, 501–519. <https://doi.org/10.1007/s10658-015-0629-4>
- Ahangarkani, F., Rouhi, S., & Gholamour Azizi, I. (2014). A review on incidence and toxicity of fumonisins. *Toxin Reviews*, 33(3), 95–100. <https://doi.org/10.3109/15569543.2013.871563>
- Al-Taher, F., Cappozzo, J., Zweigenbaum, J., Lee, H. J., Jackson, L., & Ryu, D. (2017). Detection and quantitation of mycotoxins in infant cereals in the U.S. market by LC-MS/MS using a stable isotope dilution assay. *Food Control*, 72, 27–35. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.07.027>
- Alexander, N. J., Proctor, R. H., & McCormick, S. P. (2009). Genes, gene clusters, and biosynthesis of trichothecenes and fumonisins in *Fusarium*. *Toxin Reviews*, 28(2–3), 198–215. <https://doi.org/10.1080/15569540903092142>
- AOAC. (2005). Official Methods of Analysis of AOAC International. *Association of Official Analysis Chemists International*.
- Aoki, T., O'Donnell, K., & Geiser, D. M. (2014). Systematics of key phytopathogenic *Fusarium* species: Current status and future challenges. *Journal of General Plant Pathology*, 80(3), 189–201. <https://doi.org/10.1007/s10327-014-0509-3>

- Arata, G. J., Martínez, M., Elguezábal, C., Rojase, D., Cristos, D., Dinolfo, M. I., & Arata, A. F. (2021). Effects of sowing date, nitrogen fertilization, and *Fusarium graminearum* in an Argentinean bread wheat: integrated analysis of disease parameters, mycotoxin contamination, grain quality, and seed deterioration. *Journal of Food Composition and Analysis*, 107(May 2021), 104364. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2021.104364>
- Belizán, M. M. E., Gomez, A. de los A., Terán Baptista, Z. P., Jimenez, C. M., Sánchez Matías, M. del H., Catalán, C. A. N., & Sampietro, D. A. (2019). Influence of water activity and temperature on growth and production of trichothecenes by *Fusarium graminearum* sensu stricto and related species in maize grains. *International Journal of Food Microbiology*, 305(February), 108242. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108242>
- Berthiller, F., Krska, R., Domig, K. J., Kneifel, W., Juge, N., Schuhmacher, R., & Adam, G. (2011). Hydrolytic fate of deoxynivalenol-3-glucoside during digestion. *Toxicology Letters*, 206(3), 264–267. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2011.08.006>
- Biselli, S., & Hummert, C. (2007). Development of a multicomponent method for *Fusarium* toxins using LC-MS/MS and its application during a survey for the content of T-2 toxin and deoxynivalenol in various feed and food samples. *Food Additives and Contaminants*, 22 (8), 750-762. <https://doi.org/10.1080/02652030500158617>

- Bluhm, B. H., Flaherty, J. E., Cousin, M. A., & Woloshuk, C. P. (2002). Multiplex polymerase chain reaction assay for the differential detection of trichothecene- and fumonisin-producing species of *Fusarium* in cornmeal. *Journal of Food Protection*, 65(12), 1955–1961. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-65.12.1955>
- Bordin, K., Rottinghaus, G. E., Landers, B. R., Ledoux, D. R., Kobashigawa, E., Corassin, C. H., & Oliveira, C. A. F. (2015). Evaluation of fumonisin exposure by determination of fumonisin B 1 in human hair and in Brazilian corn products. *Food Control*, 53, 67-71. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.01.011>
- Bresler, G., Vaamonde, G., Degrossi, C., & Fernandez Pinto, V. (1998). Amaranth grain as substrate for aflatoxin and zearalenone production at different water activity levels. *International Journal of Food Microbiology*, 42(1–2), 57–61. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(98\)00063-4](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(98)00063-4)
- Brown, D. W., Butchko, R. A. E., Busman, M., & Proctor, R. H. (2007). The *Fusarium verticillioides* FUM gene cluster encodes a Zn(II)<sub>2</sub>Cys<sub>6</sub> protein that affects FUM gene expression and fumonisin production. *Eukaryotic Cell*, 6(7), 1210–1218. <https://doi.org/10.1128/EC.00400-06>
- Butchko, R. A. E., Plattner, R. D., & Proctor, R. H. (2003). FUM13 encodes a short chain dehydrogenase/reductase required for C-3 carbonyl reduction during fumonisin biosynthesis in *Gibberella moniliformis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(10), 3000–3006. <https://doi.org/10.1021/jf0262007>

- Caro, N., Vega, M., & Ríos, G. (2015). Caracterización de especies de *Fusarium* aisladas de trigo nacional respecto a su capacidad micotoxigénica. [http://repositorio.udec.cl/bitstream/11594/2427/3/Tesis\\_Caracterizacion\\_de\\_Especies\\_de\\_Fusarium.Image.Marked.pdf](http://repositorio.udec.cl/bitstream/11594/2427/3/Tesis_Caracterizacion_de_Especies_de_Fusarium.Image.Marked.pdf)
- Comisión del Codex Alimentarius (2015). *Manual de procedimiento. CAC/GL 63-2007*. <http://www.fao.org/3/a-i4354s.pdf>
- Campone, L., Rizzo, S., Piccinelli, A. L., Celano, R., Pagano, I., Russo, M., Labra, M., & Rastrelli, L. (2020). Determination of mycotoxins in beer by multi heart-cutting two-dimensional liquid chromatography tandem mass spectrometry method. *Food Chemistry*, 318, 126496. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126496>
- Canevascini, S., Caderas, D., Mandel, T., Fleming, A. J., Dupuis, L., & Kuhlemeier, C. (n.d.). Tissue-specific expression and promoter analysis of the tobacco *ltp1* Gene'. In *Plant Physiol* (Vol. 11, Issue 2). <https://academic.oup.com/plphys/article/112/2/513/6070489>
- Castañares, E., Albuquerque, D. R., Dinolfo, M. I., Pinto, V. F., Patriarca, A., & Stenglein, S. A. (2014). Trichothecene genotypes and production profiles of *Fusarium graminearum* isolates obtained from barley cultivated in Argentina. *International Journal of Food Microbiology*, 179, 57–63. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.03.024>

