

**ESPECIES FÚNGICAS MICOTOXIGÉNICAS EN PRODUCTOS CÁRNICOS
EMBUTIDOS SECOS**

Adriana López de Goicoechea

Trabajo de tesis para ser presentado como requisito parcial para optar al título de

INGENIERO TÉCNICO AGRÍCOLA

**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS – UNIVERSIDAD NACIONAL DE MAR DEL
PLATA**

Universidad Pública de Navarra

Balcarce, Argentina

Julio de 2010

**ESPECIES FÚNGICAS MICOTOXIGÉNICAS EN PRODUCTOS CÁRNICOS
EMBUTIDOS SECOS**

Adriana López de Goicoechea

Comité Consejero:

.....
Ing. Agr. CLAUDIA CASTELLARI (M Sc)

Directora de Tesis

.....
Lic. EDUARDO FERNÁNDEZ

Miembro Comité Asesor

**ESPECIES FÚNGICAS MICOTOXIGÉNICAS EN PRODUCTOS CÁRNICOS
EMBUTIDOS SECOS**

Adriana López de Goicoechea

Aprobada por:

.....
Ing. Agr. CLAUDIA CASTELLARI (M Sc)

Directora de Tesis

.....
Lic. EDUARDO FERNÁNDEZ

Miembro Comité Asesor

.....
Dr. ADOLFO CASARO
Representante del Decano

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. Alimentos madurados con hongos.....	3
2.2. Los productos cárnicos embutidos fermentados secos.....	4
2.2.1. Su Origen.....	4
2.2.2. Tecnología de elaboración.....	6
2.2.2.1. Hongos filamentosos y levaduras.....	6
2.2.2.2. Cambios microbiológicos durante la maduración.....	7
2.2.2.2.1. La fermentación.....	7
2.2.2.2.2. La maduración.....	9
2.3. Los hongos en el proceso de maduración de productos cárnicos.....	10
2.3.1. Evolución de la microbiota en productos cárnicos embutidos fermentados.....	12
2.3.2. Producción de metabolitos secundarios.....	14
2.3.2.1. Micotoxinas.....	18
2.3.2.1.1. Toxinas de <i>Penicillium</i> , <i>Aspergillus</i> y <i>Fusarium</i>	22
2.3.2.1.1.1. Ocratoxina A.....	22
2.3.2.1.1.2. Aflatoxinas.....	24
2.3.2.1.1.3. Fumonisinias.....	27
2.3.2.1.1.4. Zearalenona.....	29
2.3.2.1.2. Otras especies productoras de micotoxinas.....	30
2.3.2.1.2.1. Alternaria.....	30
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
3.1. Características de la fábrica.....	32
3.2. Caracterización de la microbiota.....	33

3.2.1. Muestreo y aislamiento.....	33
3.2.2. Conservación de los microorganismos.....	36
3.2.3. Identificación.....	36
3.2.4. Determinación de la frecuencia de aislamiento.....	39
3.3. Determinación de la capacidad toxigénica de cepas de especies aisladas de la superficie de los embutidos.....	40
3.3.1. Preparación de las muestras para la extracción.....	40
3.3.2. Extracción.....	40
3.3.3. Siembra.....	41
3.3.4. Desarrollo cromatográfico.....	42
3.3.5. Revelado.....	44
3.3.6. Detección e identificación de la micotoxina.....	44
4. RESULTADOS Y DISCUSION.....	45
4.1. Descripción morfológica de las especies.....	45
4.1.1. Hongos filamentosos superiores.....	45
4.1.2. Hongos filamentosos inferiores.....	59
4.1.3. Levaduras.....	61
4.2. Composición de la microbiota.....	63
4.2.1. Las especies.....	65
4.2.2. Caracterización de la microbiota por producto.....	68
4.2.3. Especies potencialmente micotoxigénicas.....	71
4.3. Capacidad toxigénica de los aislamientos identificados como productores potenciales de micotoxinas.....	72
4.4. Consideraciones finales.....	74
5. CONCLUSIONES.....	76
6. BIBLIOGRAFÍA.....	78

ÍNDICE DE TABLAS

1. Producción de los principales metabolitos tóxicos en diferentes especies de <i>Aspergillus</i>, <i>Penicillium</i> y <i>Eurotium</i>.....	18
2. Micotoxinas detectadas en embutidos secos y/o jamón crudo luego de una inoculación experimental con hongos micotoxigénicos.....	19
3. Mohos y Micotoxinas considerados actualmente de importancia mundial.....	21
4. Tipo de embutidos cárnicos muestreados. Muestreo de otoño.....	34
5. Tipo de embutidos cárnicos muestreados. Muestreo de invierno.....	35
6. Composición de la microbiota superficial.....	63
7. Frecuencia de aislamiento (%) de las especies fúngicas aisladas de la superficie de productos cárnicos embutidos secos.....	66
8. Frecuencia de aislamiento (%) de las especies fúngicas aisladas de la superficie de productos cárnicos embutidos secos en relación al tipo de producto para la estación otoño.....	68
9. Frecuencia de aislamiento (%) de las especies fúngicas aisladas de la superficie de productos cárnicos embutidos secos en relación al tipo de producto para la estación invierno.....	69
10. Evaluación de presencia/ausencia de micotoxinas en los aislamientos evaluados.....	73

ÍNDICE DE FIGURAS

1. Esquema de siembra en los diferentes medios de cultivo para la identificación de hongos filamentosos.....	39
2. Esquema de la siembra bidimensional en placa TLC.....	42
3. Disposición de la placa en las cubetas I y II.....	43
4. Colonias en CYA y MEA de <i>Penicillium nalgiovense</i> . A: Superficie en MEA; B: Reverso en MEA; C: Superficie en CYA; D: Reverso en CYA.....	49
5. Colonias de <i>Penicillium nalgiovense</i> . E: Superficie en CYA; F: Reverso en CYA....	50
6. Colonias de <i>Penicillium verrucosum</i> . A: Superficie en MEA; B: Reverso en MEA; C: Superficie en CYA; D: Reverso en CYA.....	51
7. Colonias de <i>Aspergillus flavus</i> en MEA. A: Superficie; B: Reverso.....	54
8. <i>Aspergillus niger</i> en DG18. A: Superficie; B: Reverso.....	54
9. <i>Eurotium</i> en medio de cultivo DG18. A: Superficie; B: Reverso.....	57
10. Colonias de <i>Eupenicillium javanicum</i> . A: Superficie en MEA; B: Reverso en MEA; C: Superficie en CYA; D: Reverso en CYA.....	58
11. <i>Rhizopus</i> en DG18. A: Superficie; B: Reverso.....	60

RESUMEN

Hongos filamentosos potencialmente micotoxigénicos pertenecientes a la microbiota espontánea del ambiente colonizan la superficie de productos cárnicos embutidos secos durante su maduración. El objetivo del trabajo fue caracterizar la microbiota que se desarrolla en la superficie de embutidos cárnicos secos elaborados en Balcarce, en las estaciones de otoño e invierno y determinar la capacidad micotoxigénica de las cepas identificadas como potencialmente productoras de micotoxinas. Se realizaron muestreos a partir de distintos productos cárnicos embutidos secos en las dos estaciones citadas. Los aislamientos se identificaron empleando la clave taxonómica de Pitt & Hocking (1997) y se determinó la frecuencia de aislamiento de las especies caracterizadas. Se caracterizaron cinco géneros de hongos filamentosos, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Eupenicillium*, *Eurotium*, *Mucor* y dos de levaduras, *Candida* y *Debaryomyces*. En ambas estaciones climáticas se identificaron dos especies potenciales productoras de micotoxinas: *P. verrucosum* y *A. flavus*, constituyendo la primera de ellas la de mayor frecuencia de aislamiento. Se evaluó la capacidad toxigénica de los aislamientos de *P. verrucosum* detectándose la producción de Ocratoxina A en el 27% y 72% de las cepas aisladas en el otoño y en el invierno respectivamente. Ningún aislamiento de *A. flavus* produjo Aflatoxinas *in vitro*, detectada por la técnica de TLC utilizada.

Palabras claves: embutidos cárnicos secos, microbiota, micotoxinas.

INTRODUCCIÓN

A lo largo de todo el proceso de maduración, los productos cárnicos embutidos secos, son colonizados en su superficie por hongos filamentosos, levaduras y bacterias. La fuente de inóculo de la microbiota colonizante es el ambiente de las fábricas y la misma está influenciada por las condiciones de maduración utilizadas. Si bien existen distintas especies fúngicas, debido a los diferentes climas y procesos de elaboración, en la mayoría de los casos *Penicillium* es el género que predomina en productos con un tiempo de maduración corto y *Aspergillus* y *Eurotium* cuando los productos presentan un periodo de maduración prolongado (Leistner and Ayres, 1968; Spotti *et al.*, 1989; Hernández and Huerta, 1993) o son elaborados en estaciones climática cálidas (Castellari, 2006).

El desarrollo fúngico le confiere al producto un aspecto externo característico. La capa de micelio que se forma en la superficie del mismo regula la pérdida de humedad y lo protege de la luz y del oxígeno, evitando de este modo su rancidez. Asimismo, favorece el desarrollo del aroma y sabor característico a través de la producción de proteasas y lipasas (Lücke, 1987). Sin embargo, existen especies fúngicas que producen micotoxinas sobre el alimento (Leistner, 1984; Laich *et al.*, 1999), constituyendo una característica no deseada desde el punto de vista sanitario, por la existencia del riesgo potencial para la salud del consumidor.

En nuestro país y particularmente en la zona Sudeste de la provincia de Buenos Aires, los embutidos cárnicos secos son elaborados en general, en forma artesanal y durante el proceso de maduración son colonizados superficialmente por la microbiota espontánea del ambiente. Por otro lado, se determinó que entre el 45 y 53% de las especies fúngicas que colonizan la superficie de embutidos cárnicos elaborados en esta zona son productoras de micotoxinas (Castellari *et al.*, 2008; Castellari, 2006). Sin embargo, debido a que no todas las cepas fúngicas pertenecientes a especies productoras de micotoxinas poseen la capacidad de producir estos metabolitos

(Iraizoz, 2008; Abarca *et al.*, 1997; Abarca *et al.*, 1994; Viñas *et al.*, 1993; Frisvad JC and Samson, 1991; Filtenborg *et al.*, 1983; Mislivec *et al.*, 1975) se consideró de interés realizar un estudio de la capacidad toxicogénica de cepas fúngicas potenciales productoras de micotoxinas, aisladas de la superficie de productos cárnicos embutidos secos elaborados en el partido de Balcarce, en las estaciones climáticas de otoño e invierno, de manera de conocer el riesgo potencial del producto como consecuencia de la presencia de cepas productoras de micotoxinas.

Hipótesis y objetivos de la investigación

Hipótesis

Sobre la superficie de los productos cárnicos embutidos secos elaborados en Balcarce, se desarrollan cepas pertenecientes a los géneros *Penicillium* y *Aspergillus* que tienen la capacidad de producir micotoxinas

Objetivos

1. Caracterizar la microbiota micotoxigénica que se desarrolla en la superficie de productos cárnicos embutidos secos durante el proceso de maduración de embutidos cárnicos secos elaborados en las estaciones climáticas de otoño e invierno.
2. Determinar la capacidad toxigénica de las cepas de hongos filamentosos pertenecientes a especies micotoxigénicas, aisladas de la superficie de los embutidos cárnicos secos.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. ALIMENTOS MADURADOS CON HONGOS

Los hongos forman parte de la microbiota de un gran número de productos alimenticios de origen vegetal y animal. En los países de Oriente como China y el Sudeste Asiático se conoce un número elevado de alimentos madurados con hongos constituidos principalmente por soja, arroz y trigo. Los géneros de hongos aislados son *Mucor*, *Rhizopus*, *Neurospora*, *Monascus* y *Aspergillus* (Hesseltine; Wang, 1967, citado por Leistner, 1986). Las primeras especies mencionadas no son productoras de micotoxinas, pero la presencia de *Aspergillus* en algunas preparaciones (salsa de soja, koji) puede constituir un serio riesgo para la salud.

En Occidente, especialmente en los países del Sur de Europa como Italia, España, Francia, Hungría y sur de Alemania, la utilización de hongos en la maduración de alimentos se circunscribe a quesos y productos cárnicos, con una amplia variedad de especialidades que responden a preferencias de consumo. Los hongos aislados pertenecen al género *Penicillium* en el caso de quesos y productos cárnicos madurados por un corto período de tiempo, y *Aspergillus* y *Eurotium* en aquellos madurados por un tiempo mayor. El género *Penicillium* está constituido por aproximadamente 150 especies, la mayoría de las cuales fueron reportadas como potenciales productoras de micotoxinas (Leistner; Eckardt, 1979).

Es importante considerar que los productos cárnicos crudos y curados que a lo largo del proceso de maduración desarrollan en su superficie una cobertura de hongos, son inoculados naturalmente a partir de la microbiota espontánea del ambiente, constituida principalmente por especies del género *Penicillium*. Dentro de estos productos se encuentran los embutidos madurados secos, como por ejemplo el

salamín y el chorizo, y diversas especialidades elaboradas con piezas enteras, como el jamón y la cecina en España, el bundnerfleisch en Suiza, el speck en Austria e Italia, la bresaola en Italia y el biltong en Sudáfrica.

2.2. LOS PRODUCTOS CÁRNICOS EMBUTIDOS FERMENTADOS SECOS

2.2.1. SU ORIGEN

Los embutidos fermentados son definidos como productos cárnicos elaborados con mezclas de carnes y grasas seleccionadas y picadas, a las que se les agrega condimentos, especias y ciertos aditivos autorizados. Las mezclas son embutidas en tripas naturales o artificiales (menos utilizadas) y posteriormente sometidas a procesos de fermentación y maduración. El embutido terminado debería ser microbiológicamente estable a temperatura ambiente.

La fermentación se desarrolló como un sistema para fomentar la producción de carnes desecadas, constituyendo el secado la primera forma de deshidratación. El proceso de fermentación se cree que se originó en China, hace unos 2000 años. El uso de la sal y el nitrato llegaron en el siglo XIII, derivando el término “salami” del latín sale, sal.

En Europa, la elaboración de embutidos fermentados secos comenzó en el Mediterráneo, difundiéndose posteriormente al norte y al oeste. Las tecnologías de producción se introdujeron en Hungría en 1851 y se extendieron a Estados Unidos con los inmigrantes de Europa Central.

En los países de Europa, la manufactura de embutidos fermentados constituía una industria a pequeña escala que utilizaba métodos tradicionales de trabajo intensivo. En Estados Unidos, sin embargo, el desarrollo de una industria cárnica a gran escala, determinó un alto nivel de automatización en los primeros años del siglo XX.

El conocimiento de los principios de la fermentación de la carne se desarrolló lentamente y no fue hasta la década del cuarenta cuando se comenzaron a establecer las bases científicas del proceso de fermentación, a partir del desarrollo de los cultivos iniciadores. Hoy existe un considerable componente artesanal y en numerosos países, como la Argentina, la fermentación sigue constituyendo un proceso espontáneo y en general carente de infraestructura, para controlar las condiciones ambientales que lo gobiernan.

En el mundo existen tantas clases de embutidos fermentados como regiones geográficas. En Alemania se elaboran más de 350 tipos diferentes de embutidos. Éstos se clasifican de acuerdo con varios criterios que incluyen composición, calibre, grado de la mezcla, especias, condimentos, ahumado, duración del período de maduración y a_w final. Venegas Fornias y Valladares Díaz (1999) propusieron una clasificación de productos cárnicos basado en que los mismos sean o no sometidos a un proceso térmico.

El proceso de elaboración incluye una combinación de fermentaciones y deshidrataciones. En los países del Mediterráneo y los Balcanes los embutidos son elaborados con especias y secados al aire, mientras que en el Centro y Norte de Europa los embutidos son ahumados, involucrando un proceso de curado menos intenso. En Estados Unidos los productos son fermentados a altas temperaturas acompañados por un corto período de secado (Varnam; Sutherland, 1998).

2.2.2. TECNOLOGÍA DE ELABORACIÓN

En la manufactura de los embutidos fermentados secos se consideran tres etapas: formulación, fermentación y maduración. La elaboración de estos productos comparten una tecnología básica, constituida por el picado y mezcla de la carne y grasa, el agregado de sal y agentes de curado, el embutido, la inoculación con hongos filamentosos y levaduras, la fermentación y la maduración. En la etapa de la formulación, los ingredientes son acondicionados en el interior de la tripa y colocados en cámaras o salas de fermentación. Durante la fermentación dos reacciones microbiológicas proceden simultáneamente, y son la formación de óxido nítrico por la reducción de nitritos y nitratos, y el descenso del pH por las bacterias del ácido láctico (BAL). En la fase de maduración o secado se desarrollan el flavor, olor y textura a partir de numerosas reacciones bioquímicas y químicas (Ordóñez *et al.*, 1999).

2.2.2.1. Hongos filamentosos y levaduras

Durante el proceso de maduración el crecimiento de hongos y levaduras sobre la tripa juega un rol importante en el desarrollo de las características organolépticas del producto, protegiéndolo de la luz y el oxígeno, y además inhiben el desarrollo de bacterias no deseables. Tradicionalmente los microorganismos que colonizan los embutidos provienen del ambiente de las fábricas. Sin embargo, la inoculación de los productos con una cepa seleccionada es una práctica cada vez más utilizada en la actualidad. Ésta se lleva a cabo directamente después del embutido, aunque en algunos casos puede retrasarse hasta después del comienzo del secado.

Los cultivos de hongos comerciales están constituidos por especies del género *Penicillium*. Si bien *Penicillium nalgiovense* es la especie más utilizada, se dispone de

cultivos de *P. chrysogenum* y *P. expansum*. En lo que respecta a las levaduras, los cultivos empleados están constituidos por cepas de *D. hansenii*.

2.2.2.2. Cambios microbiológicos durante el proceso de maduración

2.2.2.2.1. La fermentación

Es la etapa en la que se produce el crecimiento activo y el metabolismo de las BAL (naturales de la carne o inoculadas en la mezcla), acompañado por un rápido descenso del pH. En el caso específico de los embutidos secos, la fermentación se produce simultáneamente en las primeras fases del secado y la actividad de las enzimas microbianas persiste incluso cuando las condiciones no son adecuadas para el crecimiento de los microorganismos.

Como en el caso de otros alimentos fermentados, las BAL de los géneros *Lactobacillus* y *Pediococcus* juegan un papel fundamental al producir ácido láctico a partir de los azúcares (glucosa) y disminuir el pH, contribuyendo a la inhibición de microorganismos indeseables y al secado de producto.