- Cendoya, E., Chiotta, M. L., Zchetti, V., Chulze, S. N., & Ramirez, M. L. (2018). Fumonisin and fumonisin-producing *Fusarium* occurrence in wheat and wheat by products: A review. *Journal of Cereal Science*, 80, 158–166. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2018.02.010>
- Cendoya, E., Farnochi, M. C., & Ramirez, M. L. (2014). Two-dimensional environmental profiles of growth and fumonisin production by *Fusarium proliferatum* on a wheat-based substrate. *International Journal of Food Microbiology*, 183, 9–17. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.04.028>
- Cendoya, E., Pinson-Gadais, L., Farnochi, M. C., Ramirez, M. L., Chéreau, S., Marcheguy, G., Ducos, C., Barreau, C., & Richard-Forget, F. (2017). Abiotic conditions leading to FUM gene expression and fumonisin accumulation by *Fusarium proliferatum* strains grown on a wheat-based substrate. *International Journal of Food Microbiology*, 253(March), 12–19. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.04.017>
- Cerveró, M. C., Castillo, M. Á., Montes, R., & Hernández, E. (2007). Determination of trichothecenes, zearalenone and zearalenols in commercially available corn-based foods in Spain. *Revista Iberoamericana de Micología*, 24(1), 52–55. [https://doi.org/10.1016/S1130-1406\(07\)70013-X](https://doi.org/10.1016/S1130-1406(07)70013-X)

- Chen, D., Cao, X., Tao, Y., Wu, Q., Pan, Y., Peng, D., Liu, Z., Huang, L., Wang, Y., Wang, X., & Yuan, Z. (2013). Development of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry with ultrasound-assisted extraction and auto solid-phase clean-up method for the determination of *Fusarium* toxins in animal derived foods. *Journal of Chromatography A*, 1311, 21–29. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.08.062>
- Choi, J. H., Nah, J. Y., Lee, M. J., Jang, J. young, Lee, T., & Kim, J. (2021). *Fusarium* diversity and mycotoxin occurrence in proso millet in Korea. *Lwt*, 141(October 2020), 110964. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.110964>
- Conference, I., Harmonisation, O. N., Technical, O. F., For, R., Of, R., For, P., & Of, A. (2005). *ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES*: 1994(October 1994).
- Coronel, M. B., Vicente, S., Resnik, S. L., Alzamora, S. M., & Pacin, A. (2016). Fumonisin in maize and gluten meal analysed in Argentinean wet milling industrial plants by ELISA compared with HPLC-FLD method. *Food Control*, 67, 285–291. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.02.052>
- Damiani, T., Righetti, L., Suman, M., Galaverna, G., & Dall'Asta, C. (2019). Analytical issue related to fumonisins: A matter of sample comminution? *Food Control*, 95(July 2018), 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.07.029>

- Demeke, T., Clear, R. M., Patrick, S. K., & Gaba, D. (2005). Species-specific PCR-based assays for the detection of *Fusarium* species and a comparison with the whole seed agar plate method and trichothecene analysis. *International Journal of Food Microbiology*, 103(3), 271–284. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.12.026>
- Desjardins, A E, & Proctor, R. H. (2007). Molecular biology of *Fusarium* mycotoxins. *International Journal of Food Microbiology*, 119(1-2), 47-50. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.024>
- Desjardins, Anne E. (2008). Natural product chemistry meets genetics: When is a genotype a chemotype? *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(17), 7587–7592. <https://doi.org/10.1021/jf801239j>
- Ding, Y., Bojja, R. S., & Du, L. (2004). Fum3p, a 2-Ketoglutarate-Dependent Dioxygenase Required for C-5 Hydroxylation of Fumonisin in *Fusarium verticillioides*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(4), 1931–1934. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.4.1931-1934.2004>
- Doyle, J. J., & Doyle, J. L. (1987). Doyle\_plantDNAextractCTAB\_1987.pdf. In *Phytochemical Bulletin* (Vol. 19, Issue 1, pp. 11–15). [https://webpages.uncc.edu/~jweller2/pages/BINF8350f2011/BINF8350\\_Readings/Doyle\\_plantDNAextractCTAB\\_1987.pdf](https://webpages.uncc.edu/~jweller2/pages/BINF8350f2011/BINF8350_Readings/Doyle_plantDNAextractCTAB_1987.pdf)
- Du, L., Zhu, X, Gerber, R, Huvman, J, Lou, L, Jorgenson, J, Yu, F, Zaleta-Rivera, K, & Wang, Q. (2008). Biosynthesis of sphinganine-analog mycotoxins. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 35, 455–464. <https://doi.org/10.1007/s10295-008-0316-y>

- Dzuman, Z., Zachariasova, M., Lacina, O., Veprikova, Z., Slavikova, P., & Hajslova, J. (2014). A rugged high-throughput analytical approach for the determination and quantification of multiple mycotoxins in complex feed matrices. *Talanta*, 121, 263–272. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.12.064>
- Eke, Z., Kende, A., & Torkos, K. (2004). Simultaneous detection of A and B trichothecenes by gas chromatography with flame ionization or mass selective detection. *Microchemical Journal*, 78(2), 211–216. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2004.06.005>
- Escrivá, L., Font, G., & Manyes, L. (2015). *In vivo* toxicity studies of *Fusarium* mycotoxins in the last decade: A review. *Food and Chemical Toxicology*, 78, 185–206. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.02.005>
- European Commission. (2006). Commission Regulation (EC) No. 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal of the European Union*, L364, 5–24.
- Fanelli, F., Schmidt-Heydt, M., Haidukowski, M., Geisen, R., Logrieco, A., & Mulè, G. (2012). Influence of light on growth, fumonisin biosynthesis and *FUM1* gene expression by *Fusarium proliferatum*. *International Journal of Food Microbiology*, 153(1–2), 148–153. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.10.031>

- Ferreira Geraldo, M. R., Tessmann, D. J., & Kemmelmeier, C. (2006). Production of mycotoxins by *Fusarium graminearum* isolated from small cereals (wheat, triticale and barley) affected with scab disease in southern Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 37(1), 58–63. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822006000100011>
- Foerster, C., Muñoz, K., Delgado-Rivera, L., Rivera, A., Cortés, S., Müller, A., Arriagada, G., Ferreccio, C., & Rios, G. (2020). Occurrence of relevant mycotoxins in food commodities consumed in Chile. *Mycotoxin Research*, 36(1), 63–72. <https://doi.org/10.1007/s12550-019-00369-5>
- Foerster, C., Ríos-Gajardo, G., Gómez, P., Muñoz, K., Cortés, S., Maldonado, C., & Ferreccio, C. (2021). Assessment of mycotoxin exposure in a rural county of Chile by urinary biomarker determination. *Toxins*, 13(7), 439 <https://doi.org/10.3390/toxins13070439>
- Foroud, N A, Canada, A.-F., Macmillan, T., & Badea, A. (2012). Greenhouse studies reveal increased aggressiveness of emergent Canadian *Fusarium graminearum* chemotypes in wheat. *The American Phytopathological Society*, 96, 9. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-11-0863-RE>
- Foroud, Nora A., Baines, D., Gagkaeva, T. Y., Thakor, N., Badea, A., Steiner, B., Bürstmayr, M., & Bürstmayr, H. (2019). Trichothecenes in cereal grains - An update. *Toxins*, 11(11). <https://doi.org/10.3390/toxins111110634>

- Foroud, Nora A., Chatterton, S., Reid, L. M., Turkington, T. K., Tittlemier, S. A., & Gräfenhan, T. (2014). *Fusarium* diseases of Canadian grain crops: Impact and disease management strategies. *Fungal Biology*, 217-316  
[https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1188-2\\_10](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1188-2_10)
- Frizzell, C., Ndossi, D., Verhaegen, S., Dahl, E., Eriksen, G., Sørli, M., Ropstad, E., Muller, M., Elliott, C. T., & Connolly, L. (2011). Endocrine disrupting effects of zearalenone, alpha- and beta-zearalenol at the level of nuclear receptor binding and steroidogenesis. *Toxicology Letters*, 206(2), 210–217.  
<https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2011.07.015>
- Gaffoor, I., & Trail, F. (2006). Characterization of two polyketide synthase genes involved in zearalenone biosynthesis in *Gibberella zeae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(3), 1793–1799.  
<https://doi.org/10.1128/AEM.72.3.1793-1799.2006>
- Garcia, D., Barros, G., Chulze, S., Ramos, A. J., Sanchis, V., & Marín, S. (2012). Impact of cycling temperatures on *Fusarium verticillioides* and *Fusarium graminearum* growth and mycotoxins production in soybean. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(15), 2952–2959.  
<https://doi.org/10.1002/jsfa.5707>
- Garmendia, G., Umpierrez-Failache M., J Ward, T., & Vero S. (2018). Development of a PCR-RFLP method based on TEF 1-  $\alpha$  to differentiate *Fusarium graminearum* from other species within the FGSC. *Food microbiology*, 70, 28-32. <http://10.1016/j.fm.2017.08.020>

- Gazis, R., Rehner, S., & Chaverri, P. (2011). Species delimitation in fungal endophyte diversity studies and its implications in ecological and biogeographic inferences. *Molecular Ecology*, 20(14), 3001–3013. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05110.x>
- Gelderblom, W. C. A., Thiel, P. G., & van der Merwe, K. J. (1988). The chemical and enzymatic interaction of glutathione with the fungal metabolite, fusarin C. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 199(1), 207–214. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(88\)90247-3](https://doi.org/10.1016/0027-5107(88)90247-3)
- Gerber, R., Lou, L., & Du, L. (2009). A PLP-dependent polyketide chain releasing mechanism in the biosynthesis of mycotoxin fumonisins in *Fusarium verticillioides*. *Journal of the American Chemical Society*, 131(9), 3148–3149. <https://doi.org/10.1021/ja8091054>
- Gil-Serna, J., Vázquez, C., & Patiño, B. (2020). Genetic regulation of aflatoxin, ochratoxin A, trichothecene, and fumonisin biosynthesis: A review. *International Microbiology*, 23(1), 89–96. <https://doi.org/10.1007/s10123-019-00084-2>
- Gilbert, J., Clear, R. M., Ward, T. J., Gaba, D., Tekauz, A., Turkington, T. K., Woods, S. M., Nowicki, T., & O'Donnell, K. (2010). Relative aggressiveness and production of 3- Or 15-acetyl deoxynivalenol and deoxynivalenol by *Fusarium graminearum* in spring wheat. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 32(2), 146–152. <https://doi.org/10.1080/07060661003740231>

- Greenhalgh, R., Neish, G. A., & Miller, J. D. (1983). Deoxynivalenol, acetyl deoxynivalenol, and zearalenone formation by Canadian isolates of *Fusarium graminearum* on solid substrates. *Applied and Environmental Microbiology*, 46(3), 625–629. <https://doi.org/10.1128/aem.46.3.625-629.1983>
- Grimm, C., & Geisen, R. (1998). A PCR-ELISA for the detection of potential fumonisin producing *Fusarium* species. *Letters in Applied Microbiology*, 26(6), 456–462. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.1998.00366.x>
- Hall, L., Wohlfiel, S., & Roberts, G. D. (2004). Experience with the MicroSeq D2 Large-Subunit ribosomal DNA Sequencing kit for identification of filamentous fungi encountered in the clinical laboratory. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(2), 622–626. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.2.622-626.2004>
- Hao, J. J., Xie, S. N., Sun, J., Yang, G. Q., Liu, J. Z., Xu, F., Ru, Y. Y., & Song, Y. L. (2017). Analysis of *Fusarium graminearum* species complex from wheat–maize rotation regions in Henan (China). *Plant Disease*, 101(5), 720–725. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-16-0912-RE>
- Hassan, Z. U., Al Thani, R., Balmas, V., Migheli, Q., & Jaoua, S. (2019). Prevalence of *Fusarium* fungi and their toxins in marketed feed. *Food Control*, 104(January), 224–230. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.04.045>
- Hendrickson, O. D., Chertovich, J. O., Zherdev, A. V, Sveshnikov, P. G., & Dzantiev, B. B. (2017). Ultrasensitive magnetic ELISA of zearalenone with pre-concentration and chemiluminescent detection. *Food Control*, 84, 330-338 <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.08.008>