El desarrollo de bacterias de los géneros *Micrococcus* y *Staphylococcus* coagulasa negativa, es importante en algunos embutidos por su intervención en la reducción de nitrato a nitrito. De esta forma, estos géneros contribuyen a la estabilidad del color rojo (Hammes *et al.*, 1995), previenen la rancidez y además el nitrito es el principal constituyente del sistema inhibitor de los embutidos fermentados secos. La actividad de estos grupos microbianos, reduce el tiempo de maduración y favorece la formación de numerosos compuestos aromáticos a través de los procesos de proteólisis y lipólisis. Micrococos y estafilococos son considerados además responsables del incremento del pH (Selgas *et al.*, 1986). Fontana *et al.* (2005) realizaron un estudio de la dinámica de las poblaciones bacterianas durante la fermentación natural de embutidos secos de la Argentina y demostraron que las fermentaciones naturales se

deben únicamente a la presencia de BAL en la carne cruda, aunque los recuentos iniciales son bajos. En lo que respecta a las BAL, las especies de *Lactobacillus* son las que predominan durante la fermentación natural. Con el empleo de técnicas moleculares se identificaron las especies *Lactobacillus sakei* y *L. plantarum* como las de mayor presencia en estos productos.

Además de las ventajas derivadas de la acción de los microorganismos, la utilización de cultivos iniciadores permite obtener productos homogéneos, mejorar las propiedades sensoriales, agilizar la producción al no tener que esperar el desarrollo de la biota espontánea presente en la carne y reducir el número de piezas defectuosas. La mayoría de los cultivos iniciadores que se utilizan en la elaboración de embutidos están constituidos por BAL y micrococáceas.

Las especies de BAL empleadas en la elaboración de productos cárnicos deben ser homofermentativas, es decir producir únicamente ácido láctico, ya que la producción de gas (CO₂) y otros productos de la fermentación como ácido acético, pueden ocasionar la aparición de aromas no deseados y otros defectos.

El uso de BAL como cultivos protectores está indicado especialmente en la elaboración de embutidos de corta maduración o en aquellos madurados con hongos. Las especies de bacterias lácticas más comúnmente utilizadas como cultivos iniciadores son *L. curvatus*, *L. plantarum*, *Pediococcus acidilactici*, y *P. damnosus*.

Las cepas de *Micrococcus* y *Staphylococcus* utilizadas como cultivos iniciadores producen cantidades limitadas de ácido por lo que son incorporadas con el objeto de reducir nitratos a nitritos. Las especies más utilizadas son *Micrococcus varians*, *Staphylococcus carnosus* y *S. xylosus* (Varnam; Sutherland, 1998).

En las prácticas modernas, los embutidos secos se fermentan en cámaras con temperatura y humedad controlada. Las temperaturas de fermentación varían según el tipo de embutido. En general se utilizan temperaturas altas cuando se requiere un descenso rápido del pH. Para el caso de los embutidos secos se emplean

temperaturas de entre 15 y 27°C, durante 24-72 h. En la fermentación del salame húngaro, se utilizan temperaturas menores de 10°C, mientras que un embutido semiseco de bajo pH se fermenta a temperaturas de hasta 40°C (Varnam; Sutherland, 1998).

El control de la humedad relativa es importante durante la fermentación, tanto para iniciar el secado como para evitar un desarrollo excesivo de hongos y levaduras. Asimismo es necesario evitar la formación de bordes secos. En general, en las fermentaciones cortas a altas temperaturas la humedad relativa es del 98%, mientras que cuando se emplean temperaturas más bajas, la humedad relativa es menor (90%).

2.2.2.2.2 La maduración

El periodo de maduración o curado (como se lo denomina en España) varía considerablemente y es un factor determinante de las propiedades físico-químicas y organolépticas del embutido, así como de su estabilidad en el almacenamiento. En algunos casos, la maduración ocurre de manera rápida mientras que en otros, continúa hasta el consumo. En todos los casos es necesario controlar el secado de forma que la velocidad de pérdida de agua desde la superficie sea igual a la velocidad a la que la misma migra desde el interior del embutido.

La maduración de los embutidos está determinada parcialmente por el diámetro o calibre del producto, y en general se realiza a temperaturas menores que la fermentación, cuyos valores se encuentran entre 12 y 15°C, hacia el final de la etapa. La humedad relativa también se reduce progresivamente y por lo general se mantiene un 10% por debajo de la del interior del embutido.

En algunos tipos de embutidos secos, se aplica el ahumado durante el secado. Esta práctica se realiza para proporcionar a los productos cambios importantes en las propiedades organolépticas, y en algunos casos, para inhibir el crecimiento de hongos

filamentosos a través del secado de la superficie y por la deposición de fenoles antimicrobianos, carbonilos y ácidos orgánicos de bajo peso molecular (Daun, 1979).

Como se indicó, la maduración afecta las propiedades organolépticas del embutido, impartiendo un aroma y sabor característico especialmente en aquellos productos madurados con hongos filamentosos. Las principales reacciones son proteolíticas y lipolíticas.

En algunos países los embutidos fermentados suelen secarse colocándolos al sol o a bajas temperaturas en el interior de cuevas. En países industrializados, los productos se trasladan a través de una serie de cámaras mantenidas a temperatura y humedad relativa constante. En otros casos, los embutidos suelen permanecer en una única cámara en la que la temperatura y la humedad cambian en cada etapa de secado.

2.3. LOS HONGOS EN EL PROCESO DE MADURACION DE PRODUCTOS CARNICOS

En la mayoría de los países de influencia romana, los embutidos fermentados producen un desarrollo de hongos muy importante en su superficie. En cambio, en países como Hungría y Rumania (de influencia germana) los productos generalmente son ahumados, constituyendo el humo un componente del sabor y aroma, actuando además como un agente antioxidante y bactericida. El efecto combinado del humo, secado y la producción de compuestos químicos (formaldehídos, ácido acético, etc.) previene el crecimiento de bacterias e inhibe la formación de esporas de hongos (Daun, 1979).

En Argentina, la elaboración de productos cárnicos embutidos fermentados, se caracteriza por utilizar recetas tradicionales introducidas por los inmigrantes europeos,

que incluyen la maduración con hongos a partir de la microbiota espontánea del ambiente (Ludemann *et al.*, 2004b), el empleo de cultivos iniciadores con cepas fúngicas seleccionadas y también el ahumado. Los productos se denominan según el lugar de elaboración con el nombre de especialidades. En el caso de aquellos que desarrollan una densa cobertura de hongos durante su maduración son cepillados o lavados y previo a su comercialización son espolvoreados con fécula logrando un aspecto superficial blanco y homogéneo.

El desarrollo fúngico le confiere al producto un aspecto externo característico. La capa o lámina de micelio que se forma en la superficie del producto regula la pérdida de humedad y lo protege de la luz y del oxígeno, evitando de este modo su ranciedad. El microclima creado en superficie impide la formación de un borde seco y untuoso, y favorece el desarrollo del aroma y sabor característico a través de la producción de proteasas y lipasas (Lücke, 1987).

Grazia *et al.* (Grazia *et al.*, 1986) describieron un papel importante de los hongos en el proceso de maduración a través del descenso de la concentración de ácido láctico, con el consecuente aumento del pH. Este hecho aparentemente explicaría el sabor más agradable de los productos madurados con hongos, comparado con el de los producidos exclusivamente por fermentación ácida. Lücke (Lücke, 1987) observó un marcado aumento del pH durante la maduración de los productos en cuya superficie se desarrollaron hongos y levaduras.

En Francia, se considera la presencia de levaduras como un efecto beneficioso para los productos del tipo salami y existen en el mercado cultivos mixtos de *P. nalgiovense* y *D. hansenii* para su aplicación artificial. La levadura crece más rápido que el hongo filamentoso y ambos forman una capa uniforme, mejorando el aroma y el aspecto externo del producto .

La influencia de los hongos sobre el aroma de los embutidos es debida a su efecto antioxidante y a su habilidad para producir enzimas para la degradación de lípidos y proteínas (Geisen *et al.*, 1991). Los estudios en esta área son escasos, si se compara con los obtenidos para otros productos como los quesos.

Por otro lado, numerosos autores describieron un importante número de compuestos volátiles producidos en productos embutidos fermentados con hongos (Mateo; Zumalacárregui, 1996), pero pocos indicaron la influencia del crecimiento de los hongos sobre la composición de los mismos.

Estudios más detallados que relacionaron la actividad proteolítica y lipolítica de distintas cepas fúngicas y su efecto sobre características organolépticas de los productos fueron realizados por distintos grupos de investigadores.

En Argentina, Ludemann *et al.* (2004a) estudiaron la capacidad proteolítica y lipolítica de distintas especies de *Penicillium*, aisladas de la superficie de embutidos secos en la provincia de Buenos Aires. Todas las cepas evaluadas mostraron actividad enzimática. Sin embargo se observaron diferencias inter e intraespecíficas. Estos autores indicaron además que la adición de NaCl, compuesto tradicionalmente incorporado en las mezclas, produjo un efecto estimulante de ambas actividades (proteolítica y lipolítica).

2.3.1. EVOLUCIÓN DE LA MICROBIOTA EN PRODUCTOS CÁRNICOS EMBUTIDOS FERMENTADOS

Como fue mencionado, la colonización de la superficie de los embutidos se produce a partir de la biota espontánea que se encuentra en el ambiente. Si bien las especies identificadas en los distintos productos son diferentes, debido a la diversidad de condiciones climáticas y procesos de elaboración, el género *Penicillium* es el que predomina en los productos embutidos madurados por un corto período de tiempo y en las primeras etapas de maduración en aquellos productos madurados por tiempo

mayor, ya que en etapas posteriores del proceso se aislaron además, especies de los géneros *Aspergillus* y *Eurotium*. Estos últimos se caracterizan por su habilidad para desarrollarse en sustratos con reducida actividad de agua y en presencia de altas concentraciones de sales y azúcares (Pitt; Hocking, 1997).

Motilva Casado *et al.* (1991) estudiaron la evolución de la micobiota superficial de jamones españoles y encontraron que los hongos estuvieron presentes en muy bajo número al comienzo de la etapa de maduración, mientras que las levaduras fueron recuperadas con una frecuencia alta. Rodríguez *et al.* (1994) indicaron que las condiciones del procesado en etapas iniciales, favorecen el desarrollo de una población microbiana constituida por micrococáceas especialmente *Staphylococcus*, y levaduras del género *Debaryomyces*.

En las fábricas de elaboración de embutidos fermentados a pequeña escala en el norte de Italia (Andersen, 1995) se encontró que el género *Penicillium* constituyó más del 95% de la micobiota hacia el final del proceso de maduración y *P. nalgiovense* fue la especie predominante. En cambio, en fábricas de elaboración industrial de embutidos cárnicos fermentados, ubicadas en la misma zona, el género *Aspergillus* fue dominante en la micobiota colonizante (Grazia *et al.*, 1986).

En Hungría, donde se realiza el ahumado de los productos cárnicos tipo salami, Jirkovski y Galgóczy (1966) (citado por Andersen, 1995) encontraron que *Scopulariopsis brevicaulis* var. *alba* se aisló en el 80 % de las piezas. En Argentina, Pose *et al.* (2004) identificaron 21 especies de hongos filamentosos, aislados de la superficie de productos cárnicos embutidos secos, de las cuales 17 correspondieron al género *Penicillium*. Por otro lado, Ludemann *et al.* (2004b) determinaron que el 93% de las especies identificadas sobre salamines correspondieron al subgénero *Penicillium*. Estas determinaciones confirmaron la dominancia del género *Penicillium* sobre la superficie de este tipo de productos.

Las especies fúngicas colonizan la superficie de los productos en las distintas etapas de elaboración y el desarrollo fúngico ocurre solamente en condiciones favorables. Las condiciones de adaptabilidad varían para cada especie en particular y si bien no se conocen con exactitud aquellas que permiten la dominancia de una u otra en cada momento del proceso de maduración, existe una alta correlación entre las características de las especies, las propiedades intrínsecas del producto y las condiciones de maduración.

El tiempo de curado de los productos cárnicos en las diferentes cámaras de maduración está correlacionado con el nivel de humedad y la actividad de agua del producto, lo que influye de forma directa en la composición de la microbiota colonizante.

En general, la bibliografía consultada indica que al comienzo de la etapa de fermentación de los embutidos las levaduras dominan la biota fúngica y progresivamente a partir de las 2 semanas los hongos filamentosos de la biota espontánea colonizan la superficie de los productos aumentando su número y superando a las levaduras. Esta es una consideración a tener en cuenta ya que la microbiota natural puede influir en las condiciones higiénico sanitarias de los productos y en la estandarización de los mismos.

2.3.2. PRODUCCION DE METABOLITOS SECUNDARIOS

2.3.2.1. Micotoxinas

La presencia de una microbiota espontánea sobre la superficie de los productos embutidos fermentados, constituida principalmente por especies del género *Penicillium*, presenta un alto riesgo de producción de micotoxinas.

Las micotoxinas son metabolitos secundarios que al ser ingeridos, inhalados o absorbidos a través de la piel producen una disminución de la capacidad funcional del organismo y aún la muerte de seres humanos y animales, incluyendo las aves (Pitt, 1996).

Las enfermedades causadas por las micotoxinas se conocen desde hace tiempo. La primera micotoxicosis reconocida fue probablemente el ergotismo, producida por el consumo de granos de cereales contaminados con esclerosios de *Claviceps purpurea*. Los síntomas se caracterizaron por necrosis y gangrena, y se conoció en Europa durante la Edad Media con el nombre de “fuego sacro”.

Otra micotoxina de la cual se tiene conocimiento por haber afectado a poblaciones humanas, es el tricoteceno, fue la causante de la aleucia tóxica alimentaria (ATA). La enfermedad era producida por la ingestión de granos de cereales enmohecidos. Esto provocó la muerte de miles de personas durante la Segunda Guerra Mundial. Los síntomas se caracterizaron por lesiones en la cavidad oral, esófago y estómago, diátesis hemorrágica y agotamiento de la médula espinal. Los hongos causantes de esta enfermedad pertenecían a los géneros *Fusarium* y *Cladosporium*.

En Japón, la toxicidad asociada al arroz mohoso de color amarillo, constituyó un problema después de la Segunda Guerra Mundial. La ingestión de este arroz provocaba vómitos, convulsiones y parálisis ascendente e incluso la muerte en el plazo de 1 a 3 días después de la aparición de los primeros síntomas. Los hongos involucrados pertenecieron al género *Penicillium*.

Fue a partir de 1960, que se tomó especial cuidado en el estudio de intoxicaciones causadas por micotoxinas. El factor desencadenante fue la epidemia de la enfermedad X de los pavos, ocurrida en Gran Bretaña. En unos pocos meses murieron más de 100.000 pavos. Las investigaciones realizadas con el objeto de conocer el origen del problema

fueron favorables ya que se encontró la presencia de un agente tóxico en la harina de maní utilizada como fuente de proteínas. Las toxinas eran producidas por *A. flavus* y *A. parasiticus*.

Se identificaron más de 400 micotoxinas (Filtenborg, Frisvad and Thrane, 1996). Entre ellas se destacan las aflatoxinas, las ocratoxinas, la esterigmatocistina, la patulina, la citrinina y el ácido penicilínico. Varias micotoxinas poseen actividad como agente antimicrobiano (Miller, 1991).

El número de especies toxigénicas reportadas es muy extenso. Sin embargo, la producción de micotoxinas carece de especificidad de especies (Tabla 1). La aflatoxina es producida por *A. flavus*, *A. parasiticus* y *A. nomius*. La ocratoxina A es producida por especies de diferentes géneros como *Petromyces alliaceus*, *A. ochraceus* y *P. verrucosum* (Frisvad; Thrane, 1995). Por otro lado una especie puede ser capaz de producir un número considerable de micotoxinas, como por ejemplo *P. griseofulvum* que produce patulina, griseofulvina, ácido ciclopiazónico y roquefortina C (Frisvad; Filtenborg, 1990). La citrinina es producida por al menos 22 especies diferentes de hongos filamentosos (Leistner; Pitt, 1977).

La ocratoxina A, producida por *A. ochraceus* y *P. verrucosum* (Pitt; Hocking, 1997) es nefrotóxica y fue asociada a la muerte de humanos, conocida como la enfermedad de los Balcanes. El potencial carcinogénico, teratogénico e inmunosupresor de la ocratoxina A fue comprobada y es considerada como altamente peligrosa en numerosas partes del mundo (Krogh, 1978; Pitt; Hocking, 1997).

Varias cepas de *Rhizopus* y *Mucor* fueron reportadas como productoras de compuestos tóxicos (Rabie *et al.*, 1985), pero en la mayoría de los casos los compuestos fueron tóxicos para no vertebrados.

La formación de micotoxinas en los alimentos está influenciada por la composición del sustrato, temperatura, actividad de agua y pH (Leistner, 1986). Por ello no se puede concluir que la presencia del hongo sobre los productos implica que la micotoxina sea

producida. Las micotoxinas no son proteínas, poseen bajo peso molecular, son químicamente estables y en la mayoría de los casos, resistentes a los tratamientos térmicos que se aplican a los alimentos (Mossel; Moreno García, 1985). En consecuencia, el peligro potencial de las micotoxinas en los alimentos reside en la incapacidad para ser detectadas biológicamente (ICMSF, 1996). Además, la remoción del micelio y esporas de la superficie de los productos no nos asegura un alimento seguro desde el punto de vista toxicológico, ya que las micotoxinas pueden difundir hasta el interior del alimento.

Las micotoxinas tienen dos clases de toxicidad: aguda y crónica, Tabla 2). La toxicidad aguda está relacionada con la disminución de las funciones hepática y renal. Pueden causar también lesiones permanentes en cerebros de animales (neurotóxica).

El efecto crónico más destacado de las micotoxinas es la inducción de cáncer especialmente en hígado y la supresión inmune (Pestka; Bondy, 1994). Debido a que las dosis que producen enfermedades crónicas son muy bajas, los efectos perjudiciales a largo plazo, tales como la inducción de tumores es posible que se manifiesten cuando la enfermedad está avanzada.

El número de especies de hongos utilizados en Europa para la maduración de alimentos es pequeño y se circunscriben al género *Penicillium*. Este género comprende 150 especies de las cuales la mayoría son toxigénicas, incluso las utilizadas como cultivos iniciadores. Las cepas más utilizadas son: *P. nalgiovense*, *P. roquefortii*, *P. camemberti* y *P. chrysogenum*.

Numerosas investigaciones se llevaron a cabo con el objeto de detectar la presencia de micotoxinas en alimentos. Leistner y Eckardt (1979) estudiaron 150 cepas de *Penicillium* aisladas de alimentos, mediante métodos químicos y biológicos con el objeto de detectar micotoxinas. Como resultados encontraron que el 75 % de los aislamientos eran toxigénicos. López-Díaz *et al.* (1996) evaluaron dos variedades

de quesos españoles y encontraron en los quesos azules que siete de nueve aislamientos de *P. roqueforti* produjeron roquefortina y uno ácido micofenólico.

En lo que respecta a productos cárnicos es importante considerar que una serie de micotoxinas pueden formarse in vitro y también en el sustrato carne (Leistner, 1984) (Tabla 2).

Tabla 1. Producción de los principales metabolitos tóxicos en diferentes especies de *Aspergillus*, *Penicillium* y *Eurotium* (Mossel and Moreno García 1985; Frisvad and Thrane 1995; Moss 1996; Fischer et al. 2000).