- Huang, D., Cui, L. Q., Sajid, A., Zainab, F., Wu, Q., Wang, X., & Yuan, Z. (2019). The epigenetic mechanisms in *Fusarium* mycotoxins induced toxicities. *Food and Chemical Toxicology*, 123(October 2018), 595–601. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.10.059>
- IARC. (1993). IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans. *American Industrial Hygiene Association Journal* (Vol. 56). <https://doi.org/10.1136/oem.42.3.214>
- Instituto de Salud Pública de Chile. (1998). Manual Métodos de Análisis Físico-Químicos de Alimentos, Aguas y Suelos (Instituto de Salud Pública de Chile). Santiago, Chile: Andros Ltda.
- Instituto de Salud Pública. (2010). Aspectos generales sobre la validación de métodos. 283.
- Jedziniak, P., Panasiuk, Ł., Pietruszka, K., & Posytniak, A. (2019). Multiple mycotoxins analysis in animal feed with LC-MS/MS: Comparison of extract dilution and immunoaffinity clean-up. *Journal of Separation Science*, 42(6), 1240–1247. <https://doi.org/10.1002/jssc.201801113>
- Jerome Jeyakumar, J. M., Zhang, M., & Thiruvengadam, M. (2018). Determination of mycotoxins by HPLC, LC-ESI-MS/MS, and MALDI-TOF MS in *Fusarium* species-infected sugarcane. *Microbial Pathogenesis*, 123(April), 98–110. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.06.045>

- Ji, F., He, D., Olaniran, A. O., Mokoena, M. P., Xu, J., & Shi, J. (2019). Occurrence, toxicity, production and detection of *Fusarium* mycotoxin: a review. *Food Production, Processing and Nutrition*, 1(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s43014-019-0007-2>
- Jorquera-Pereira, D., Pavón-Pérez, J., & Ríos-Gajardo, G. (2021). Identification of type B trichothecenes and zearalenone in Chilean cereals by planar chromatography coupled to mass spectroscopy. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 38(10), 1778-1787. <https://doi.org/10.1080/19440049.2021.1948618>
- Jurado, M., Va, C., Mari, S., Sanchis, V., & Teresa González-Jae, M. (2006). PCR-based strategy to detect contamination with mycotoxigenic *Fusarium* species in maize. *Systematic and Applied Microbiology*, 29, 681–689. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2006.01.014>
- Kalagatur, N. K., Kamasani, J. R., Mudili, V., Krishna, K., Chauhan, O. P., & Sreepathi, M. H. (2018). Effect of high pressure processing on growth and mycotoxin production of *Fusarium graminearum* in maize. *Food Bioscience*, 21(November 2017), 53–59. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2017.11.005>
- Kim, J.-E., Son, H., & Lee, Y.-W. (2018). Biosynthetic mechanism and regulation of zearalenone in *Fusarium graminearum*. *JSM Mycotoxins*, 68(1), 1–6. <https://doi.org/10.2520/myco.68-1-2>

- Kim, Y.-T., Lee, Y.-R., Jin, J., Han, K.-H., Kim, H., Kim, J.-C., Lee, T., Yun, S.-H., & Lee, Y.-W. (2005). Two different polyketide synthase genes are required for synthesis of zearalenone in *Gibberella zeae*. *Molecular Microbiology*, *58*(4), 1102–1113. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04884.x>
- Kimura, M., Tokai, T., Takahashi-Ando, N., Ohsato, S., & Fujimura, M. (2007). Molecular and genetic studies of *Fusarium* trichothecene biosynthesis: Pathways, genes, and evolution. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, *71*(9), 2105–2123. <https://doi.org/10.1271/bbb.70183>
- Klötzel, M., Lauber, U., & Humpf, H.-U. (2006). 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*, *50*(3), 261–269. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200500234>
- Koraichi, F., Videmann, B., Mazallon, M., Benahmed, M., Prouillac, C., & Lecoecur, S. (2012). Zearalenone exposure modulates the expression of ABC transporters and nuclear receptors in pregnant rats and fetal liver. *Toxicology Letters*, *211*(3), 246–256. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2012.04.001>
- Krska, R., Welzig, E., & Boudra, H. (2007). Analysis of *Fusarium* toxins in feed. In *Animal Feed Science and Technology* (Vol. 137, Issues 3–4, pp. 241–264). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2007.06.004>
- L. Eriksson, E. Johansson, N. Kettaneh- Wold, C. W. and S. W. (2000). *Design of Experiments: Principles and Applications* (Vol. 46, Issue 0).

- Lahouar, A., Marin, S., Crespo-Sempere, A., Saïd, S., & Sanchis, V. (2017). Influence of temperature, water activity and incubation time on fungal growth and production of ochratoxin A and zearalenone by toxigenic *Aspergillus tubingensis* and *Fusarium incarnatum* isolates in sorghum seeds. *International Journal of Food Microbiology*, 242, 53–60. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.11.015>
- Li, Y., Wang, Z., Beier, R. C., Shen, J., Smet, D. De, De Saeger, S., & Zhang, S. (2011). T-2 toxin, a trichothecene mycotoxin: Review of toxicity, metabolism, and analytical methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(8), 3441–3453. <https://doi.org/10.1021/jf200767q>
- Liu, Y., Li, W., Ding, Z., Li, Q., Wang, X., Liu, J., Zhuo, S., Shao, R., Ling, Q., Zheng, T., & Li, J. (2019). Three-dimensional ordered macroporous magnetic photonic crystal microspheres for enrichment and detection of mycotoxins (II): The application in liquid chromatography with fluorescence detector for mycotoxins. *Journal of Chromatography A*, 1604, 460475. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.460475>
- Liu, Z., Hua, Q., Wang, J., Liang, Z., Li, J., Wu, J., Shen, X., Lei, H., & Li, X. (2020). A smartphone-based dual detection mode device integrated with two lateral flow immunoassays for multiplex mycotoxins in cereals. *Biosensors and Bioelectronics*, 158, 112178. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112178>

- López-Errasquín, E., Vázquez, C., Jiménez, M., & González-Jaén, M. T. (2007). Real-Time RT-PCR assay to quantify the expression of *fum1* and *fum19* genes from the Fumonisin-producing *Fusarium verticillioides*. *Journal of Microbiological Methods*, 68(2), 312–317. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.09.007>
- Madhu Kamle, Dipendra K. Mahato, Sheetal Devi, Kyung Eun Lee, S. G. K. and P. K. (2019). Fumonisin: Impact on agriculture, food, and human health and their management strategies. *Toxins*, 29(3), 1–8. <http://dx.doi.org/10.1186/s40813-016-0041-2>
- Malachová, A., Stránská, M., Václavíková, M., Elliott, C. T., Black, C., Meneely, J., Hajšlová, J., Ezekiel, C. N., Schuhmacher, R., & Krska, R. (2018). Advanced LC–MS-based methods to study the co-occurrence and metabolization of multiple mycotoxins in cereals and cereal-based food. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 410(3), 801–825. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0750-7>
- Maresca, M. (2013). From the Gut to the Brain: Journey and pathophysiological effects of the food-associated trichothecene mycotoxin deoxynivalenol. *Toxins*, 5, 784–820. <https://doi.org/10.3390/toxins5040784>
- Marín, S., Magan, N., Ramos, A. J., Wollenw, A. B., & Rheeder, F. (2004). Fumonisin-Producing Strains of *Fusarium*: A Review of Their Ecophysiology. *Journal of Food Protection*, 67(8), 1792–1805. <http://10.4315/0362-028x-67.8.1792>

- Marin, S., Ramos, A. J., Cano-Sancho, G., & Sanchis, V. (2013). Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food and Chemical Toxicology*, 60, 218–237. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.07.047>
- Martins, M. L., & Martins, H. M. (2002). 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*, 79(3), 315–318. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00147-4](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00147-4)
- McCormick, S. P., Stanley, A. M., Stover, N. A., & Alexander, N. J. (2011). Trichothecenes: From simple to complex mycotoxins. *Toxins* (Vol. 3, Issue 7, pp. 802–814). <https://doi.org/10.3390/toxins3070802>
- Medina, A., Schmidt-heydt, M., Ca, D. L., Parra, R., Geisen, R., & Magan, N. (2013). Integrating toxin gene expression, growth and fumonisin B 1 and B 2 production by a strain of *Fusarium verticillioides* under different environmental factors. *Journal of the Royal Society Interface*, 10, 85. <http://doi.org/10.1098/rsif.2013.0320>
- Meek, I. B., Peplow, A. W., Ake, C., Phillips, T. D., & Beremand, M. N. (2003). *Tri1* encodes the cytochrome P450 monooxygenase for C-8 hydroxylation during trichothecene biosynthesis in *Fusarium sporotrichioides* and resides upstream of another new *Tri* gene. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(3), 1607–1613. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.3.1607-1613.2003>

- Meneely, J. P., Ricci, F., van Egmond, H. P., & Elliott, C. T. (2011). Current methods of analysis for the determination of trichothecene mycotoxins in food. In *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* (Vol. 30, Issue 2, pp. 192–203). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2010.06.012>
- Merhej, J., Urban, M., Dufresne, M., Hammond-Kosack, K. E., Richard-Forget, F., & Barreau, C. (2012). The velvet gene, *FgVe1*, affects fungal development and positively regulates trichothecene biosynthesis and pathogenicity in *Fusarium graminearum*. *Molecular Plant Pathology*, 13(4), 363–374. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00755.x>
- Micolog, V. (2018). *BMB- ' A ' BMB- ' B ' BMB- ' C ' BMB-BR BMB-CR*. 1–7.
- Milano, G. D., & Lopez, T. A. (1991). Influence of temperature on zearalenone production by regional strains of *Fusarium graminearum* and *Fusarium oxysporum* in culture. *International Journal of Food Microbiology*, 13(4), 329–333. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(91\)90092-4](https://doi.org/10.1016/0168-1605(91)90092-4)
- Ministerio de Salud. (2015). Modificación al Reglamento Sanitario de los Alimentos. <https://www.bcn.cl/leychile/navegar?idNorma=71271>
- Miró, E., Herrero, P., Canela, N., Arola, L., Ras, R., Borrull, F., & Fontanals, N. (2019). Optimised extraction methods for the determination of trichothecenes in rat faeces followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1105, 47–53. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.12.013>

- Mirocha, C. J., Abbas, H. K., Windels, C. E., & Xie, W. (1989). Variation in deoxynivalenol, 15-acetyldeoxynivalenol, 3-acetyldeoxynivalenol, and zearalenone production by *Fusarium graminearum* isolates. *Applied and environmental microbiology*, (Vol. 55, Issue 5).  
<https://journals.asm.org/journal/aem>
- Mirón-Mérida, V. A., Gong, Y. Y., & Goycoolea, F. M. (2021). Aptamer-based detection of fumonisin B1: A critical review. *Analytica Chimica Acta*, 1160.  
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.338395>
- Moretti, A., Susca, A., Mulé, G., Logrieco, A. F., & Proctor, R. H. (2013). Molecular biodiversity of mycotoxigenic fungi that threaten food safety. *International Journal of Food Microbiology*, 167(1), 57–66.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.06.033>
- Muñoz, K., Blaszkewicz, M., Campos, V., Vega, M., Degen, G.H. (2014). Exposure of infants to ochratoxin A with breast milk. *Archives of Toxicology*, 88, 837-846.  
<http://10.1007/s00204-013-1168-4>
- Muñoz, K., Campos, V., Blaszkewicz, M., Vega, M., Alvarez, A., Neira, J., Degen, G. (2010). Exposure of neonates to ochratoxin A: first biomonitoring results in human milk (colostrum) from Chile. *Mycotox Res*, 26, 8.  
<https://doi.org/10.1007/s12550-009-0040-0>
- Muñoz, K., Vega, M., Rios, G., Muñoz, S., & Madariaga, R. (2006). Preliminary study of Ochratoxin A in human plasma in agricultural zones of Chile and its relation to food consumption. *Food and Chemical Toxicology*, 44, 1884-1889.  
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2006.06.008>