Especies	Micotoxina
<i>P. aurantiogriseum</i>	ácido penicílico, verrucosidina, glicopéptidos nefrotóxicos,
<i>P. aurantiovirens</i>	ácido penicílico
<i>P. brasilianum</i>	ácido penicílico, verruculógeno, fumitremorgeno A y B,
<i>P. brevicompactum</i>	botriodiploidina, ácido micofenólico
<i>P. camemberti</i>	ácido ciclopiazónico
<i>P. chrysogenum</i>	roquefortina C
<i>P. citrinum</i>	Citrinina
<i>P. commune</i>	ácido ciclopiazónico, rugulovasina A y B, fumigaclavina A y B
<i>P. crustosum</i>	roquefortina C, tremortina (penitrem A)
<i>P. cyclopium</i>	ácido penicílico, xantomegnina, viomellina
<i>P. echinulatum</i>	Territrems
<i>P. expansum</i>	roquefortina C, patulina, citrinina,
<i>P. freii</i>	xantomegnina, viomellina, vioxantina, ácido penicílico
<i>P. glabrum</i>	Citromicetina
<i>P. griseofulvum</i>	roquefortina C, ácido ciclopiazónico, patulina, griseofulvina
<i>P. hirsutum</i>	roquefortina C
<i>P. hordei</i>	roquefortina C
<i>P. melanoconidium</i>	ácido penicílico, tremortina, roquefortina C, verrucosidina
<i>P. polonicum</i>	ácido penicílico, verrucosidina, glicopéptidos nefrotóxicos
<i>P. purpurogenum</i>	rubratoxina B
<i>P. roqueforti</i>	roquefortina C, isofumigaclavina A y B, tóxina PR
<i>P. verrucosum</i>	ocratoxina A, citrinina, verrucosidina A y B
<i>P. viridicatum</i>	xantomegnina, viomellina, vioxantina, ácido penicílico
<i>A. ochraceus</i>	ácido penicílico, ocratoxina A, xantomegnina

<i>A. flavus</i>	ácido 3-nitropropiónico, ciclopiazónico, aflatoxina B ₁ , ácido
<i>A. oryzae</i>	ácido ciclopiazónico , ácido 3-nitropropiónico
<i>A. parasiticus</i>	aflatoxina B ₁ , B ₂ , G ₁ y G ₂
<i>A. versicolor</i>	Esterigmatocistina, nidulotoxina
<i>A. terreus</i>	patulina, citrinina, citreoviridina

Tabla 2. Micotoxinas detectadas en embutidos secos y/o jamón crudo luego de una inoculación experimental con hongos micotoxigénicos (Leistner; Eckardt, 1981; Leistner, 1984).

Hongo	Producción de micotoxina en agar extracto de malta	Clase de toxicidad	Formación en embutido seco/jamón
<i>A. flavus</i>	Aflatoxina	Carcinogénica	SI
<i>Aspergillus</i> sp.	Brevianamida A		SI
<i>P. terrus</i>	Citreoviridina		SI
<i>P. citrinum</i>	Citrinina	Nefrotóxica	SI
<i>P. griseofulvum</i>	Acido	Carcinogénica	SI
<i>P. camembertii</i> II	cyclopiazónico		
<i>P. brasilianum</i>	Fumitremorgen B		SI
<i>P. griseofulvum</i>	Griseofulvina	Carcinogénica	SI
<i>P. brevicompactum</i>	Acido micofenólico		NO
<i>A. flavus</i>	Ochratoxina A	Carcinogénica	SI
<i>P. verrucosum</i>		Nefrotóxica	
<i>P. expansum</i>			NO
<i>P. roquefortii</i>	Patulina	Tóxica general	
<i>P. griseofulvum</i>			
<i>P. roquefortii</i>	Acido penicílico	Tóxica general	NO
<i>P. viridicatum</i>	Penitrem A	Neurotóxica	NO
<i>P. roquefortii</i>	Toxina PR		NO
<i>A. versicolor</i>	Sterigmatocistina		SI

<i>P. verrucosum</i>	Verrucologen TR ₁	Neurotóxica	SI
<i>P. commune</i>	Ácido ciclopiazónico, rugulovasina A y B		SI

De acuerdo con lo reportado por Leistner (1984) las micotoxinas fueron detectadas en los primeros 5 mm debajo de la superficie de los embutidos cárnicos. A partir de los datos obtenidos por este investigador, se desarrollaron diversos estudios para determinar la presencia de micotoxinas en este tipo de productos.

Núñez *et al.* (1996) determinaron que la toxicidad potencial de los jamones ibéricos se incrementó con el avance de la maduración. Por otro lado, López-Díaz *et al.* (2001a) analizaron la toxicidad de especies de *Penicillium* aisladas de la superficie de embutidos cárnicos fermentados. Encontraron que 9 de 13 aislamientos de *P. olsonii* produjeron ácido ciclopiazónico, ácido micofenólico, roquefortina, patulina y ocratoxina A. Además determinaron que todos los aislamientos de *P. commune* produjeron ácido ciclopiazónico.

En Argentina, Pose *et al.* (2004) indicaron que 12 de las 17 especies de *Penicillium* identificadas en la superficie de embutidos cárnicos elaborados en la provincia de Buenos Aires, fueron reportadas como toxicogénicas.

Actualmente no existe ninguna normativa en el Código Alimentario que restrinja la presencia de determinadas especies de hongos durante el proceso de producción de embutidos cárnicos. Sin embargo, cada vez son más los consumidores que padecen de reacciones alérgicas ante ciertos alimentos. Frente a esta situación es factible pensar que mercados exigentes como el Europeo o el Norteamericano, no tardarán en aplicar un control más estricto sobre la presencia de determinadas especies fúngicas en productos cárnicos embutidos secos. Es por ello, que el control de la microbiota que se desarrolla en superficie será un factor a tener en cuenta cada vez con mayor consideración, si se pretende competir en mercados internacionales y mejorar el mercado interno.

En el cuadro 3 se presentan las especies fúngicas consideradas como de mayor importancia mundial, por su potencial producción de micotoxinas.

Tabla 3: Mohos y Micotoxinas considerados actualmente de importancia mundial (Miller, 1994).

Especie de moho	Micotoxinas producidas
<i>A. parasiticus</i>	Aflatoxinas B1, B2, G1 y G2
<i>A. flavus</i>	Aflatoxinas B1 y B2
<i>F. sporotrichioides</i>	Toxina T-2
<i>F. graminearum</i>	Desoxinivalenol (o nivalenol) Zearalenona
<i>F. moniliforme</i>	Fumonisina B1
<i>P. verrucosum</i>	Ocratoxina A
<i>A. ochraceus</i>	Ocratoxina A

2.3.2.1.1. Toxinas de *Penicillium*, *Aspergillus* y *Fusarium*

2.3.2.1.1.1. Ocratoxina A

La ocratoxina A fue descubierta como metabolito de *Aspergillus ochraceus* en 1965. Posteriores estudios han demostrado la capacidad de otros hongos para producirla, siendo los principales productores *Aspergillus ochraceus*, *P. viridicatum* y *P. verrucosum* (la mayoría de los aislamientos de este último son productores) (Pitt, 1987).

La producción de OA fue también mencionada en otras especies del género *Aspergillus* incluidas en las secciones *Wenti*, *Usti* y *Terrei* (Ueno *et al.*, 1991). La producción de esta micotoxina también fue citada para *A. fumigatus* (Szebiotko *et al.*, 1981)

A. alutaceus crece más lento que *A. flavus* y *A. parasiticus*, pero con una actividad de agua de sólo 0,79 y una temperatura de 8 a 37°C, aunque los valores óptimos son de 25 a 31°C. Cabe destacar que la micotoxina se produce en un rango de temperaturas de 15 a 37°C, con valores óptimos entre 25 y 28°C.

P. verrucosum crece a temperaturas de 0 a 31°C y con una actividad de agua mínima de 0,80. Se produce ocratoxina A en todo el intervalo de temperaturas. Pueden producirse cantidades considerables de toxinas a temperaturas de sólo 4°C y con una actividad de agua de sólo 0,86.

Al parecer, la exposición a la ocratoxina A (OA) se produce principalmente en zonas templadas del hemisferio norte donde se cultiva trigo y cebada (IARC, 1993). Las concentraciones de OA notificadas en estos productos oscilan entre cantidades ínfimas y concentraciones de 6 000 mg/kg, en trigo de Canadá. En el Reino Unido, se notificaron concentraciones comprendidas entre menos de 25 y 5 000 mg/kg y entre

menos de 25 y 2 700 mg/kg, en cebada y trigo respectivamente. La OA también está presente en el maíz, el arroz, los guisantes, los frijoles, el caupí, los frutos de plantas trepadoras y sus productos, el café, las especias, las nueces y los higos.

La detección en Europa de la presencia de OA en productos de cerdo vendidos en establecimientos minoristas y en sangre de cerdo ha demostrado que esta toxina puede pasar de los piensos a los productos de origen animal.

Aunque los cereales se consideran la principal fuente de OA en la alimentación humana, se indicó (IARC, 1993) que los productos de cerdo pueden ser también una fuente importante de esta toxina. Se encontró OA en la sangre (y la leche) de personas de diversos países europeos, como Francia, Italia, Alemania, Dinamarca, Suecia, Polonia, Yugoslavia y Bulgaria. Una de las concentraciones más altas notificadas es 100 ng/ml de OA en sangre procedente de Yugoslavia, mientras que en Italia se han registrado concentraciones de OA en leche de 6,6 ng/ml. En al menos once países existen o se han proyectado reglamentos sobre la OA; las concentraciones permitidas varían de 1 a 50 mg/kg en alimentos y de 100 a 1 000 mg/kg en piensos. En Dinamarca, para determinar si los productos de una determinada canal de cerdo son aceptables se analiza el contenido de OA de un riñón de dicha canal. La carne y determinados órganos del cerdo pueden consumirse como alimentos si el contenido de OA del riñón no es superior a 25 y 10 mg/kg, respectivamente (van Egmond, 1997).

El Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios recomendó una ingesta semanal tolerable provisional de OA de 100 ng/kg de peso corporal, correspondiente a aproximadamente 14 ng diarios por kg de peso corporal.

La ocratoxina A fue objeto de estudio por su relación con la nefropatía endémica de los Balcanes, una enfermedad renal crónica mortal que afecta a los

habitantes de algunas regiones de Bulgaria, la ex Yugoslavia y Rumania. La OA ocasiona toxicidad renal, nefropatía e inmunodepresión en varias especies de animales y es cancerígena en animales de experimentación.

Existen pruebas suficientes obtenidas en estudios con animales de experimentación sobre la carcinogenicidad de la OA (IARC, 1993).

2.3.2.1.1.2. Aflatoxinas

Las aflatoxinas fueron aisladas y caracterizadas tras ser descubiertas como responsables la muerte de mas de 100000 pavos, hecho que provocó un aumento en los estudios dedicados hacia las micotoxinas. Los mohos productores de aflatoxinas están muy extendidos por todo el mundo, en climas templados, subtropicales y tropicales, y pueden producir aflatoxinas, tanto antes como después de la cosecha, en numerosos alimentos y piensos, especialmente semillas oleaginosas, nueces comestibles y cereales (Coker, 1997).

Aunque las aflatoxinas están relacionadas predominantemente con productos de origen subtropical y tropical, se ha comunicado también su presencia en climas templados en cereales tratados con ácidos (Pettersson *et al.*, 1989).

Las toxinas mas importantes son: B1, B2, G1, G2 (nombres basados en su fluorescencia y en su movilidad durante la cromatografía de capa delgada). La B1 es el más potente cancerígeno natural conocido. Las aflatoxinas pueden también provocar teratogénesis, serios daños en el hígado y efectos inmunosupresivos.

El cáncer de hígado humano tiene alta incidencia en África central y en suroeste de Asia, estudios realizados en varios países de África y en Tailandia muestran una correlación entre consumo de aflatoxina y la ocurrencia del cáncer de hígado, no fue demostrado en zonas rurales de Estados Unidos, a pesar de las considerables cantidades de aflatoxina en grano.

En animales, ha sido demostrado que las aflatoxinas han causado varios síndromes: incluido el cáncer de hígado, colon y riñón (en ratas, ratones, monos, patos y truchas) Efectos graves en humanos son raros, sin embargo varios brotes han sido registrados, recientemente murieron 13 niños Chinos en el noroeste de Malasia, aparentemente debido al consumo de fideos contaminados, aflatoxinas fueron confirmadas en tejidos postmortem tomados de los pacientes.

Las aflatoxinas y el virus de la hepatitis B son aparentemente cocarcinógenos (por sí mismos no transforman una célula normal en una cancerosa pero junto a otra puede desencadenar dicha transformación) y su ocurrencia simultánea aumenta sustancialmente la probabilidad de padecer cáncer de hígado. Sin embargo pruebas apoyan la hipótesis de que un alto consumo de aflatoxinas está relacionado con un alto índice de cáncer, incluso en ausencia del virus de la hepatitis B.

Si la acción inmunodepresora de las aflatoxinas en el ganado se manifiesta de forma similar en las personas, es posible que las aflatoxinas (y otras micotoxinas) desempeñen un papel importante en la etiología de las enfermedades que sufre la población en algunos países en desarrollo en los que se ha comunicado una alta exposición a estas toxinas.

El grupo más importante de aspergilli toxigénicos son *A. flavus*, *A. parasiticus* y *A. niger*. También se describieron otras especies no incluidas en la sección *Flavi* con capacidad de elaborarlas. Se ha detectado la producción de aflatoxina B1 en especies pertenecientes a cuatro secciones distintas a la sección *Flavi*: *Aspergillus (Eurotium) amstelodami*, *E. chevalieri*, *E. rubrum*; *Fumigati* (*A. fumigatus*), *Terrei* (*A. terreus*) y *Candidi* (*A. candidus*). (Abarca et al., 1997.)

La actividad de agua óptima para la proliferación de *A. flavus* es alta (alrededor de 0,99); el valor máximo es al menos 0,998 y el mínimo no se ha determinado aún con precisión, pero según Pitt y Miscamble (1995) es aproximadamente 0,82. En general,

parece que una actividad de agua alta favorece la producción de toxinas. Se ha notificado que *A. flavus* puede proliferar a temperaturas de 10 a 43°C. La tasa de crecimiento óptima, hasta 25 mm al día, se produce a una temperatura ligeramente superior a 30°C. *A. flavus* produce aflatoxinas en el intervalo de temperaturas de al menos 15 a 37°C. No es posible especificar una temperatura óptima para la producción de toxinas, aunque se ha notificado que entre 20 y 30°C la producción es considerablemente mayor que a temperaturas más altas y más bajas.

Los efectos de la actividad de agua y la temperatura sobre el comportamiento de *A. parasiticus* son similares a los antes descritos para *A. flavus*. Pitt y Miscamble (1995) han notificado un valor mínimo de 0,83 aproximadamente para el crecimiento y de 0,87 aproximadamente para la producción de aflatoxinas. Hay pocos datos sobre de los efectos de la temperatura sobre el crecimiento y la producción de aflatoxinas de *A. parasiticus*. Se reportaron valores óptimos para el crecimiento y para la producción de toxinas de aproximadamente 30 y 28°C, respectivamente.

La aflatoxina B1 es cancerígeno para el hombre (IARC, 1993a) y es uno de los agentes causantes de cáncer de hígado más potentes que se conocen. También han fallecido personas (Krishnamachari *et al.*, 1975) a causa de intoxicación aguda por aflatoxinas en la India (en 1974), por ejemplo, cuando las lluvias intempestivas y la escasez de alimentos impulsaron el consumo de maíz muy contaminado. Si la acción inmunodepresora de las aflatoxinas en el ganado se manifiesta de forma similar en las personas, es posible que las aflatoxinas (y otras micotoxinas) desempeñen un papel importante en la etiología de las enfermedades que sufre la población en algunos países en desarrollo en los que se ha comunicado una alta exposición a estas toxinas.

Lubulwa y Davis (1994) estudiaron las pérdidas económicas atribuibles únicamente a la presencia de aflatoxinas, en maíz y maní, en países de Asia sudoriental (Tailandia, Indonesia y Filipinas), llegando a la conclusión de que alrededor del 66 % de las pérdidas totales se debían al maíz contaminado, y las pérdidas atribuibles al deterioro

y a los efectos dañinos sobre la salud de las personas y de los animales representaban, respectivamente, el 24, el 60 y el 16 % del total. No obstante, el estudio tuvo en cuenta únicamente las pérdidas relacionadas con la morbilidad y las muertes prematuras ocasionadas por el cáncer. En consecuencia, es probable que las pérdidas relacionadas con las aflatoxinas sean mucho mayores si se incluyen las otras consecuencias para la salud humana del efecto inmunotóxico de las aflatoxinas (y otras micotoxinas).

2.3.2.1.1.3. Fumonisinias

Las fumonisinias son un grupo de micotoxinas caracterizado recientemente, producidas por *F. moniliforme*, un moho presente en todo el mundo y que se encuentra con frecuencia en el maíz (IARC, 1993). Se ha comunicado la presencia de fumonisina B1 en maíz (y sus productos) en diversas regiones agroclimáticas de países como los Estados Unidos, Canadá, Uruguay, Brasil, Sudáfrica, Austria, Italia y Francia. La producción de toxinas es particularmente frecuente cuando el maíz se cultiva en condiciones calurosas y secas.

La actividad de agua mínima para el crecimiento de *F. moniliforme* es 0,87; el límite máximo registrado es superior a 0,99. Las temperaturas de crecimiento mínima, óptima y máxima son 2,5 a 5,0, 22,5 a 27,5 y 32,0 a 37,0°C, respectivamente. No existe información sobre las condiciones necesarias para la producción de fumonisina B1.

La exposición a la fumonisina B1 (FB1) del maíz produce leucoencefalomalacia (LEM) en ganado equino y edema pulmonar en ganado porcino. Se han registrado casos de LEM en numerosos países, entre ellos los Estados Unidos, Argentina, Brasil, Egipto, Sudáfrica y China. La FB1 produce también efectos tóxicos en el sistema nervioso central, hígado, páncreas, riñones y pulmones de varias especies de animales.

La presencia de fumonisinias en maíz se ha relacionado con casos de cáncer de esófago en habitantes de la zona de Transkei, África austral y China. Se ha estudiado la

relación entre la exposición a *F. moniliforme*, en maíz de producción doméstica, y la incidencia de cáncer de esófago en la zona de Transkei durante el decenio 1976-86 (Rheeder *et al.*, 1992). El porcentaje de granos infectados por *F. moniliforme* fue significativamente mayor en la zona de alto riesgo de cáncer durante todo el período, y las concentraciones de FB1 y FB2 fueron significativamente mayores en maíz mohoso obtenido de zonas de alto riesgo en 1986.