- Nagaraj, D., Adkar-Purushothama, C. R., & Marikunte Yanjarappa, S. (2016). Multiplex PCR for the early detection of fumonisin producing *Fusarium verticillioides*. *Food Bioscience*, 13, 84–88. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2016.01.001>
- Nagashima, H., & Nakagawa, H. (2014). Differences in the toxicities of trichothecene mycotoxins, deoxynivalenol and nivalenol, in cultured cells. *Japan Agricultural Research Quarterly*, 48(4), 393–398. <https://doi.org/10.6090/jarq.48.393>
- Nahle, S., Khoury, A. El, & Atoui, A. (2020). Current status on the molecular biology of zearalenone : its biosynthesis and molecular detection of zearalenone producing *Fusarium* species. *European Journal of Plant Pathology*, 159, 247-258. <http://10.1007/s10658-020-02173-9>
- Ndossi, D. G., Frizzell, C., Tremoen, N. H., Faeste, C. K., Verhaegen, S., Dahl, E., Eriksen, G. S., Sørli, M., Connolly, L., & Ropstad, E. (2012). An in vitro investigation of endocrine disrupting effects of trichothecenes deoxynivalenol (DON), T-2 and HT-2 toxins. *Toxicology Letters*, 214, 268–278. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2012.09.005>
- Nicholson, P., Simpson, D. R., Weston, G., Rezanoor, H. N., Lees, A. K., Parry, D. W., & Joyce, D. (1998). Detection and quantification of *Fusarium culmorum* and *Fusarium graminearum* in cereals using PCR assays. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 53(1), 17–37. <https://doi.org/10.1006/pmpp.1998.0170>

- Nicolaisen, M., Justesen, A. F., Thrane, U., Skouboe, P., & Holmstrøm, K. (2005). An oligonucleotide microarray for the identification and differentiation of trichothecene producing and non-producing *Fusarium* species occurring on cereal grain. *Journal of Microbiological Methods*, 62(1), 57–69. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2005.01.009>
- Norred, W. P., Plattner, R. D., Vesonder, R. F., Bacon, C. W., & Voss, K. A. (1992). Effects of selected secondary metabolites of *Fusarium moniliforme* on unscheduled synthesis of DNA by rat primary hepatocytes. *Food and Chemical Toxicology*, 30(3), 233–237. [https://doi.org/10.1016/0278-6915\(92\)90038-M](https://doi.org/10.1016/0278-6915(92)90038-M)
- O'Donnell, K., & Cigelnik, E. (1997). Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 7(1), 103–116. <https://doi.org/10.1006/mpev.1996.0376>
- O'Donnell, K., Cigelnik, E., & Nirenberg, H. I. (1998). Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia*, 90(3), 465–493. <https://doi.org/10.2307/3761407>
- O'Donnell, K., Corby Kistler † §, H., Cigelnik, E., & Ploetz, R. C. (1998). Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: Concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. In *Applied Biological Sciences Communicated by R* (Vol. 95). [www.pnas.org](http://www.pnas.org).

- O'Donnell, K., Gueidan, C., Sink, S., Johnston, P. R., Crous, P. W., Glenn, A., Riley, R., Zitomer, N. C., Colyer, P., Waalwijk, C., Van Der Lee, T., Moretti, A., Kang, S., Kim, H.-S., Geiser, D. M., Juba, J. H., Baayen, R. P., Cromey, M. G., Bithell, S., Sarver, B. A. J. (2009). A two-locus DNA sequence database for typing plant and human pathogens within the *Fusarium oxysporum* species complex. *Fungal Genetics and Biology*, 46, 936–948. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2009.08.006>
- O'Donnell, K., Kistler, H. C., Tacke, B. K., & Casper, H. H. (2000). Gene genealogies reveal global phylogeographic structure and reproductive isolation among lineages of *Fusarium graminearum*, the fungus causing wheat scab. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 97(14), 7905-7910 <http://10.1073/pnas.130193297>
- O'Donnell, K., Nirenberg, H. I., Aoki, T., & Cigelnik, E. (2000). A Multigene phylogeny of the *Gibberella fujikuroi* species complex: Detection of additional phylogenetically distinct species. *Mycoscience*, 41(1), 61–78. <https://doi.org/10.1007/BF02464387>
- O'Donnell, K., Sutton, D. A., Rinaldi, M. G., Sarver, B. A. J., Balajee, S. A., Schroers, H. J., Summerbell, R. C., Robert, V. A. R. G., Crous, P. W., Zhang, N., Aoki, T., Jung, K., Park, J., Lee, Y. H., Kang, S., Park, B., & Geiser, D. M. (2010). Internet-accessible DNA sequence database for identifying fusaria from human and animal infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(10), 3708–3718. <https://doi.org/10.1128/JCM.00989-10>

- O'Donnell, K., Ward, T. J., Robert, V. A. R. G., Crous, P. W., Geiser, D. M., & Kang, S. (2015). DNA sequence-based identification of *Fusarium*: Current status and future directions. *Phytoparasitica*, 43(5), 583–595. <https://doi.org/10.1007/s12600-015-0484-z>
- Paepens, C., De Saeger, S., Van Poucke, C., Dumoulin, F., Van Calenbergh, S., & Van Peteghem, C. (2005). Development of a liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the quantification of fumonisin B1, B2 and B3 in cornflakes. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 19(14), 2021–2029. <https://doi.org/10.1002/rcm.2022>
- Pasquali, M., Beyer, M., Logrieco, A., Audenaert, K., Balmas, V., Basler, R., Boutigny, A. L., Chrpová, J., Czembor, E., Gagkaeva, T., González-Jaén, M. T., Hofgaard, I. S., Köycü, N. D., Hoffmann, L., Levic, J., Marin, P., Miedaner, T., Migheli, Q., Moretti, A., Vogelgsang, S. (2016). A European database of *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* tricothecene genotypes. *Frontiers in Microbiology*, 7(APR). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00406>
- Patiño, B. N., Patiño, P., Mirete, S., Teresa, M., González-Jaé N, G., Mulé, G., Rodríguez, M. T., Rodríguez, R., Vázquez, C., & Vázquez, V. (2004). PCR Detection assay of fumonisin-producing *Fusarium verticillioides* strains. In *Journal of Food Protection* (Vol. 67, Issue 6). [http://meridian.allenpress.com/jfp/article-pdf/67/6/1278/1677305/0362-028x-67\\_6\\_1278.pdf](http://meridian.allenpress.com/jfp/article-pdf/67/6/1278/1677305/0362-028x-67_6_1278.pdf)