Anteriormente, una evaluación del Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (IARC) había llegado a la conclusión de que se habían obtenido en estudios con animales de experimentación pruebas suficientes de la carcinogenicidad de cultivos de *F. moniliforme* con un alto contenido de fumonisinas; sin embargo, los experimentos con animales habían proporcionado pocas pruebas de la carcinogenicidad de la fumonisina B1 (IARC, 1993). No obstante, el Programa Nacional de Toxicología del Departamento de Salud y Servicios Sociales de los Estados Unidos ha comunicado los resultados de un estudio concluido recientemente sobre la toxicidad y carcinogenicidad de la fumonisina B1 (NTP, 1999). Aunque está aún en la fase de redacción, el informe llega a la conclusión de que existen pruebas claras de la actividad cancerígena de la fumonisina B1 en ratas F344/N machos, basadas en el aumento de la aparición de neoplasmas en túbulos renales y que existen también pruebas evidentes de la actividad cancerígena de la fumonisina B1 en ratones B6C3F1 hembras, basadas en el aumento de la aparición de neoplasmas hepatocelulares. No existen pruebas de la actividad cancerígena de la fumonisina B1 en ratas hembras o ratones machos.

2.3.2.1.1.4. Zearalenona

Esta toxina es producida por ciertas especies del género *Fusarium*. La zearalenona fue aislada en 1962 a partir de cultivos de *F. graminearum* (Stob *et al.*, 1962), pero también pueden producirla los mohos *F. culmorum* y *F. sporotrichioides*.

Las especies de *Fusarium* requieren, en general, una humedad relativa del 22 al 25 por ciento y pueden desarrollarse en el maíz y en otras plantas hasta la maduración en el campo, pero sólo pueden crecer limitadamente en granos secos almacenados adecuadamente (FAO/WHO/UNEP, 1977).

La zearalenona y sus derivados uterotrópicamente activos pueden ser clasificados como estrógenos en el sentido estricto que producen estros. Aunque no son esteroides, producen estros reales como también la mayoría de las respuestas generales del anabolismo asociado a estrógenos (Purchase, 1974).

Las cerdas son los animales domésticos más afectados por esta toxina, aunque también es sospechado el hiperestrogenismo en bovinos, debido a zearalenona (Mirocha *et al.*, 1974). Es severamente tóxica para ovejas, en las que puede causar cien por ciento de infertilidad a concentraciones del orden de 0,05 ppm.

La zearalenona actúa como una hormona en *F. roseum* donde regula la producción del estado sexual, como por ejemplo la producción de peritecios (Mirocha, 1974).

Existen informes en los cuales se demuestra que la zearalenona y el zearalenol se unen al sitio receptor del 17- β -estradiol obtenido de glándulas mamarias de ratas. Ambos compuestos resultaron inhibidores competitivos del estradiol por los sitios activos (Greenman *et al.*, 1976).

Esta micotoxina ha sido hallada en productos muy diversos como heno, alimentos para animales, maíz, alimentos para cerdos, sorgo y avena (Shotwell, 1977).

Mirocha *et al.* (1974) han reportado la ocurrencia natural de zearalenona en una gran variedad de granos y alimentos para animales que han estado involucrados en el desarrollo de micotoxicosis.

La mayoría de los problemas reportados, han sido causados por sus propiedades estrogénicas y han incluido síntomas como infertilidad, disminución de nacimientos, muertes neonatales y camadas más pequeñas en bovinos.

La ocurrencia de zearalenona ha sido reportada en varias partes del mundo, como Estados Unidos, Canadá, Argentina, Brasil, Austria, Bulgaria, Francia, Hungría, Polonia, España, Yugoslavia, Egipto, Suazilandia, Transkei, Zambia, Australia, China, India, Indonesia, Japón, Corea, Nepal y Nueva Zelanda (IARC Monographs, 1993).

2.3.2.1.2. Otros géneros productores de micotoxinas

2.3.2.1.2.1. Alternaria

Se conocen hasta el presente ocho toxinas de *Alternaria* que fueron encontradas como contaminantes naturales: el ácido tenuazónico (TA), el Alternariol (AOH), el Alternariol metil éter (AME), el Altenueno, las Alvertoxinas y toxinas AAL. El ácido tenuazónico (TA) es el metabolito tóxico de *Alternaria* más estudiado, por su alta actividad biológica ya que es tóxico para embriones de pollo y causa hemorragias y muerte en ratones. Se ha sugerido además que el ácido tenuazónico (TA) tiene un importante rol en la etiología del onylai una enfermedad hematológica común en África y presenta además actividad antitumoral y antibacteriana.

Por otro lado, el Alternariol (AOH) y Alternariol metil éter (AME) son producidos en grandes cantidades por cepas toxicogénicas de *Alternaria* siendo *A. alternata* y *A. tenuissima* las principales especies involucradas. Ambas toxinas tienen pocos efectos agudos, pero pueden actuar en forma sinérgica, teniendo además efectos fetotóxicos y

teratogénicos en ratones. Las altertoxinas tienen efectos mutagénicos mientras que las toxinas AAL, producidas por un patotipo raro de *A. alternata*, son estructuralmente muy semejantes a las fumonisinas que causan cáncer esofágico en humanos y la leucoencefalomalasia equina. Su incidencia natural ha sido poco estudiada hasta el presente.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. CARACTERÍSTICAS DE LA FÁBRICA

El estudio se realizó en una fábrica de productos cárnicos embutidos secos, en el partido de Balcarce, región Sudeste de la provincia de Buenos Aires, Argentina.

En esta zona el clima es húmedo, poco propicio para la elaboración de embutidos fermentados secos.

Existe solamente una fábrica de embutidos cárnicos de características artesanales, donde la mayor producción se concentra en productos frescos. La cultura particular de consumo de embutidos secos de la zona, hace que la demanda de los mismos sea irregular a lo largo del año. Se elaboran pocos productos con escasas diferencias de ingredientes entre ellos, los que son comercializados con distinto grado de maduración, respondiendo a la demanda del mercado.

La fábrica carece de infraestructura que permita realizar un control automatizado de las condiciones ambientales, necesarias para llevar a cabo el proceso de maduración. Las salas de “estufado” donde se realizan las fermentaciones se regulan a temperaturas de entre 20 y 22°C, que se logran mediante la ignición de carbón. Las cámaras de maduración presentan condiciones de temperatura y humedad relativa (HR) que responden al ambiente. Éstas oscilan entre 10°C y 80-85% de HR en invierno, y 20°C y 85-90% de HR en verano. La aireación de las salas se realiza de forma manual regulando la abertura de puertas y ventanas.

Las mezclas de masa utilizadas se embuten en tripas naturales y básicamente son elaboradas con carne de cerdo (55-65%), carne vacuna (25%), tocino de cerdo (20%), sal, aditivos permitidos (nitratos y poli fosfatos) y distintas especias (5%), de acuerdo al producto.

Entre las especialidades elaboradas se destacan el “chorizo criollo” y la “longaniza cantinera”, por su mayor demanda en el mercado. Entre las especialidades se destacan respectivamente: Bondiola serrana seca, chistorra de Navarra seca, Chorizo seco, Jamon embutido, Jamon serrano entero (por encargo), Sopresata artesanal y Chistorra de navarra de cerdo, Chorizo especial de cerdo, Lomo adobado de cerdo, Matambrito de cerdo.

3.2. CARACTERIZACIÓN DE LA MICROBIOTA

3.2.1. MUESTREO Y AISLAMIENTO

Se realizaron dos muestreos, que coincidieron con las estaciones climatológicas de otoño e invierno.

El **primer muestreo**, correspondiente a la estación climatológica de otoño, se realizó en el mes marzo del 2010. Se tomaron 25 muestras correspondientes a 6 productos diferentes, todos ellos pertenecientes a la línea de embutidos secos (tabla 4).

Tabla 4. Tipo de embutidos cárnicos muestreados. Muestreo de otoño.

Producto	Número de muestra	Fecha de elaboración	Composición
Salame	1,2,3,4	19 febrero	cerdo 30% vacuna 31% tocino 30% especias, sal , aditivos 8,4%
Longaniza tipo Calabresa	5,6,7,8	19 febrero	cerdo 30% vacuna 37% tocino 30% especias, sal , aditivos 6,2%
Chorizo seco tipo Criollo	9,10,11,12	12 marzo	cerdo 55% vacuna 20% tocino 20% especias, sal , aditivos 5%
Chorizo seco tipo Español	13,14,15,16	12 marzo	cerdo 55% vacuna 20% tocino 20% especias, sal , aditivos 5%
Chistorra de Navarra	17,18,19,20	15 marzo	carne de jamón y lomo de cerdo 75% tocino 20% especias, sal , aditivos 5%
Salame Picado mediano	21, 22, 23, 24	5 marzo	cerdo 55% vacuno 20% tocino 20% especias, sal , aditivos 5%
Chorizo seco tipo Criollo	25	5 marzo	cerdo 55% vacuna 20% tocino 20% especias, sal , aditivos 5%

El **segundo muestreo**, correspondiente a la estación de invierno, se realizó a fines del mes de mayo del mismo año. Se recolectaron 25 muestras correspondientes a productos elaborados en ese momento (Tabla 5)

Tabla 5. Tipo de embutidos cárnicos muestreados. Muestreo de invierno

Producto	Número de muestra	Temperatura cámara	Fecha de elaboración	Composición
Chorizo Español	26,27,28,29	9°C	6 mayo	cerdo 55% vacuna 20% tocino 20% especias, sal , aditivos 5%
Longaniza tipo Calabresa	30, 31, 32, 33	9°C	23 abril	cerdo 30% vacuna 37% tocino 30% especias, sal , aditivos 6,2%
Longaniza Cantinera	34,35,36,37	9°C	14 mayo	
Chorizo seco tipo Criollo	38,39,40,41, 42,43	19°C	21 mayo	cerdo 55% vacuna 20% tocino 20% especias, sal , aditivos 5%
Chistorra de Navarra	44,45,46,47	19°C	12 mayo	carne de jamón y lomo de cerdo 75% tocino 20% especias, sal , aditivos 5%
Chorizo picado grueso	48,49,50	22°C (cámara de fermentación)	21 mayo	cerdo 55% vacuno 20% tocino 20% especias, sal , aditivos 5%

Las muestras se obtuvieron de forma aséptica. Para ello se utilizó un hisopo de algodón estéril introducido previamente en una solución estéril de agua de peptona al 0,1% y NaCl al 0,8%, para prevenir posibles choques osmóticos en la biota microbiana. En cada muestra el hisopo se frotó sobre la superficie del producto en un área de 10 cm² aproximadamente. Extraída la muestra, el hisopo se sumergió en la misma solución para permitir la resuspensión de células, conidios y trozos de hifas. A

partir de las suspensiones se tomaron alícuotas y se realizaron siembras en superficie sobre placas de Petri con Agar Dicloroanilina con 18% de glicerol (DG18). El medio DG18 posee una alta actividad de agua (0.95) y permitió el desarrollo de todo tipo de especies, xerófilas, no xerófilas y levaduras. Las placas de Petri se incubaron a 28°C durante 7 días. Transcurrido dicho periodo todas las colonias que presentaron diferencias morfológicas macroscópicas entre sí, se repicaron sucesivas veces hasta obtener un cultivo puro de cada una de ellas.

3.2.2. CONSERVACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS

Todos los aislamientos obtenidos, se conservaron en una solución de glicerol al 30% (v/v agua) a -20°C. Para ello a cada cultivo puro conseguido se adicionaron entre 3 y 4 ml de la solución de glicerol estéril. Las hifas y conidios se desprendieron del medio con un ansa de Digrafsky estéril. Posteriormente la suspensión fue recolectada mediante una micropipeta y colocada en tubos Eppendorf de 1ml.

3.2.3. IDENTIFICACIÓN

La identificación se realizó empleando la clave taxonómica de Pitt y Hocking (1997). Para ello, cada uno de los aislamientos a identificar se sembró en los siguientes medios de cultivo: Agar Czapek con Extracto de Levadura (CYA), Agar Nitrato con 25% de Glicerol (G25N) y Agar Extracto de Malta (MEA). Las placas de MEA y G25N se incubaron a 28°C, mientras que en CYA se incubaron a 4, 28 y 37°C. Las placas incubadas a 37°C se colocaron en bolsas de polietileno para evitar la desecación. La siembra en CYA y MEA incubada a 28°C se realizó inoculando la muestra en tres

puntos equidistantes del borde y centro de la placa. Aquellas con CYA a 4°C y 37°C y con G25N se sembraron en dos puntos sobre una mitad de la placa (Figura 1). La siembra se realizó con una micropipeta de 10 µl de capacidad, inoculando 3 µl de una suspensión de conidios en cada punto. La lectura se efectuó a los 7 días.

Transcurridos los 7 días de incubación en los diferentes medios de cultivo y a las tres temperaturas indicadas anteriormente, se determinó para cada uno de los aislamientos morfológicamente diferentes, las siguientes características: **1.** Diámetro de las colonias (en forma manual en el reverso de la colonia); **2.** Producción de exudados y pigmentos solubles en agua que difunden al medio; **3.** Coloración del micelio y de los conidios o esporas; **4.** Coloración del reverso de la colonia; **5.** Crecimiento del micelio y textura de la colonia (algodonosa, aterciopelada, compacta, funiculosa, fasciculada, etc.); **6.** Formación de estrías y surcos superficiales.

Luego de registrar todas las características, los aislamientos que presentaron idéntica descripción de las colonias fueron agrupados para luego ser identificados empleando la clave de referencia. De cada grupo de aislamientos se tomaron fotografías de las placas con medio CYA y MEA, utilizando una cámara Olympus, 8MP y 5x de zoom óptico.

Las observaciones microscópicas se llevaron a cabo realizando preparaciones directas, a partir de las colonias en los medios CYA y MEA. Para ello y observando a través de un microscopio estereoscópico (ZEISS 47526, f=100) se extrajeron pequeñas áreas de la colonia con aguja histológica. Con el objeto de observar hifas se tomaron muestras del borde de la colonia donde la cantidad de cuerpos de fructificación es mínima. En caso de observar estructuras reproductivas se tomaron muestras del centro de la colonia. En ambos casos la muestra se colocó sobre un portaobjetos con una gota de etanol 70% (v/v en agua), facilitando la elaboración de preparados en aquellas especies con conidios hidrofóbicos. Cuando el etanol se

evaporó, se colocó sobre la muestra una gota de ácido láctico. Posteriormente se ubicó un cubreobjetos y se selló con laca.

Las observaciones microscópicas se realizaron en un microscopio con contraste de fases, Olympus BH-2 con ocular de 10x y objetivos de 10x, 20x, 40x y 100x. Este último de inmersión en aceite. Para registrar el tamaño de estructuras de reproducción se utilizó un micrómetro ocular que se acopló a uno de los oculares del microscopio. La mayoría de las observaciones se realizaron con contraste de fases, utilizando la lente de 40x y registrándose para cada uno de los aislamientos las siguientes características: **1.** Textura superficial de las hifas; **2.** Existencia de cuerpos de fructificación; **3.** Diámetro, forma, ubicación y arquitectura externa de los conidios y esporas. En el caso de *Penicillium*: **1.** Número de ramificaciones de la estructura reproductiva (*monoverticillate*, *biverticillate*, *terverticillate* y *quaterverticillate*); **2.** Longitud y textura superficial de los conidióforos; **3.** Número y longitud de las *rami*, *ramuli* y *metulae*; **4.** Longitud y forma de las fiálides; **5.** Forma, textura superficial, diámetro y color de los conidios; **6.** Formación de *coremium* y *synnemata*. En el caso de *Eurotium*: **1.** longitud y textura superficial de los conidióforos; **2.** diámetro de las vesículas; **3.** longitud y forma de la fiálides; **4.** forma, textura superficial, diámetro y color de los conidios; **5.** características de los ascocarpos (color, forma, días de maduración); **6.** forma, dimensión, color y arquitectura externa de las ascosporas.

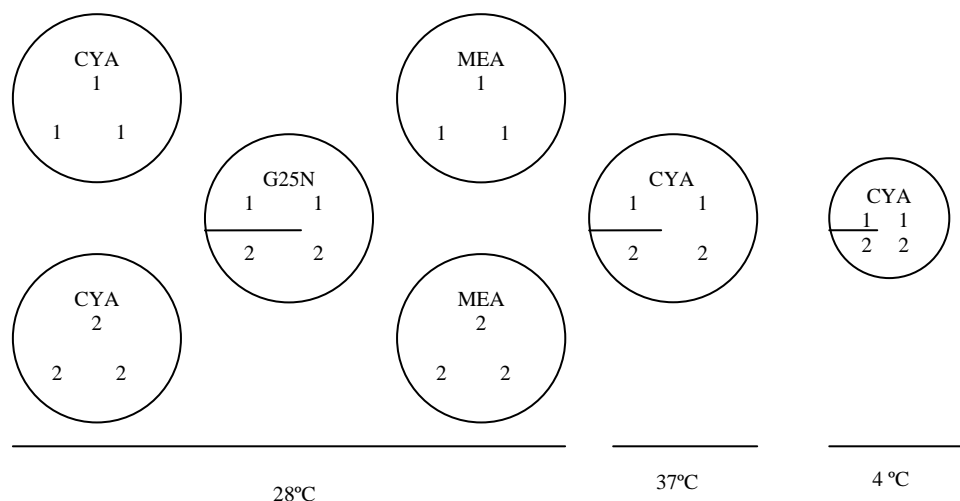


Figura 1. Esquema de siembra en los diferentes medios de cultivo para la identificación de hongos filamentosos. Los números dentro de las placas de Petri corresponden a los diferentes aislamientos. Las temperaturas corresponden a la incubación realizada durante 7 días.

3.2.4. DETERMINACIÓN DE LA FRECUENCIA DE AISLAMIENTO

Identificados todos los aislamientos, se determinó la frecuencia de aislamiento de cada especie de hongo filamentoso (expresada en %) a través del cociente entre el número de muestras en las cuales cada especie fue aislada y el número de muestras totales. La frecuencia de aislamiento se determinó para cada período de muestreo (otoño e invierno) y para cada tipo de producto.

3.3. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD TOXIGÉNICA DE CEPAS DE ESPECIES AISLADAS DE LA SUPERFICIE DE LOS EMBUTIDOS.

Se evaluó el potencial toxigénico de los aislamientos correspondientes a las especies reportadas como potencialmente productoras de micotoxinas. Para ello se emplearon los protocolos de Filtenborg and Frisvad (1980) y Filtenborg *et al.* (1983) para el caso de micotoxinas extracelulares e intracelulares, correspondientes a los géneros *Penicillium* y *Aspergillus*.

3.3.1. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA PARA LA EXTRACCIÓN

Los aislamientos potencialmente productores de micotoxinas se cultivaron en medio de cultivo CYA y MEA. Para ello se tomó una alícuota de 3-5 µl y se estiraron las placas. Los mismos se incubaron 5 días a 28°C y luego a 22°C durante 3-5 días, hasta el momento de la evaluación.

3.3.2. EXTRACCIÓN

El procedimiento empleado para la extracción de las micotoxinas fue desarrollado por Tapia *et al.* (1986) y mejorado en el laboratorio de Toxicología Animal de la Estación Experimental Agropecuaria INTA Balcarce.

El protocolo de extracción fue el siguiente:

Se homogeneizó el contenido completo de las placas de cultivo (aproximadamente 25 gr) con 90 mL de acetonitrilo, 10 mL de cloruro de potasio 4% y 2 mL de ácido clorhídrico. La homogeneización se realizó con un homogeneizador Sorvall OMNI-MIXER, durante tres minutos a alta velocidad (16000 rpm).

Este homogenato fue filtrado con discos de papel de filtro Whatman N° 4 o similar, recolectándose un volumen de 50 mL.

Al filtrado se le agragaron 50 mL de agua destilada y luego se delipidó con dos alícuotas de 50 mL de hexanos (mezcla de isómeros). La fase de acetonitrilo-agua, delipidada, fue extraída con dos porciones sucesivas de 50 mL de cloroformo. A esta fase extraída se le agregaron 10 gr de sulfato de sodio anhidro para eliminar restos de agua. Posteriormente se evaporó el cloroformo en un evaporador rotatorio de vacío marca Heidolph a 35-40 °C. El residuo seco se resuspendió en 1 mL de cloroformo y se colocó en tubos de hemólisis cerrados herméticamente y conservados a -20 °C hasta el momento del desarrollo en placas cromatográficas.

3.3.3. SIEMBRA

Para detectar las micotoxinas se empleó la técnica de TLC (cromatografía en capa delgada) bidimensional. Para ello se acondicionaron placas cromatográficas o cromatofolios, como se indica en el esquema siguiente (figura 3).

En el caso de hacer la prueba para detectar dos micotoxinas (Ocratoxina A y Aflatoxina B), los estándares se sembraron en dos extremos de la placa, en el extremo inferior izquierdo 2µl de cada estándar, y en el extremo superior derecho 4µl de cada muestra estándar. Por otro lado en el extremo inferior derecho se sembraron 15 µl del extracto fúngico a evaluar.

En el caso de que sólo se quiera determinar la presencia de una micotoxina, se realizó de la misma forma pero sólo se sembró el estándar correspondiente. Mediante la figura 3 se puede ver la correcta disposición de las siembras en la placa TLC.

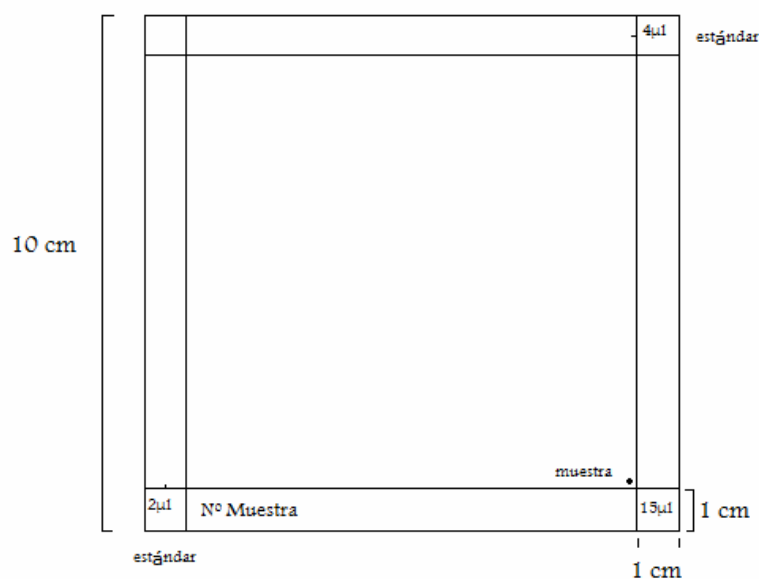


Figura 2. Esquema de la siembra bidimensional en placa TLC (cromatografía en placa fina).

3.3.4. DESARROLLO CROMATOGRÁFICO

Para correr los extractos el desarrollo cromatográfico se utilizaron dos cubetas cromatográficas y dos sistemas de solventes. El primer sistema se conformó con 90% de cloroformo y 10% de acetona y el segundo con 50% de tolueno, 44% de acetato de etilo y 6% de ácido fórmico.

La placa sembrada se introdujo en la primera cubeta con el primer sistema de solventes hasta que el frente del solvente llegó, por capilaridad, a 1 cm del extremo superior de la placa. En ese momento se retiró y se dejó evaporar en la campana de gases hasta la sequedad. A continuación se introdujo en la segunda cubeta que contiene el segundo sistema de solventes y se repitió la operación, pero esta vez la placa se giró 90 grados, de forma que el filo en contacto con la solución fue en el que se encontraban los 4 µl de muestra estándar. En la figura 3 se puede ver la

disposición de las placas respecto a las cubetas cromatográficas en las dos fases de corrido.

Concluido el desarrollo cromatográfico, las placas se dejaron secar en la campana de gases hasta su observación.

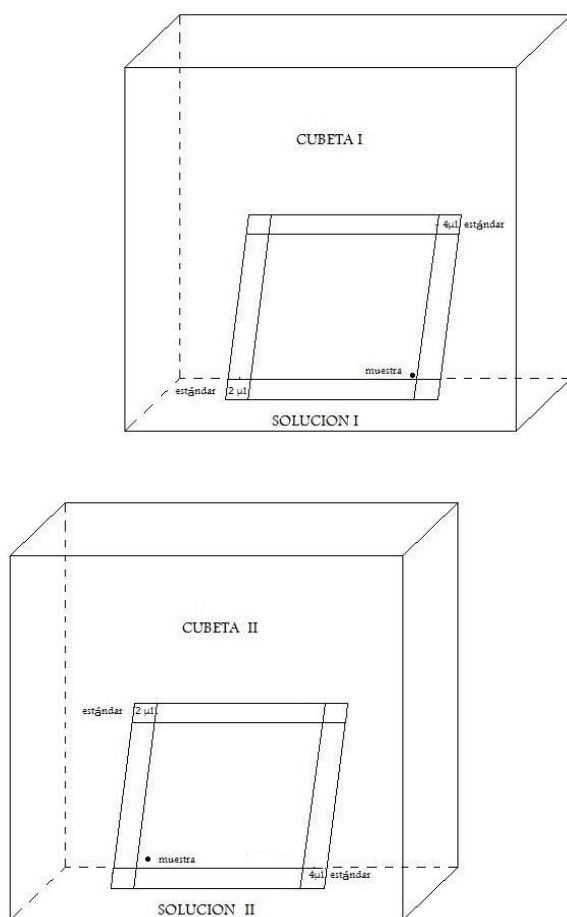


Figura 3. Disposición de la placa en las cubetas I y II.

3.3.5. REVELADO

Para la determinación de la presencia de las micotoxinas, como la Aflatoxina B₁, se necesita revelar las placas. El revelado consiste en rociar las placas con una solución de 2,5ml de ácido sulfúrico llevada a 10 ml con alcohol y dejar secar a 105-110 °C durante 5 minutos en la estufa de secado.

3.3.6. DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LA MICOTOXINA

Para determinar la presencia de las micotoxinas en la muestra, las placas se observaron bajo la luz ultravioleta de onda larga ($\lambda=360$ nm).

En el caso de la Ocratoxina A, se debe detectar una mancha de color amarillo intenso que coincida con la del estándar de 4 μ l a la misma distancia de la corrida.

En el caso de la determinación de la Aflatoxina B₁, la placa se deberá observar bajo luz ultravioleta previo al revelado debiéndose determinar una mancha azul cuya posición deberá coincidir con la intersección de las posiciones del estándar sembrado (2 μ l y 4 μ l). Luego del revelado, la placa volverá a observarse bajo luz ultravioleta registrando un cambio de color de azul a amarillo, tanto en el estándar como en la mancha del extracto problema, apuntando como positivo el resultado.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente estudio se caracterizaron un total de 116 aislamientos provenientes de 50 muestras obtenidas de la superficie de embutidos cárnicos secos, elaborados en una fábrica de producción artesanal, ubicada en la ciudad de Balcarce, Buenos Aires, Argentina, en 2 estaciones climáticas, otoño e invierno.

Se identificaron 9 especies de hongos filamentosos pertenecientes a los géneros *Penicillium*, *Eupenicillium*, *Aspergillus*, *Eurotium*, *Mucor*, *Rhizopus* y 2 especies de levaduras de los géneros *Candida* y *Debaryomyces*.

4.1. DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA DE LAS ESPECIES

Los aislamientos se caracterizaron e identificaron a partir de las características macroscópicas de las colonias y microscópicas de las estructuras fúngicas. Las descripciones se realizaron en los medios de cultivos CYA, MEA y G25N, a partir de los cuales se llevó a cabo tal identificación.

4.1.1. HONGOS FILAMENTOSOS SUPERIORES

Reino: Micetes

Division (Phylum): Ascomycota

Clase: Ascomycetes

Subclase: Eurotiomycetidae

Orden: Eurotiales

Familia: Trichocomaceae

Género: *Penicillium*

Penicillium nalgivense

CYA, 25°C: colonias de 25 a 28 mm de diámetro, de micelio color blanco y con surcos radiales. Abundante producción de conidios de color verde oscuro uniforme. Reverso de la colonia de color amarillento-grisáceo. Presencia de exudados claros. (Figura 4)

MEA, 28°C: colonias 11-17 mm de diámetro, no se observaron surcos. Micelio claro y conidios de color verde-azulado uniforme, reverso color naranja intenso, producto de la nalgiovensina. Ausencia de exudados y pigmentos solubles.

G25N, 25°C: colonias 16-21 mm de diámetro. Se observaron ciertas colonias con surcos radiales y circulares. Micelio blanco y baja producción de conidios. Reverso de la colonia de color blanco. Ausencia de pigmentos y de exudados.

CYA, 4°C: Se observaron colonias pequeñas, indicando un crecimiento positivo.

CYA, 37°C: No se observa crecimiento.

La identificación de los aislamientos de *Penicillium nalgiovensis* (biotipo 1, de coloración verde y biotipo 6, de coloración blanca) fue sencilla, por la coloración naranja intenso encontrada en el reverso de MEA. Esta característica también se pudo apreciar en las colonias sembradas con la muestra directamente obtenida de la superficie de los embutidos en DG18, a los 7 días de incubación (Figura 4, aquí se deben poner fotos).

Penicillium chrysogenum

CYA, 25°C: colonias de 26-33 mm de diámetro, con surcos radiales superficiales. Micelio blanco conidios de color verde oscuro. El reverso de las colonias fue de color amarillento blanquecino. Presencia de exudados y de un pronunciado pigmento amarillo en uno de ellos (Figura 5).

MEA, 28°C: colonias de 29-31 mm de diámetro, uno de los aislamientos presentó surcos. Micelio blanco, con conidios de color verde oscuro no uniforme que se aclaró a medida que se acercó a la zona del borde de la colonia. El color del reverso fue predominantemente verde pálido tornándose amarillento en el centro. Ausencia de exudados y pigmentos.

G25N, 25°C: colonias de 21-22 mm de diámetro, surcos radiales, micelio de color predominantemente marrón. Ausencia de exudados y pigmentos.

CYA, 4°C: se observó crecimiento.

CYA, 37°C: se observó crecimiento y pigmentos en uno de los aislamientos.

La identificación de esta especie se basó en las características morfológicas de las colonias particularmente en la presencia de los pigmentos solubles fluorescentes fuertemente presentes en el medio de cultivo CYA.

Penicillium verrucosum

CYA, 25°C: colonias de 13-18 mm de diámetro con surcado radial y circular, superficie aterciopelada, micelio blanco y baja producción de conidios de color verde. El reverso de las colonias fue marrón amarillento y se pudieron observar rajaduras en el medio de cultivo. Ausencia de pigmentos y exudados.

MEA, 28°C: colonias de 9-14 mm de diámetro, surcado radial y en 2 casos un surco de forma circular. Micelio blanco, con el centro de una tonalidad pálida sin llegar a ser blanco. Reverso marrón anaranjado. Ausencia de exudados y de pigmentos solubles.

G25N, 25°C: colonias de 14-18 mm de diámetro, con surcos radiales y en forma circular. Micelio blanco y conidios de color verde azulado. Ausencia de exudados y pigmentos solubles.

CYA, 4°C: Se observó crecimiento en la mayoría de los casos

CYA, 37°C: No se observó crecimiento tras 7 días de incubación

La identificación se basó en las características de las colonias, pequeñas y con surcos importantes que pudieron observarse en el envés de las colonias (Figura 6). Esta especie es muy importante desde el punto de vista de la producción de micotoxinas, ya que la ocratoxina A es producida por un gran número de aislamientos.

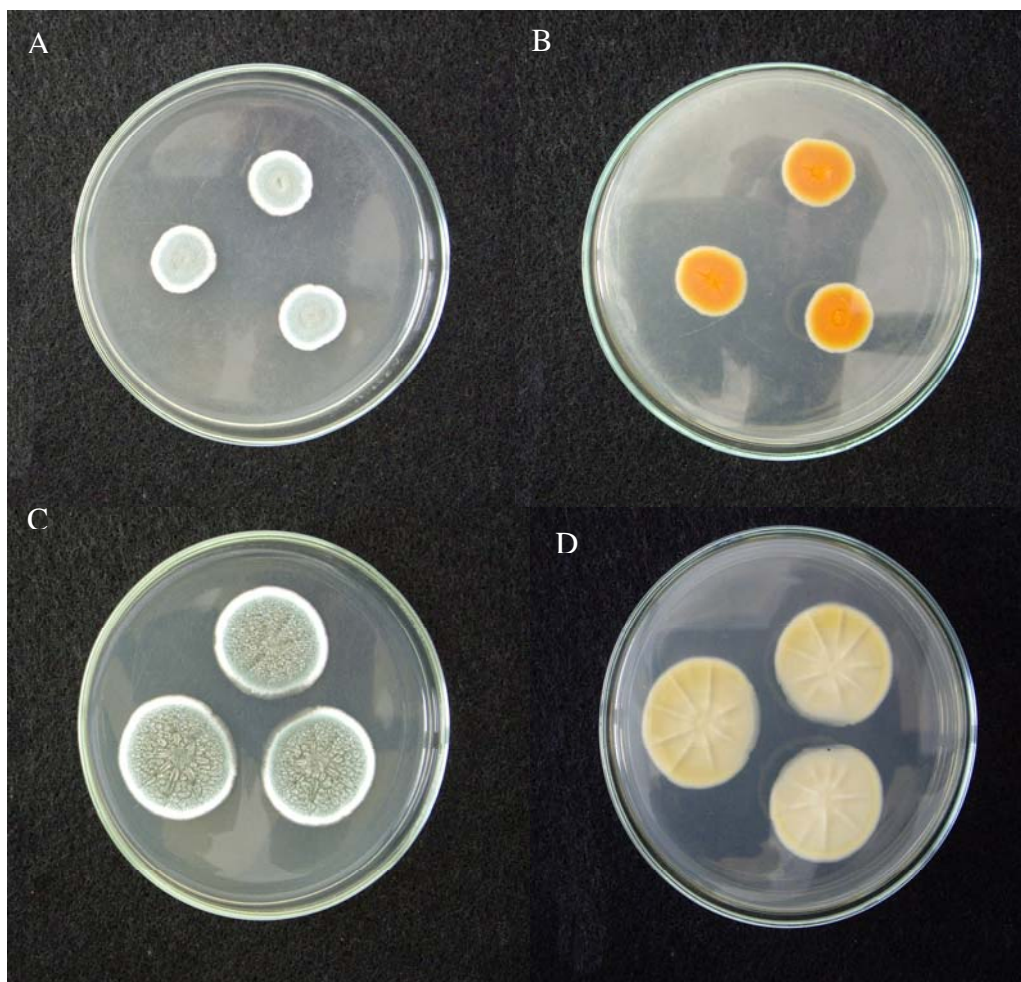


Figura 4. Colonias en MEA y CYA de *Penicillium nalgivense* biotopo 1
A: Superficie en MEA; B: Reverso en MEA
C: Superficie en CYA; D: Reverso en CYA

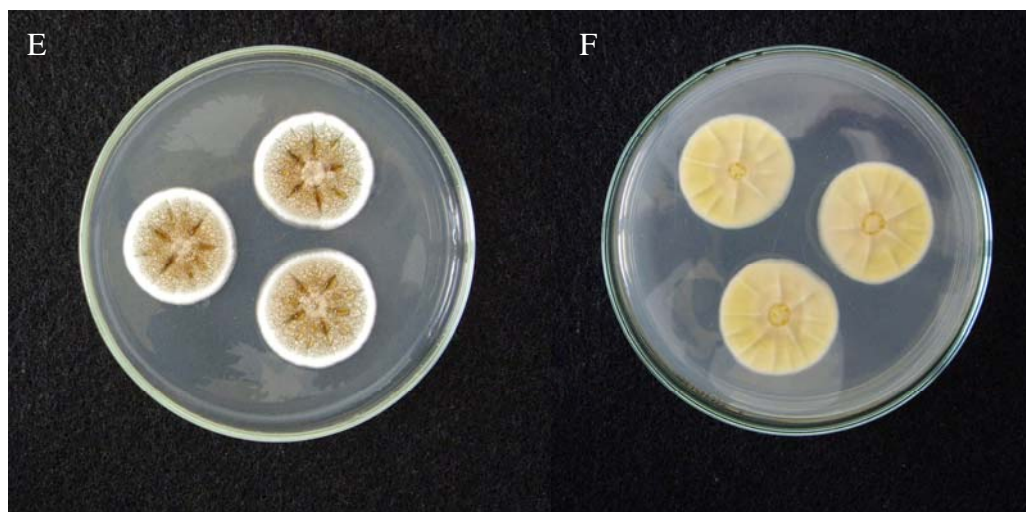


Figura 4. Colonias en CYA de *Penicillium nalgivense*. E: Superficie en CYA; F: Reverso en CYA