- Pel, H. J., de Winde, J. H., Archer, D. B., Dyer, P. S., Hofmann, G., Schaap, P. J., Turner, G., de Vries, R. P., Albang, R., Albermann, K., Andersen, M. R., Bendtsen, J. D., E Benen, J. A., van den Berg, M., Breestraat, S., Caddick, M. X., Contreras, R., Cornell, M., Coutinho, P. M., Stam, H. (2007). Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88. *Nature Biotechnology*, 25(2). <https://doi.org/10.1038/nbt1282>
- Pereira, V. L., Fernandes, J. O., & Cunha, S. C. (2015). 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*, 182, 143–149. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.01.047>
- Pinton, P., & Oswald, I. P. (2014). Effect of deoxynivalenol and other type B trichothecenes on the intestine: A review. *Toxins*, 6, 1615–1643. <https://doi.org/10.3390/toxins6051615>
- Ponte, E. M. Del, Spolti, P., Ward, T. J., Gomes, L. B., Nicolli, C. P., Kuhnem, P. R., Silva, C. N., & Tessmann, D. J. (2015). Population biology regional and field-specific factors affect the composition of Fusarium head blight pathogens in subtropical No-Till Wheat agroecosystem of Brazil. *Population Biology*, 105(2), 245-254. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-04-14-0102-R>
- Proctor, R. H., Plattner, R. D., Desjardins, A. E., Busman, M., & Butchko, R. A. E. (2006). Fumonisin production in the maize pathogen *Fusarium verticillioides*: Genetic basis of naturally occurring chemical variation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(6), 2424–2430. <https://doi.org/10.1021/jf0527706>

- Proctor, R. H., Van Hove, F., Susca, A., Stea, G., Busman, M., van der Lee, T., Waalwijk, C., Moretti, A., & Ward, T. J. (2013). Birth, death and horizontal transfer of the fumonisin biosynthetic gene cluster during the evolutionary diversification of *Fusarium*. *Molecular Microbiology*, *90*(2), 290–306. <https://doi.org/10.1111/mmi.12362>
- Rakeman, J. L., Bui, U., LaFe, K., Chen, Y. C., Honeycutt, R. J., & Cookson, B. T. (2005). Multilocus DNA sequence comparisons rapidly identify pathogenic molds. *Journal of Clinical Microbiology*, *43*(7), 3324–3333. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.7.3324-3333.2005>
- Ramírez Albuquerque, D., Patriarca, A., & Fernández Pinto, V. (2021). Can discrepancies between *Fusarium graminearum* trichothecene genotype and chemotype be explained by the influence of temperature in the relative production of 3-ADON and 15-ADON?, *The American Phytopathological Society*, *125*(2), 153–159. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2019.09.004>
- Ramírez, M. L., Chulze, S., & Magan, N. (2006). 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*, *106*(3), 291–296. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.09.004>
- Reglamento Unión Europea CE 519/2014. (2014). Diario oficial de la Unión Europea. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:32014R0519&from=IT>

- Reynoso, M. M., Ramirez, M. L., Torres, A. M., & Chulze, S. N. (2011). Trichothecene genotypes and chemotypes in *Fusarium graminearum* strains isolated from wheat in Argentina. *International Journal of Food Microbiology*, 145(2–3), 444–448. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.01.020>
- Rosa Seus Arraché, E., Fontes, M. R. V., Garda Buffon, J., & Badiale-Furlong, E. (2018). Trichothecenes in wheat: Methodology, occurrence and human exposure risk. *Journal of Cereal Science*, 82, 129–137. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2018.05.015>
- Ryu, D., Munimbazi, C., Bullerman, L. B. (1999). Fumonisin B1 production by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* as affected by cycling temperatures. 62(12), 1456–1460.
- Ryu, D., & Bullerman, L. B. (1999). Effect of cycling temperatures on the production of deoxynivalenol and zearalenone by *Fusarium graminearum* NRRL 5883. *Journal of Food Protection*, 62(12), 1451–1455. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-62.12.1451>
- S. Catherine Bezuidenhout, Wentzel C. A. Gelderblom, Charles P. Gorst-Allman, R. Marthinus Horak, W. F. O. M., Spiteller, G., & Vleggaar, R. (1988). Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 1730, 743–745. <http://doi.org/10.1039/C39880000743>

- Santini, A., Ferracane, R., Somma, M. C., Aragónb, A., & Ritieni, A. (2009). Multitoxin extraction and detection of trichothecenes in cereals: An improved LC-MS/MS approach. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(7), 1145–1153. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3564>
- Schothorst, R. C., & Jekel, A. A. (2003). Determination of trichothecenes in beer by capillary gas chromatography with flame ionisation detection. *Food Chemistry*, 82(3), 475–479. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00117-1](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00117-1)
- Seeboth, J., Solinhac, R., Oswald, I. P., & Guzylack-Piriou, L. (2012). *The fungal T-2 toxin alters the activation of primary macrophages induced by TLR-agonists resulting in a decrease of the inflammatory response in the pig.* <http://www.veterinaryresearch.org/content/43/1/35>
- Serajazari, M., Hudson, K., Kaviani, M., & Navabi, A. (2019). Genetics and resistance *Fusarium graminearum* chemotype-spring wheat genotype interaction effects in type I and II resistance response assays. *The American Phytopathological Society*, 109, 643-649. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-10-18-0394-R>
- Seus, E., Fontes, M. R. V., Garda Buffon, J., & Badiale-Furlong, E. (2018). Trichothecenes in wheat: Methodology, occurrence and human exposure risk. *Journal of Cereal Science*, 82, 129–137. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2018.05.015>