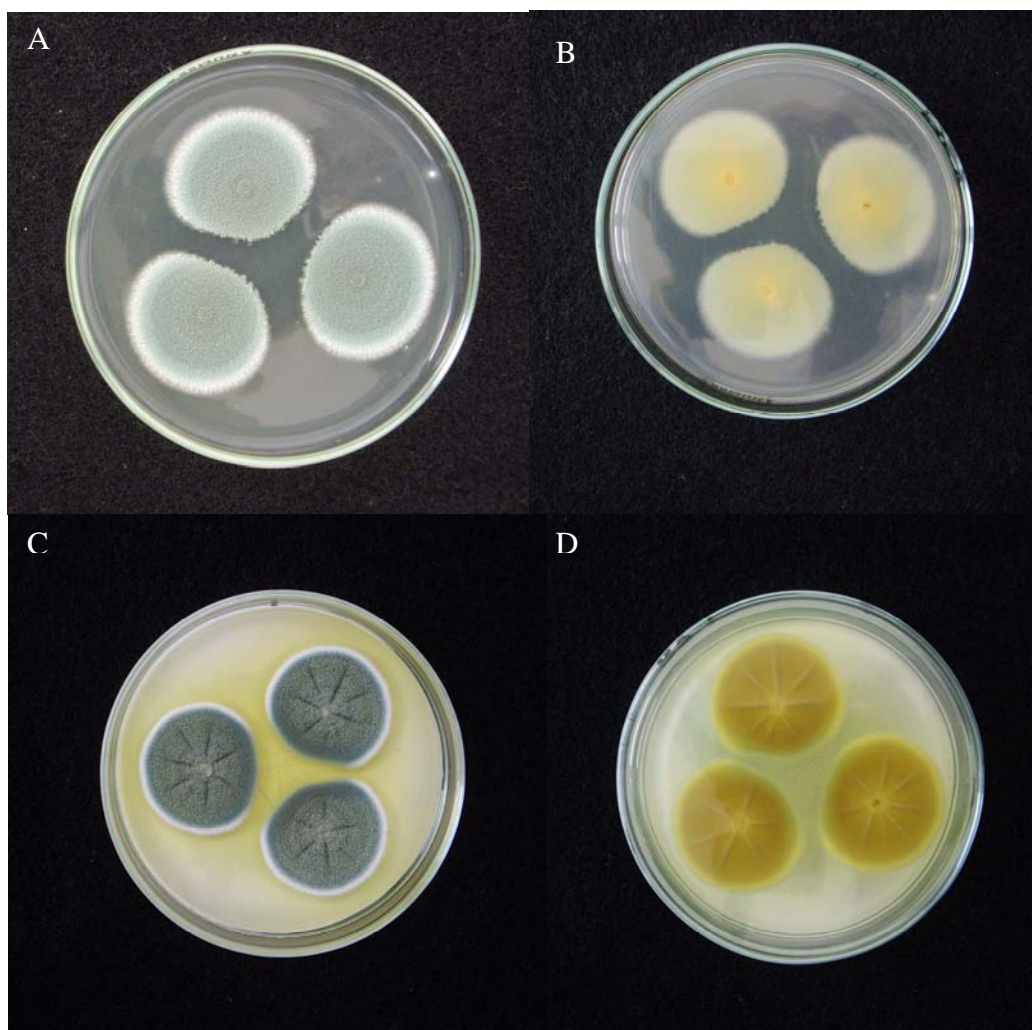


Figura 5: Colonias de *Penicillium chrysogenum*. A: Superficie en MEA; B: Reverso en MEA; C: Superficie en CYA; D: Reverso en MEA

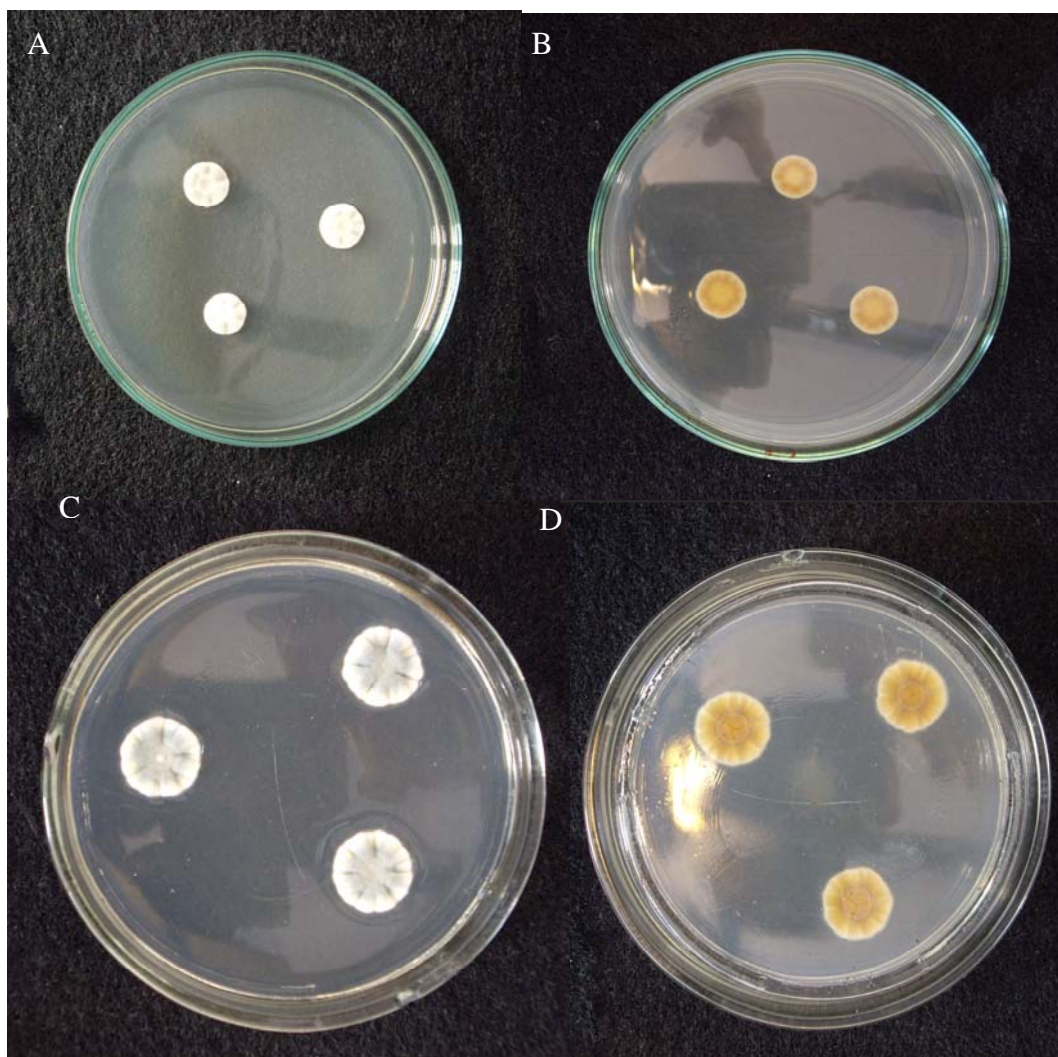


Figura 6. Colonias de *Penicillium verrucosum*. A: Superficie en MEA; B: Reverso en MEA. C: Superficie en CYA; D: Reverso en MEA

Micetes

División (Phylum): Ascomycota

Clase: Ascomycetes

Subclase: Eurotiomycetidae

Orden: Eurotiales

Familia: Trichocomaceae

Géneros: *Aspergillus* y *Eurotium*

Aspergillus flavus

CYA, 25°C: colonias de 48-65 mm de diámetro, sin surcos, con diferentes tonalidades: hacia los bordes el color es verde amarillento y al acercarse más al centro se acentúa el blanco donde se observaron esclerocios de color marrón oscuro, que difirieron en número según el aislamiento. Ausencia de exudados y pigmentos.

MEA, 28°C: colonias de 50-63 mm de diámetro, planas, con micelio de color verde con zonas blancas y esclerocios marrones. Color del reverso de las colonias blanco.

G25N, 25°C: colonias de 25-28 mm de diámetro, superficie algodonosa, sin surcos. Micelio de color blanco amarillento. Ausencia de pigmentos y exudados.

CYA, 4°C . Se observó crecimiento a los 7 días de incubación

CYA, 37°C Se observó crecimiento a los 7 días de incubación, con un tamaño de colonia similar al descrito en MEA.

La identificación de esta especie se basó en las características de las colonias en medios CYA y MEA, en la presencia de esclerocios típicos y en la observación microscópica de los conidios que presentan paredes muy espinulosas (Figura 7). Esta especie se aisló en ambas estaciones climáticas aunque con una frecuencia de aislamiento muy baja. Cabe considerar que *A. flavus* es una especie potencial productora de aflatoxinas, por lo que los aislamientos identificados fueron evaluados para determinar la capacidad de producción de dichos metabolitos.

Aspergillus niger

CYA, 28°C: colonias de 60mm de diámetro recubriendo toda la superficie de la placa; algodonosas. Micelio blanco; cabezuelas conidiales negras; reverso pálido.

MEA, 28°C: colonias de 30mm de diámetro. Micelio blanco; cabezas conidiales oscuras. Reverso pálido.

G25N, 28°C: colonias de 20mm de diámetro; micelio amarillo pálido

CYA, 4°C: sin crecimiento a los 7 días.

CYA, 37°C: colonias de 60mm de diámetro; algodonosas; con cabezas conidiales negras. Reverso pálido.

Para la identificación de esta especie fueron determinantes el color, la forma y el tamaño de las vesículas (Figura 8). Esta especie fue aislada en la estación invernal con una baja frecuencia de aislamiento.

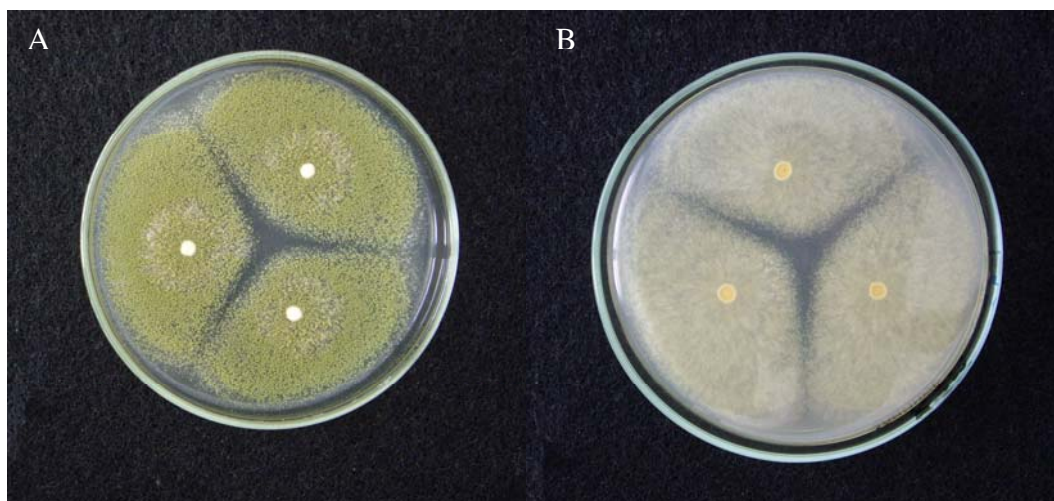


Figura 7. Colonias de *Aspergillus flavus* en MEA: A. Superficie; B: Reverso

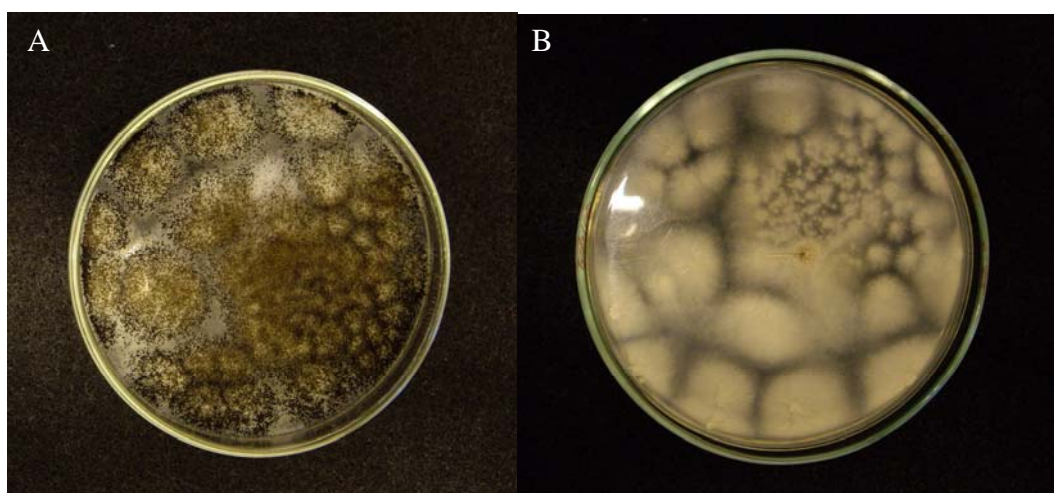


Figura 8. *Aspergillus niger* en DG18. A: Superficie; B: Reverso

Eurotium amstelodami

CYA, 28°C: colonias de 8mm de diámetro; planas; algodonosas. Micelio blanco de apariencia pulverulenta; conidios de color verde amarronado. Reverso amarronado.

MEA, 28°C: colonias de 10-11mm de diámetro; Color superior verde con cleistotecios amarillos. Reverso amarillo verdoso.

G25N, 28°C: colonias planas, algodonosas. Micelio blanco; abundante producción de conidios verdes. Reverso amarillo verdoso.

CYA, 4°C: sin crecimiento a los 7 días.

CYA, 37°C: sin crecimiento los 7 días.

Microscopía: se observaron cleistotecios inmaduros a los 7 días de incubación. Por otro lado se describieron por encima de los cleistotecios, fructificaciones asexuales compuestas por conidióforos con vesículas que sostuvieron fiálides que originaron largas cadenas de conidios. Los cleistotecios contenían ascosporas que fueron caracterizadas luego de 20 días de incubación, ya que necesitaron un largo tiempo de maduración.

La presencia de cleistotecios (Figura 9), la características de las ascosporas y estructuras asexuales con vesículas y fiálides fueron las determinantes para la identificación de esta especie que se aisló en ambas estaciones climáticas evaluadas.

NUEVO REPORTE

Eupenicillium javanicum

CYA: colonias de 47 mm de diámetro, radialmente surcadas, densas, aterciopeladas de color verde oliva y reverso claro. Abundantes cleistotecios de color marrón claro-amarillentos. Pequeños exudados de color marrón

MEA: colonias de 37 mm de diámetro. Sin surcos, de color verde oliva claro y reverso pálido. Presencia abundante de cleistotecios.

G25N colonias de 19 mm de diámetro, claras. No desarrolló a 4 °C y a 37°C formó colonias de aspecto similar a las descritas en MEA, de 10 mm de diámetro.

Microscopía: Penicilios monoverticilados con fiálides ampuliformes y conidios de forma subesferoidal. Cleistotecios característicos, abundantes, de color grisáceo brillante.

Esta especie fue reportada en carnes fermentadas o curadas, por Leistner y Ayres en 1968. No se conocen reportes en embutidos cárnicos secos o carnes curadas en la Argentina. Fue reportada como productora de xanthomegnina (Frisvad *et al.*, 1990a).



Figura 9. *Eurotium* en medio de cultivo DG18: A: Superficie ; B: Reverso

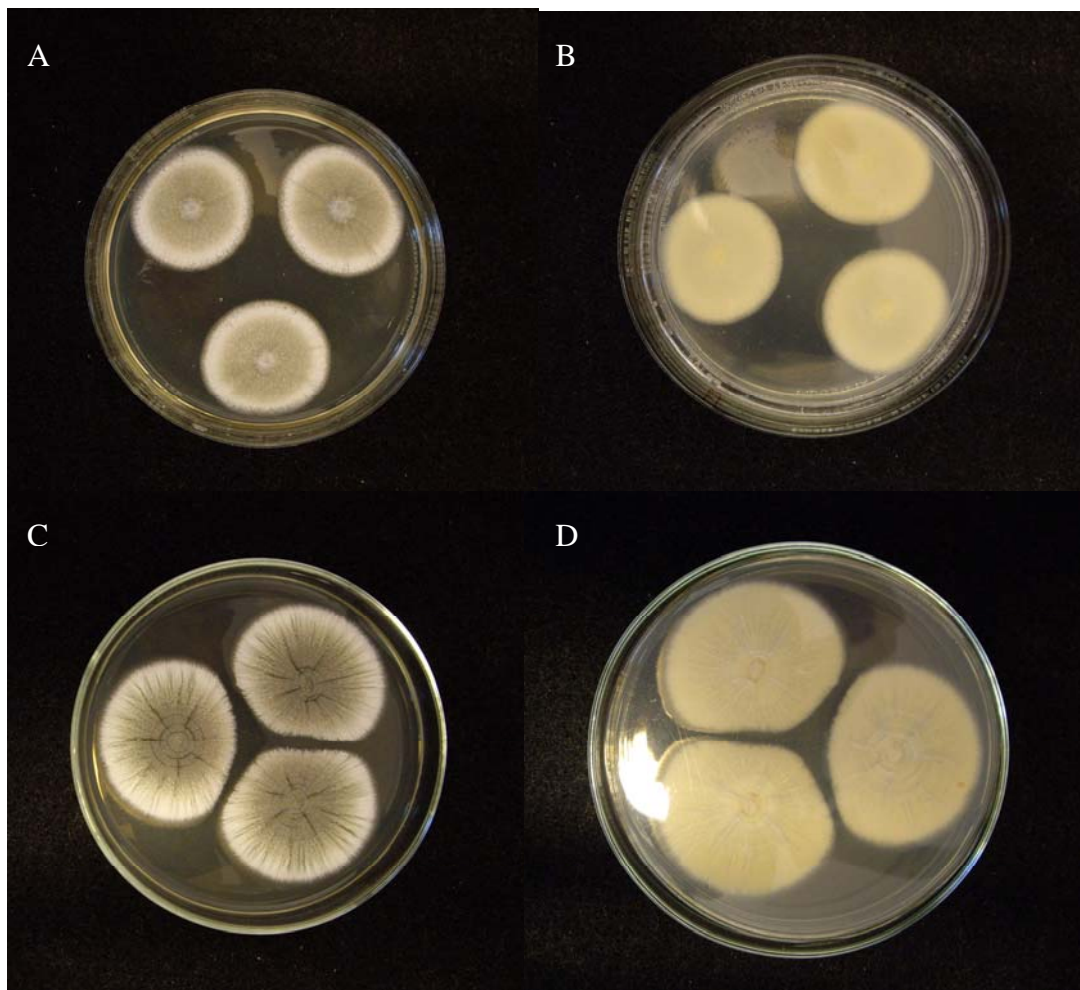


Figura 10. Colonias de *Eupenicillium javanicum* A: Superficie en MEA; B: Reverso en MEA; C: Superficie en CYA; D: Reverso en CYA

4.1.2. HONGOS FILAMENTOSOS INFERIORES

Reino: Micetes

División (Phylum): Zygomycota

Clase: Zygomycetes

Orden: Mucorales

Familia: Mucoraceae

Géneros: *Mucor* Fresen

Mucor racemosus

CYA, 28°C: colonias algodonosas que cubren rápidamente la superficie del medio de cultivo en su totalidad. Micelio blanco de apariencia pulverulenta; reverso con características similares a la superficie.

MEA, 28°C: colonias algodonosas que cubren rápidamente la superficie del medio de cultivo en su totalidad. Micelio pálido, ligeramente marrón por la formación de esporangios y clamidosporas. Reverso marrón claro.

G25N, 28°C: colonias de 15mm de diámetro, planas, con débil crecimiento.

CYA, 4°C: colonias que cubren toda la superficie del medio de cultivo en su totalidad.

CYA, 37°C: sin desarrollo a los 7 días.

Microscopía: esporangios que se disponen sobre el micelio aéreo, de color marrón. Columnella elipsoidal. Esporangiosporas hialinas, marrón claro, esféricas, de paredes lisas. Abundantes clamidosporas. La mayoría de las columnellas intactas.

Los aislamientos fueron fácilmente identificados por las características de las columnellas y la abundancia de clamidosporas. Esta especie se aisló en ambas estaciones climáticas (Figura 11).

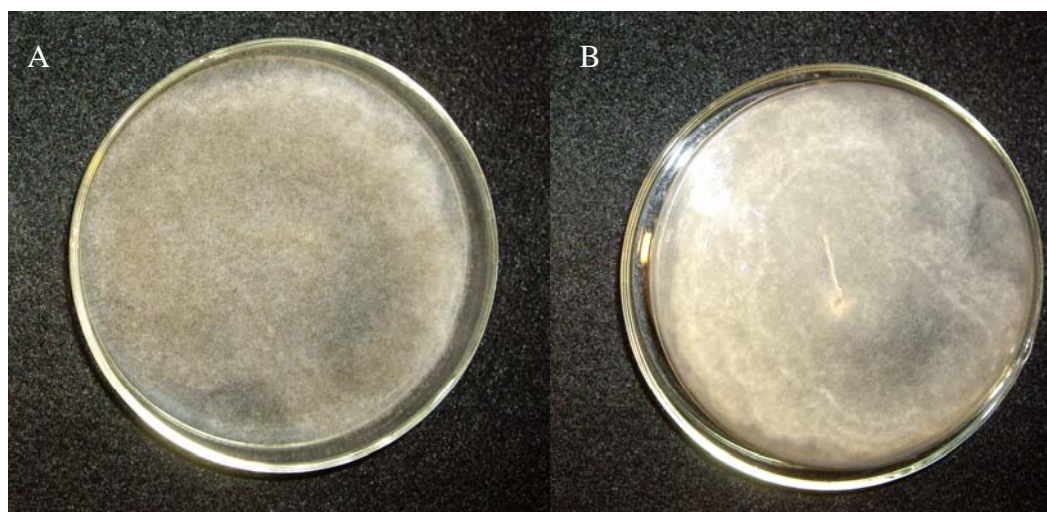


Figura 11: *Rhizopus* en DG18: A: Superficie; B: Reverso

4.1.3. LEVADURAS

Reino: Micetes

División (Phylum): Ascomycota

Clase: Saccharomycetes

Subclase: Saccharomycetidae

Orden: Saccharomycetales

Familia: Saccharomycetaceae

Géneros: *Debaryomyces* Lodder & Kreger ex Kreger

***Debaryomyces hansenii* (Zopf) Lodder & Kreger**

Anamorfo de *Candida famata* (F.C. Harrison)

MEA, 25°C: colonias de 5 mm de diámetro; circulares; de color blanco; superficie convexa y brillante, a los 3 días. Colonias de 8-9 mm de diámetro y superficie esmerilada a los 7 días de incubación.

Reino: Micetes

División (Phylum): Eumycota

Subdivisión: Deuteromycotina

Clase: Blastomycetes

Familia: Cryptococcaceae

Géneros: *Candida* Berkhout;

***Candida parapsilosis* (Ashford) Langeron & Talice**

MEA, 25°C: colonias de 5 mm de diámetro; circulares; convexas y superficie esmerilada, a 3 días de la incubación. A los 7 días, colonias de 7-7,5 mm de diámetro; blancas a crema con protuberancia central.

4.2. COMPOSICIÓN DE LA MICROBIOTA

En el muestreo de **otoño**, se caracterizaron 37 aislamientos a partir de 25 muestras recolectadas de la superficie de 6 productos cárnicos secos. Se identificaron 4 géneros de hongos filamentosos: *Penicillium*, *Eurotium*, *Aspergillus* y *Mucor* y 2 de levaduras: *Debaryomyces* y *Candida*.

Por otro lado, durante el **invierno**, se caracterizaron 79 aislamientos obtenidos de 25 muestras recolectadas de la superficie de 7 productos cárnicos secos. Se identificaron 5 géneros de hongos filamentosos, *Eupenicillium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Eurotium*, *Mucor* y 2 géneros de levaduras *Candida* y *Debaryomyces*.

La composición de la microbiota superficial de los productos embutidos secos, para la zona de estudio, se presenta en la tabla 6. Para cada estación climática estudiada, se presentan, en porcentaje, las especies correspondientes a cada uno de los géneros identificados.

Tabla 6. Composición de la microbiota superficial de embutidos cárnicos secos en elaborados en el partido de Balcarce (en % respecto de número de especies por género)

GÉNEROS	Otoño %	Invierno %
<i>Penicillium</i>	44	30
<i>Eupenicillium</i>	0	10
<i>Aspergillus</i>	11	20
<i>Eurotium</i>	11	10
<i>Mucor</i>	11	10
<i>Candida</i>	11	10
<i>Debaryomyces</i>	11	10
Nº de géneros	6	7

Como se puede observar, en el otoño, el género *Penicillium*, presentó el mayor número de especies (4) en la superficie de los embutidos. El género *Aspergillus* presentó tan solo una especie y fue recuperada de dos muestras. El resto de los géneros contribuyeron a la composición de la microbiota con una especie.

Con respecto a las levaduras, ambos géneros aislados, *Candida* y *Debaryomyces*, se recuperaron en todas las muestras analizadas.

En **invierno**, la composición de la microbiota estuvo constituida por los mismos géneros que en la estación otoñal. Sin embargo, se incorporó un género que hasta la actualidad no fue reportado en la superficie de productos cárnicos fermentados secos en la Argentina, *Eupenicillium*. Este género, caracterizado por presentar ambas fases reproductivas en el mismo momento (sexual y asexual) fue descrito en el año 1979 por Pitt (1979) y reportado por Leistner y Ayres en el año 1968 en carnes secas o curadas. Por ello fue sorprendente su hallazgo, ya que en estudios previos llevados a cabo en fábricas ubicadas en la misma zona geográfica (Castellari *et al.*, 2010) no fue reportado.

Penicillium, al igual que en el otoño, presentó el mayor número de especies (3), seguido por *Aspergillus*, donde se describieron 2 especies.

Una amplia variedad de especialidades de productos cárnicos fermentados, son elaborados en todo el mundo. Tradicionalmente, las piezas son colonizadas por la microbiota espontánea del ambiente. La composición y desarrollo de esa microbiota depende de la naturaleza del producto, de las condiciones y tiempo de maduración. Si bien son productos elaborados con diferentes protocolos y en sitios geográficos muy diferentes, las especies identificadas en general pertenecen a los géneros *Penicillium*, *Aspergillus* y *Eurotium*. La presencia de estos géneros fue reportada en distintas especialidades de embutidos cárnicos fermentados por numerosos investigadores. Andersen (1995) estudió la composición de la microbiota de embutidos fermentados e

identificó seis géneros, destacando un número importante de especies de *Penicillium*. López Díaz *et al.* (2001a) caracterizaron la microbiota de chorizo de Cantimpalos y determinó que el 70% de los aislamientos pertenecieron al género *Penicillium* y el 30% restante a especies del orden Mucorales. En Argentina, Ludemann *et al.* (2004b), Pose *et al.* (2004) y Castellari (2006) caracterizaron la microbiota espontánea que colonizó la superficie de embutidos secos y determinaron que la misma fue dominada por especies de *Penicillium*.

En el caso de productos cárnicos embutidos, como el “*salami*”, cuyo tiempo de maduración es significativamente menor al de las piezas enteras (jamones), *Penicillium* dominó la microbiota al comienzo del proceso, mientras que en etapas posteriores las especies de este género se reduce y se incrementan las especies de *Aspergillus* y *Eurotium* (Dragoni and Marino, 1979; Dragoni *et al.*, 1988).

4.2.1. LAS ESPECIES

Con respecto a la frecuencia de aislamiento de las distintas especies identificadas, en la tabla 7 , se indican las frecuencias de aislamiento de cada especie, en los dos momentos evaluados (otoño e invierno).

Tabla 7. Frecuencia de aislamiento (%) de las especies fúngicas aisladas de la superficie de productos cárnicos embutidos secos.

ESPECIES	Otoño	Invierno
<i>Penicillium verrucosum</i>	84	60
<i>P. nalgiovense biotopo 1</i>	60	80
<i>P. nalgiovense biotopo 6</i>	4	0
<i>P. chysogenum</i>	8	32
<i>Eupenicillium javanicum</i>	0	8
<i>Eurotium amstelodami</i>	56	24
<i>Mucor racemosus</i>	24	4
<i>Aspergillus flavus</i>	8	4,1
<i>A. niger</i>	0	8
<i>Debaryomyces hansenii</i>	84	100
<i>Candida parapsilosis</i>	64	100
TOTAL	9	10

Como se puede observar, las especies de *Penicillium*, presentaron junto a las levaduras la mayor frecuencia de aislamiento en las dos estaciones climáticas. En el otoño la frecuencia de aislamiento de *P. verrucosum* fue la más alta, seguida por *P. nalgiovense* biotipo 1. Con respecto a *P. nalgiovense* biotipo 6 (de esporulación blanca), es importante destacar que no fue aislada en estudios anteriores en esta fábrica (Castellari, 2006; Iraizoz *et al.*, 2009). Esta especie es habitualmente recuperada de la superficie de embutidos fermentados secos elaborados en fábricas que realizan la inoculación superficial con cepas comerciales de esta especie, (Castellari *et al.*, 2010).

Durante la estación **invernal**, se pudo apreciar un descenso en la frecuencia de aislamiento de *P. verrucosum*, cuya frecuencia se redujo de 84 a 60%. Castellari (2006) reportó para esta especie, aislada en invierno, de la superficie de productos elaborados en esta fábrica, una frecuencia de aislamiento menor en este trabajo, (38 %). En cambio, las frecuencias de aislamiento de *P. nalgiovense* biotipo 1 y de *P. chrysogenum* se incrementaron durante esta estación, constituyendo la primera de ellas, la de mayor frecuencia, entre los hongos filamentosos caracterizados.

Cabe destacar, como ya se mencionó, la presencia de *E. javanicum*, que aunque con baja frecuencia de aislamiento, no había sido reportada en estos productos en la Argentina.

Con respecto al número total de especies de hongos filamentosos, cabe indicar que estudios anteriores llevados a cabo en la estación invernal en esta misma fábrica, determinaron la presencia de 14 especies de hongos filamentosos (Castellari, 2006). Sin embargo, en este trabajo las especies de hongos filamentosos alcanzaron el número de 8. Posiblemente la estabilidad de la atmósfera en el interior de las cámaras de fermentación y maduración de la fábrica, tengan influencia en la composición de la microbiota espontánea que finalmente colonizó la superficie de los productos.

Las 2 especies de levaduras, incrementaron su frecuencia de aislamiento en el invierno, hallándose en el 100% de las muestras evaluadas.

4.2.2. CARACTERIZACIÓN DE LA MICROBIOTA POR PRODUCTO

La presencia de diferentes especies fúngicas y su frecuencia de aislamiento en los diferentes productos, elaborados en ambas estaciones climáticas evaluadas puede observarse en las tablas 8 y 9.

Tabla 8. Frecuencia de aislamiento (%) de las especies fúngicas aisladas de la superficie de productos cárnicos embutidos secos en relación al tipo de producto para la estación de otoño:

ESPECIES	Frecuencia de aislamiento (%)						
	Salame	Longaniza tipo calabresa	Chorizo seco tipo criollo	Chorizo seco tipo español	Chistorra de Navarra	Salame picado mediano	Chorizo seco tipo criollo
<i>P. verrucosum</i>	100	100	100	75	50	100	0
<i>P. nalgiovense</i> biotipo 1	100	100	100	25	25	25	100
<i>P. nalgiovense</i> biotipo 6	25	0	0	0	0	0	0
<i>A. flavus</i>	25	0	0	0	25	0	100
<i>P. chrysogenum</i>	0	25	0	0	25	0	0
<i>E. amstelodami</i>	100	100	100	50	0	0	0
<i>M. racemosus</i>	0	0	0	25	25	100	0
<i>D. hansenii</i>	100	0	100	100	100	100	100
<i>C. parapsilosis</i>	0	50	100	100	100	50	0

Tabla 9. Frecuencia de aislamiento (%) de las especies fúngicas aisladas de la superficie de productos cárnicos embutidos secos en relación al producto para la estación invernal.

ESPECIES	Frecuencia de aislamiento (%)						
	Chorizo Español	Longaniza tipo calabresa	Longaniza cantinera	Chorizo seco criollo	Chorizo tipo criollo	Chistorra de Navarra	Chorizo picado grueso
<i>E. javanicum</i>	0	25	25	0	0	0	0
<i>P. verrucosum</i>	25	50	50	100	100	100	0
<i>P. nalgiovense</i> biotipo 1	100	100	100	100	100	50	0
<i>P. chrysogenum</i>	100	0	25	0	100	25	0
<i>A. flavus</i>	25	0	0	0	0	0	0
<i>A. niger</i>	0	0	0	75	50	0	0
<i>E. amstelodami</i>	0	0	50	75	0	0	33,3
<i>M. racemosus</i>	0	0	0	0	0	25	0
<i>D. hansenii</i>	100	100	100	100	100	100	100
<i>C. parapsilosis</i>	100	100	100	100	100	100	100

En la estación otoñal, se pudo observar que el tiempo de maduración que presentaron los embutidos (que fue de entre 10 y 30 días), no tuvo influencia en las especies de *Penicillium* que colonizaron la superficie. Sin embargo, en el caso de *Eurotium*, se determinó que los productos que fueron colonizados por este género presentaron un tiempo de maduración prolongado (cercano a los 30 días).

P. nalgiovense biotipo 1 se aisló en todos los productos muestreados aunque con frecuencias diferentes que estuvieron en un rango de entre 25 y 100%. En segundo

lugar se ubicaron *P. verrucosum* y una levadura, *D. hansenii*, que se aislaron en 6 de los 7 productos evaluados. En el caso de *P. verrucosum*, su presencia es muy importante ya que como se indicó en los antecedentes de este estudio es una especie reportada como micotxigénica. En cambio, *D. hansenii*, ha sido estudiada por diferentes grupo de investigadores de todo el mundo debido a sus propiedades favorables para la maduración de embutidos, que incluyen la contribución del aroma y sabor (Martin *et al.*, 2004) y la protección del embutido por la formación junto a los hongos filamentosos de una cubierta protectora que impide la formación de bordes secos y untuosos y la desecación del producto (Lucke, 1987).

El resto de las especies se aislaron en un porcentaje que varió entre el 14% (*P. nalgivense* biotipo 6), el 41% (*P. chrysogenum*) y 57% (*E. amstelodami*). En el caso de *E. amstelodami*, cabe destacar que solamente se aisló de productos que presentaron un tiempo de elaboración prolongado (de entre 20 y 30 días). Esto fue debido posiblemente a que esta especie es descrita como xerófila (Pitt; Hocking, 1997), es decir que se adapta favorablemente a ambientes con reducida actividad de agua (*aw*), condición que se produce en embutidos madurados, donde la pérdida de humedad es importante y la fracción molar de NaCl del producto se incrementa.

Durante el invierno, *P. nalgiovense* biotipo 1 y *P. verrucosum* fueron las especies de hongos filamentosos que dominaron la composición de la microbiota en todos los productos muestreados, ya que estuvieron presentes con frecuencias de aislamientos elevadas (Tabla 9) y además en el 86% de los embutidos. Se observó también un incremento en la presencia y frecuencia de aislamiento por producto de *P. chrysogenum*, con respecto al otoño. Esta especie es productora de antibióticos del tipo B-lactámicos (Andersen; Frisvad, 1994; Castellari, 2006), metabolito secundario no deseado en los alimentos. La presencia de cepas de *P. chrysogenum* colonizando productos cárnicos fermentados elaborados en la zona de estudio fue evaluada por Castellari *et al* (2010), quienes determinaron que en 4 de 5 fábricas elaboradoras de

embutidos cárnicos, ubicadas en la región sudeste de la provincia de Buenos Aires, se caracterizaron cepas de *P. chrysogenum*, productoras de compuestos antimicrobianos del tipo B-lactámicos.

Las levaduras, por otro lado, estuvieron presente en todos los productos estudiados y con frecuencias de aislamiento de 100% para ambas especies (Tabla 9).

Todas las especies de hongos filamentosos y levaduras identificadas con excepción de *E. javanicum*, fueron reportadas por numerosos investigadores de la Argentina y otros países del mundo, donde el consumo de embutidos cárnicos secos es habitual en la dieta de los habitantes.

Las especies de *Penicillium* identificadas en este estudio, fueron reportadas por numerosos autores como constituyentes de la microbiota natural que coloniza la superficie de embutidos fermentados secos, así como también de otros productos cárnicos elaborados con piezas enteras (Castellari, 2006, Ludemann *et al.*, 2004b; Laich, Fierro and Martín 1999b).

4.2.3. ESPECIES POTENCIALMENTE MICOTOXIGÉNICAS

En este estudio se aislaron cepas de las especies *P. verrucosum*, reportada como productora de ocratoxina A y *A. flavus*, reportada como potencial productora de Aflatoxina B1 y B2. Ambas especies representaron el 20% del total de las especies identificadas en la fábrica, durante el período estudiado.

Durante el otoño *P. verrucosum* se aisló en el 86% de los productos muestreados alcanzando frecuencias del 100%, mientras que *A. flavus*, se aisló en el 42% de los productos con frecuencias de entre 25 y 100%.

Durante la estación invernal, *P. verrucosum*, si bien se aisló en el 86% de los productos muestreados, su frecuencia se redujo con respecto al número de piezas por

productos en las que se caracterizó, en el otoño. Por otro lado, *A. flavus* se aisló en un sólo tipo de embutido (14%) y con frecuencia baja (25%), debido posiblemente a las menores temperaturas presentes en el interior de las cámaras que desfavorecen la colonización de esta especie.

Para la misma fábrica, en las estaciones climáticas de primavera y verano, Iraizoz *et al.*, (2009) determinaron además de las especies anteriormente descritas, las especies *Alternaria infectoria*, *A. terreus* y *A. fumigatus*, reportadas por la bibliografía de referencia como potenciales productoras de micotoxinas, alternariol (*A. infectoria*), Aflatoxina B1 (*A. terreus*) y Ocratoxina A y Aflatoxina B1 (*A. fumigatus*). Estas especies representaron el 40% del total de especies caracterizadas en ese período evaluado (primavera-verano).

4.3. CAPACIDAD TOXIGÉNICA DE LOS AISLAMIENTOS IDENTIFICADOS COMO PRODUCTORES POTENCIALES DE MICOTOXINAS.

Se analizaron 21 aislamientos de hongos filamentosos. De ese número, 18 correspondieron a *P. verrucosum*, y 3 pertenecieron a *A. flavus*.

Para los aislamientos de *P. verrucosum*, se evaluó la presencia de Ocratoxina A, y para *A. flavus* la de Aflatoxina B1. Los resultados se muestran en la tabla 10.

Tabla 10. Evaluación de presencia / ausencia de micotoxinas en los aislamientos evaluados.

Especie	Nº aislamientos		Micotoxina	Positivas	Negativas
	Evaluados				
<i>P. verrucosum</i>	18		OTA	8	10
<i>A. flavus</i>	3		AFB1	0	3

Del total de aislamientos de *P. verrucosum* evaluados, 11 correspondieron al muestreo de otoño y siete al muestreo de invierno.

Con respecto a los aislamientos de *A. flavus*, dos fueron obtenidos en el otoño y el restante en la estación invernal.