- Shanakhat, H., Sorrentino, A., Raiola, A., Romano, A., Masi, P., & Cavella, S. (2018). Current methods for mycotoxins analysis and innovative strategies for their reduction in cereals: an overview. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(11), 4003–4013. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8933>
- Smith, L. L., Francis, K. A., Johnson, J. T., & Gaskill, C. L. (2017). Quantitation of fumonisin B1 and B2 in feed using FMOOC pre-column derivatization with HPLC and fluorescence detection. *Food Chemistry*, 234, 174–179. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.142>
- Solfrizzo, M., Gambacorta, L., Bibi, R., Ciriaci, M., Paoloni, A., & Pecorelli, I. (2018). Multimycotoxin analysis by LC-MS/MS in cereal food and feed: Comparison of different approaches for extraction, purification, and calibration. *Journal of AOAC International*, 101(3), 647–657. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.17-0339>
- Soriano, J. M., González, L., & Catalá, A. I. (2005). Mechanism of action of sphingolipids and their metabolites in the toxicity of fumonisin B1. *Progress in Lipid Research*, 44(6), 345–356. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2005.09.001>
- Streit, E., Schatzmayr, G., Tassis, P., Tzika, E., Marin, D., Taranu, I., Tabuc, C., Nicolau, A., Aprodu, I., Puel, O., & Oswald, I. P. (2004). Current situation of mycotoxin contamination and co-occurrence in animal feed-focus on Europe. *Toxins*, 4, 788–809. <https://doi.org/10.3390/toxins4100788>
- Tang, X., Zhang, Q., Zhang, Z., Ding, X., Jiang, J., Zhang, W., & Li, P. (2019). Rapid, on-site and quantitative paper-based immunoassay platform for concurrent determination of pesticide residues and mycotoxins. *Analytica Chimica Acta*, 1078, 142–150. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.06.015>

- Tittlemier, S. A., Cramer, B., Dall'Asta, C., Iha, M. H., Lattanzio, V. M. T., Malone, R. J., Maragos, C., Solfrizzo, M., Stranska-Zachariasova, M., & Stroka, J. (2019). Developments in mycotoxin analysis: An update for 2017-2018. *World Mycotoxin Journal*, *12*(1), 3–29. <https://doi.org/10.3920/WMJ2018.2398>
- Tittlemier, S. A., Varga, E., Scott, P. M., & Krska, R. (2011). Sampling of cereals and cereal-based foods for the determination of ochratoxin A: an overview. *Food Additives and Contaminants*, *28*(6), 775–785. <https://doi.org/10.1080/19440049.2011.559278>
- Tokai, T., Koshino, H., Takahashi-Ando, N., Sato, M., Fujimura, M., & Kimura, M. (2007). *Fusarium Tri4* encodes a key multifunctional cytochrome P450 monooxygenase for four consecutive oxygenation steps in trichothecene biosynthesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *353*(2), 412–417. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.12.033>
- Tupaki-Sreepurna, A., & Kindo, A. J. (2018). *Fusarium*: The versatile pathogen. *Indian Journal of Medical Microbiology*, *36*(1), 8–17. [https://doi.org/10.4103/ijmm.IJMM\\_16\\_24](https://doi.org/10.4103/ijmm.IJMM_16_24)
- Vandicke, J., De Visschere, K., Croubels, S., De Saeger, S., Audenaert, K., & Haesaert, G. (2019). Mycotoxins in flanders' fields: Occurrence and correlations with *Fusarium* species in whole-plant harvested maize. *Microorganisms*, *7*(11), 1–21. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7110571>

- Vargas, D. A., Bassolli, J. V., Maciel, E. V. S., & Lanças, F. M. (2021). Current role of modern chromatography and mass spectrometry in the analysis of mycotoxins in food. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 135, 116156. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.116156>
- Vega M., Muñoz K., Sepúlveda C., Aranda M., Campos V., Villegas R., Villarroel O., (2009). Solid-phase extraction and HPLC determination of ochratoxin A in cereals products on Chilean market. *Food Control*, 20, 3. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.09.014>
- Visentin, I., Tamietti, G., Valentino, D., Portis, E., Karlovsky, P., Moretti, A., & Cardinale, F. (2009). The ITS region as a taxonomic discriminator between *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum*. *Mycological Research*, 113(10), 1137–1145. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2009.07.011>
- Ward, T. J., Clear, R. M., Rooney, A. P., O'Donnell, K., Gaba, D., Patrick, S., Starkey, D. E., Gilbert, J., Geiser, D. M., & Nowicki, T. W. (2008). 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*, 45(4), 473–484. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2007.10.003>
- Wei, J., & Wu, B. (2020). Chemistry and bioactivities of secondary metabolites from the genus *Fusarium*. *Fitoterapia*, 146(May), 104638. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2020.104638>

- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols, December 2015*, 315–322. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-372180-8.50042-1>
- Winter, M., Samuels, P. L., Dong, Y., & Dill-Macky, R. (2019). Trichothecene production is detrimental to early root colonization by *Fusarium culmorum* and *F. graminearum* in *Fusarium* crown and root rot of wheat. *Plant Pathology*, 68(1), 185–195. <https://doi.org/10.1111/ppa.12929>
- Words, E. Y. (2005). Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain [CONTAM] related to fumonisins as undesirable substances in animal feed. *EFSA Journal*, 3(7), 1–32. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2005.235>
- Yörük, E., & Albayrak, G. (2012). Chemotyping of *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* isolates from Turkey by PCR assay. *Mycopathologia*, 173(1), 53–61. <https://doi.org/10.1007/s11046-011-9462-2>
- Zadeike, D., Vaitkeviciene, R., Bartkevics, V., Bogdanova, E., Bartkiene, E., Lele, V., Juodeikiene, G., Cernauskas, D., & Valatkeviciene, Z. (2021). The expedient application of microbial fermentation after whole-wheat milling and fractionation to mitigate mycotoxins in wheat-based products. *LWT*, 137, 110440. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110440>
- Zhang, Y., Jia, Z., Yin, S., Shan, A., Gao, R., Qu, Z., Liu, M., & Nie, S. (2014). Toxic effects of maternal zearalenone exposure on uterine capacity and fetal development in gestation rats. *Reproductive Sciences*, 21, 6. <https://doi.org/10.1177/1933719113512533>

Zuo, H. G., Zhu, J. X., Shi, L., Zhan, C. R., Guo, P., Wang, Y., Zhang, Y., & Liu, J. (2018). Development of a novel immunoaffinity column for the determination of deoxynivalenol and its acetylated derivatives in cereals. *Food Analytical Methods*, 11(8), 2252–2260. <https://doi.org/10.1007/s12161-018-1211-4>