Los resultados obtenidos determinaron que el 44% de los aislamientos evaluados para determinar la capacidad de producción de OTA, fueron positivos, mientras que en el caso de *A. flavus*, ningún aislamiento presentó la capacidad de producir Aflatoxina *in vitro*, a partir de la técnica utilizada.

Haciendo referencia a la capacidad de producción de OTA por las cepas de *P. verrucosum*, se determinó que el 27% de las mismas correspondieron a aislamientos de otoño y el 72% a los obtenidos en invierno.

A partir de los resultados obtenidos se pudo determinar que en los productos cárnicos embutidos secos, el porcentaje de cepas productoras de OTA en las estaciones invernales en Balcarce, fue inferior al reportado por la bibliografía de referencia, que indica que en general el porcentaje de cepas productoras oscila entre el 56% y el 96%. (cita Rev Iberoam 2000). Por otro lado, estudios realizados por Iraizoz *et al* (2009) en la misma fábrica elaboradora, pero en las estaciones cálidas (primera y verano) revelaron que el 90% de las cepas de *P. verrucosum* aisladas de la

superficie de productos cárnicos embutidos fermentados secos, produjeron OTA *in vitro*, detectada a partir de la técnica de TLC utilizada. Estas determinaciones coinciden con las reportadas por la bibliografía de referencia y destacan la importancia o relevancia del factor “estación climática” en la incidencia de cepas productoras de micotoxinas que colonizan estos productos.

4.4. CONSIDERACIONES FINALES

Los metabolitos secundarios (antibióticos y micotoxinas) son producidos por numerosas especies fúngicas sobre el alimento y son capaces de difundir hacia el interior del mismo (Leistner, 1984). Esto lleva a tener productos no seguros desde el punto de vista sanitario

Una extensa lista de trabajos sobre el estudio de las micotoxinas en los alimentos y su riesgo potencial en la salud humana fueron publicados. Estos metabolitos secundarios fueron identificados en productos de origen vegetal y animal. Andersen (1995), encontró que el 20% de las especies identificadas en su estudio de evolución de la microbiota en productos cárnicos embutidos fermentados en Italia, fueron micotoxigénicas. Además indicó que es de gran importancia realizar la correcta identificación de las especies con el objeto de detectar la presencia de aislamientos potencialmente productores de micotoxinas y antibióticos. En Argentina, Ludemann *et al.* (2004b) indicaron que el 51% de las especies de *Penicillium* identificadas en salamines comercializados en diferentes supermercados de la provincia de Buenos Aires, fueron reportadas como micotoxigénicas. En estudios posteriores realizados por Castellari (2006) y Castellari *et al.*, (2008) se determinó que entre el 43 y 50% de las especies fúngicas identificadas y con alta frecuencia de aislamiento, en los ambientes de las fábricas ubicadas en la zona sudeste de la provincia de Buenos Aires, eran potenciales productoras de micotoxinas.

La utilización de cultivos iniciadores permite controlar las poblaciones microbianas de los embutidos fermentados secos, evitando el desarrollo de una microbiota potencialmente micotoxigénica y que pueda otorgar un aspecto externo no deseado. Además se obtiene una producción estandarizada y de características óptimas para ser introducidas en los mercados internacionales. Numerosas especies del género *Penicillium* fueron seleccionadas para ser utilizadas como cultivos iniciadores en productos cárnicos embutidos fermentados. Una de ellas es *P. nalgiovense* biotipo 6 ya que se adapta adecuadamente a las condiciones ambientales de las fábricas. Esta especie desarrolla sobre la superficie del producto una capa blanca y uniforme, mejorando su aspecto exterior y desplazando a especies potencialmente micotoxigénicas pertenecientes a la microbiota espontánea del ambiente.

La preocupación por la presencia de micotoxinas en los alimentos fue creciendo. Es así que la legislación europea fue modificándose en los últimos años para incluir nuevos alimentos que deben ser controlados y ampliar el número de micotoxinas a detectar. Asimismo, es previsible que en algunos países aumenten las micotoxinas y alimentos para los que se establecerá un límite máximo y/o que la ausencia de microorganismos toxigénicos sea un criterio de importancia (Núñez *et al.*, 2003).

Como la exclusión total de los hongos de los productos cárnicos puede afectar la calidad y carácter del producto, el uso de cepas fúngicas no tóxicas como cultivos iniciadores es el método más apropiado para minimizar los riesgos sanitarios debidos al desarrollo de hongos micotoxigénicos (Núñez *et al.*, 1996). Por tal motivo es de esperar que en un futuro la legislación requiera la utilización de cepas bien caracterizadas y no productoras de micotoxinas.

5. CONCLUSIONES

La hipótesis propuesta en el presente estudio “Sobre la superficie de productos cárnicos embutidos secos elaborados en Balcarce, se desarrollan cepas pertenecientes a los géneros *Penicillium* y *Aspergillus* que tienen la capacidad de producir micotoxinas ” se acepta.

1. *Penicillium* es el género aislado con mayor frecuencia a partir de la microbiota superficial de los embutidos fermentados secos.
2. *Penicillium nalgiovense* biotipo 1 y *P. verrucosum* son las especies aisladas con mayor frecuencia
3. El género *Eurotium* se detectó con mayor frecuencia en otoño.
4. El género *Aspergillus* se aisló en ambas estaciones climatológicas con baja frecuencia.
5. Se identificó *Eupenicillium javanicum*, una especie que no fue reportada en productos cárnicos en Argentina.
6. Las levaduras se aislaron con alta frecuencia que alcanzó el 100% en el invierno en todos los productos.
7. El 44,4% de los aislamientos de *P. verrucosum* evaluados resultaron positivos para la micotoxina ocratoxina A.

8. El 100% de los aislamientos de *A. flavus* resultaron negativos para la presencia de Aflatoxina.

BIBLIOGRAFÍA

- ABARCA, ML. 1997. Unexpected mycotoxin production in *Aspergillus* species. Abstracts of the Third International Workshop on *Penicillium* and *Aspergillus*. Baarn, 1997
- ANDERSEN, S.J. 1995. Compositional Changes in surface mycoflora during ripening of naturally fermented sausages. *Journal of Food Protection*. 58: 426-429.
- ANDERSEN, S.J.; FRISVAD, J.C. 1994. Penicillin production by *Penicillium nalgiovense*. *Letters Applied Microbiology*. 19: 486-488.
- CASTELLARI C,. 2006. Caracterización de la microbiota superficial de productos cárnicos embutidos secos y selección de cepas fúngicas para la elaboración de cultivos iniciadores. Tesis de *Magister Scientiae*. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Mar del Plata. Argentina. 270 p.
- CASTELLARI, C.; Laich, F.; Quadrelli, A.M. 2010. Surface mycobiota on argentinian dry fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology*. En prensa.
- CASTELLARI C; Quadrelli AM y Laich FS. 2008. Especies fúngicas micotoxigénicas en la superficie de productos cárnicos embutidos secos. 6º Congreso latinoamericano de Micología. Mar del Plata.
- COKER, R.D. 1997. Mycotoxins and their control. Constraints and opportunities. NRI Bulletin 73. Chatham Reino Unido. Natural Resources Institute
- DAUN, H. 1979. Interaction of wood smoke components and foods. *Food Technology*. 33: 66-71.
- DRAGONI, I.; MARINO, C. 1979. Description and classification of *Penicillium* species isolated from raw ripened sausages. *Archivos Veterinaria Italia*. 30: 142-176.
- DRAGONI, I.; MARINO, C.; CANTONI, C. 1988. Moulds on smoked bacon. *Industrie Alimentarie*. 27: 353-355.
- FAO/WHO/UNEP .1977. Conferencia mixta sobre micotoxinas. Nairobi. Kenia
- FILTENBORG, O.; FRISVAD, J.C.; THRANE. 1996. Moulds in food spoilage. *International Journal of Food Microbiology*. 33:85-102.
- FILTENBORG, O.;FRISVAD, J.C. 1980. A simple screening method for toxigenic moulds in pure cultures. *Lebensm. Wiss. Technology*. 13: 128-130.
- FILTENBORG, O.; FRISVAD, J.C; SVENDSEN, J. 1983. Simple screening method for molds producing intracellular mycotoxins in pure cultures. *Applied Environmental Microbiology*. 45: 581-585.
- FONTANA, C. ; COCCONCELLI, P.S. ; VIGNOLO, G. 2005. Monitoring the bacterial population dynamics during fermentation of artisanal Argentinian sausages. *International Journal of Food Microbiology*. 103: 131-142.

- FISCHER, G.; MÜLLER, T.; SCHWALBE, R.; OSTROWSKI, R.; DOTT, W. 2000. Exposure to airborne fungi., MVOC and mycotoxins in biowaste-handling facilities. *International Journal Hyg. Environmental Health.* 203: 97-104.
- FRISVAD, J.C.; FILTENBORG, O. 1990. Secondary metabolites as consistent criteria in *Penicillium* taxonomy and synoptic key to *Penicillium* subgenus *Penicillium*. In Samson, R.A. and PITT, J.I. eds. *Modern concepts in Penicillium and Aspergillus classification.* Plenum, New York. pp. 373-384.
- FRISVAD, J.C.; SAMSON, R.A.; STOLK, A.C. 1990. Chemotaxonomy of *Eupenicillium javanicum* and related species. In *Modern Concepts in Penicillium and Aspergillus Classification* eds RA. Samson and Pitt. New York: Plenum Press. Pp 445-453.
- FRISVAD, J.C.; THRANE, U. 1995. Mycotoxin production by food-borne fungi. In Samson R.A., Hoekstra E.S., Frisvad and Filtenborg J.C. , eds. *Introduction to food-borne fungi.* Baarn, Delft: Centraalbureau Voor Schimmelcultures. pp. 251-260.
- GEISEN, R.; LÜCKE, F.K.; KRÖKEL, L. 1991. Starter –und Schutz- kulturen für Fleisch und Fleischerzeugnisse. *Fleischwirtschaft* 71: 969-981.
- GRAZIA, L.; ROMANO, D.; BAGNI, D.; ROGGIANI, D.; GUGLIELMI, G. 1986. The role of molds in the ripening process of salami. *Food Microbiology.* 3: 19-25.
- GREENMAN, D.L., Boyd, P.A., Mehta, R.G. y Wittliff, J.L. 1976. 3rd Annu. NCTR Hormones Res. Prog. Little Rock, Arkansas. sn
- HAMMES, W.P.; BOSCH, I.; WOLF, G. 1995. Contribution of *Staphylococcus carnosus* and *Staphylococcus piscifermentans* to the fermentation of protein foods. *Journal Applied Bacteriology Symp.(Suppl.)* 79: 76S-83S.
- HESELTINE, C.W.; WANG, H.L. 1967. Traditional fermented foods. *Biotechnology Bioengener.* 9: 275-288.
- INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. 1996. *Microorganismos de los alimentos. Características de los patógenos microbianos.* Acribia. Zaragoza. 520 p.
- IARC Monographs 1993, Vol.56, Lyon, Francia. 245-252
- IRAIZOZ, L.; CASTELLARI, C.; QUADRELLI, A.M. 2009. Micobiota toxigénica en productos cárnicos embutidos secos. XII Congreso de Ciencia y tecnología de los Alimentos, Concordia, Entre Ríos.
- JIRKOVSKY, M.; GALGÓCZY, J. 1966. Die untersuchung der schimmelpilflora der ungarischen Wintersalami. *Fleischwirtschaft* 46: 128.
- KROGH, P. 1978. Causal associations of mycotoxic nephropathy. *Acta Pathol. Microbiol. Scandinavica, Sect. A Supplement.* 269: 1-28.
- LAICH, F.S., FIERRO, F.; MARTIN, J.F. 1999. Changes in surface mycoflora during ripening of cured meat cecina. 13th Congress of European Mycologists. Alcalá de Henares. España.

- LEISTNER, L. 1984. Toxinogenic penicillia occurring in feeds and foods: a review. *Food Technology Australian*. 36: 404-406.
- LEISTNER L.; AYRES, J.C. 1968. Molds and meats. *Fleischwirtschaft* 48: 62- 65.
- LEISTNER, L.; ECKARDT, C. 1979. Vorkommen toxinogener Penicillien bei Fleischerzeugnissen. *Fleischwirtschaft* 59: 1892-1896.
- LEISTNER, L.; ECKARDT, C. 1981. Schimmelpilze und mykotoxine in Fleisch und Fleischerzeugnissen. In: Reiss, J. ed. *Mykotoxine in Lebensmitteln*. Verlag. Stuttgart. Germany. pp. 297-341.
- LEISTNER, L. and PITT, J.I. 1977. Miscellaneous *Penicillium* toxins. In Rodricks, J.V., Hesseltine, C.W. and Mehlmann, M.A., eds. *Mycotoxins in Human and Animal Health*. Pathotox Publishers. Illinois. pp. 639-653.
- LÓPEZ-DÍAZ, T.M., ROMAN-BLANCO, C., GARCÍA-ARIAS, M.T., GARCÍA-FERNANDEZ, M.C. and GARCÍA LÓPEZ, M.L. 1996. Mycotoxins in two spanish cheese varieties. *International Journal of Food Microbiology*. 30: 391-395.
- LÓPEZ-DÍAZ, T.M., SANTOS, J.A., GARCÍA-LÓPEZ, M.L. and OTERO, A. 2001. Surface mycoflora of a spanish fermented meta sausage and toxigenicity of *Penicillium* isolates. *International Journal of Food Microbiology*. 68: 69-74.
- LUDEMANN, V.; POSE, G.; POLLIO, M.L.; SEGURA, J. 2004. Surface mycoflora of Argentinean dry fermented sausages and toxigenicity of *Penicillium* isolates. *International Journal of Food Technology*. 2: 288-292.
- LÜCKE, F.K. 1987. Procesos microbiológicos en la elaboración de embutidos secos y jamones crudos. *Fleischwirtschaft* 2: 39-46.
- MATEO, J.; ZUMALACÁRREGUI, J.M. 1996. Volatile compounds in chorizo and their changes during ripening. *Meat Science*. 44: 255-273.
- MILLER, J.D. 1995. Fungi and mycotoxins in grain: implications for stored product research. *Journal of Stored Products Research*. 31:1-16.
- MILLER, J.D. 1991. Significance of mycotoxins for health and nutrition. In: Champ, B.R., Highley, E., Hocking, A.D. and Pitt, J.I. eds. *Fungi and Mycotoxins in stored products*. ACIAR proceedings 36. Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra. pp. 126-135.
- MIROCHA, C.J.; Christensen, C.M. 1974 Oestrogenic mycotoxins synthesized by *Fusarium*. En: Purchase (ed), *Mycotoxins*. Elsevier Scientific Publ. Co., Amsterdam pp.129-148.
- MOSSEL, D.A.; MORENO GARCÍA, B. 1985. *Microbiología de los Alimentos*. Acribia. Zaragoza España 284 p.

- MOTILVA CASADO, M.J.; DÍAZ BORRAS, M.A.; VILA AGUILAR, M. 1991. Fungal flora present on the surface of cured Spanish ham. Methodological study for its isolation and identification. *Fleischwirtsch* 71: 1300-1302.
- NUÑEZ, F.; RODRIGUEZ, M.M.; BERMÚDEZ, M.E.; CÓRDOBA, J.J.; ASENSIO, M.A. 1996. Composition and toxigenic potential of the mould population on dry-cured Iberian ham. *International Journal of Food Microbiology*. 32: 185-197.
- ORDÓÑEZ, J.A.; HIERRO, E.M.; BRUNA, J.M.; DE LA HOZ, L. 1999. Changes in the components of dry-fermented sausages during ripening. *Food Science Nutrition*. 39: 329-367.
- PESTKA, J.J.; BONDY, G.S. 1994. Immunotoxic effects of mycotoxins. In: Miller, J.D. and Trenholm eds. *Mycotoxins in grain. Compounds other than Aflatoxin*. Eagan Press. St.Paul. pp. 339-358.
- PITT, J.I. 1996. What are mycotoxins. *Australian Mycotoxins newsletter*. 7:1.
- PITT, J.I. 1987. *Penicillium viridicatum*, *Penicillium verrucosum* and production of ochratoxin A. *Applied Environmental Microbiology*. 53:266-269
- PITT, J.I. 1979. The genus *Penicillium* and its Teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*. London Academic Press.
- PITT, J.I.; HOCKING, A.D. 1997. *Fungi and food spoilage*. UK Blackie Academic & Professional. London. 593p.
- POSE, G.; LUDEMANN, V.; POLLIO, M.L.; SEGURA, J. 2004. Micoflora autóctona de la superficie de embutidos secos fermentados. *Mundo lácteo y cárnico* 4:12-14.
- PURCHASE, I. F. H. (1974). *Mycotoxins*. Elsevier. pp.1-28.
- RABIE, C.J.; LÜBBEN, A.; SCHIPPER, M.A.; VAN HEERDEN, F.R.; FINCHAM, J.E. 1985. Toxigenicity of *Rhizopus* species. *International Journal of Food Microbiology*. 1: 263-270.
- RODRIGUEZ, M.; NUÑEZ, F.; CORDOBA, J.J.; SANABRIA, C.; BERMUDEZ, E.; ASENSIO, M.A. 1994. Characterization of *Staphylococcus spp.* and *Micrococcus spp.* isolated from Iberian ham throughout the ripening process. *International Journal of Food Microbiology*. 24: 329-335.
- SELGAS, D.M.; ORDOÑEZ, J.A.; SANZ, B. 1986. Selection of micrococci strains for their use as starter culture for dry fermented sausages. *Proceedings of the 32th European Meat Research Workers*, Gent.
- STOB, M.; BALDWIN, R.S.; TUIITE, J.; ANDREWS, F.N.; GILLETE, K.G. (1962) Isolation of an anabolic, uterotrophic compound from corn infected with *Gibberella zeae*. *Nature*. 196:1318.
- SZEBIOTKO, K. 1981. *Micotoxins in cereal grain. Part 1. Ochratoxin, citrinin, sterigmatocystin, penicillic acid and toxigenic fungi in cereal grain*. *Die Nahrung*. 25:415-421.

- UENO, Y. 1991. Use of monoclonal antibodies, enzymelinked inmunosorbent assay and inmunoaffinity column chromatography to determine ochratoxin A in porcine sera, coffe products and toxin-producing fungi. Mycotoxins, endemic nephropathy and urinary tract tumours. Lyon, IARC Sci. Publ.No. 115: 71-75.
- VARNAM, A.; SUTHERLAND, J.P. 1998. Carne y productos cárnicos. Tecnología, química y microbiología. Acribia. Zaragoza. 423 p.
- VANEGAS FORNIAS, O.; VALLADARES DÍAZ, C. 1999. Clasificación de los productos cárnicos. Rev. Cubana Alimentaria Nutrición. 13: 63-67.
- VAN EGMOND, H.P. 1989. Aflatoxin M1: ocurrence, toxicity, regulation, in micotoxins in dairy products. Van Egmond (Ed) Elsevier Applied Science, London an New York. Cap. 2, p 11-55.

