

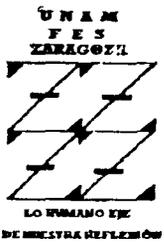


UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "ZARAGOZA"

"EFECTOS DE LA ACTIVIDAD DEL AGUA, LA LEUCINA Y LA TIAMINA EN LA PRODUCCION DE VOLATILES POR CERATOCYSTIS FIMBRIATA"

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
MARIA DEL ROSARIO JIMENEZ HERNANDEZ



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

MEXICO, D. F.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradesco...

A Dios,

Por la esperanza que nunca se apaga en mi corazón.

A mis padres,

Por la bondad y fortaleza con la que me educaron, por todo el amor y paciencia que me otorgan día a día, gracias, LOS ADORO.

A mis hermanos, Carmen, Araceli, Raúl y Daniel

Siempre aprendí de ustedes, me fascinaron con sus historias y aún no terminé de conocerlos. Gracias por todas las aventuras que hemos compartido.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

A David,

Porque todo el amor que nos une me hace
inmensamente feliz, y porque la comprensión
y la confianza nunca se pagan.

A mi gran amiga Leonora

Después de tanto... su paciencia brindó frutos,
gracias.

El tiempo lleva las cosas aquellas tal como lo hace
el viento, empero, viajando aquél regresa otra vez
con cosas nuevas; para entonces nuestros corazones
se llenan de pensamientos
Mitología chiapaneca

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Índice	2
Símbolos y abreviaturas	3
Introducción	4
Fundamentación teórica	6
Planteamiento del problema.	22
Objetivos.	23
Hipótesis.	24
Material y métodos.	25
Resultados	32
Análisis de resultados	56
Conclusiones	60
Sugerencias	61
Apéndice I -Aromas y umbrales de olor-	62
Apéndice II -Características de volátiles-.	64
Apéndice III -Ceratocystis fimbriata-	71
Apéndice IV -Información cromatográfica-.	85
Referencias bibliográficas	92

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Aw	Actividad de agua o actividad acuosa
<u>C. fimbriata</u>	<u>Ceratocystis fimbriata</u>
g/L	Gramos por litro
mg/L	Miligramos por litro
M.E.	Medio de cultivo estándar
M+L	Medio de cultivo estándar más leucina
M+T	Medio de cultivo estándar más tiamina
TTP	Tiamina pirofosfato (forma enzimática de la bitamina B ₁)
PDA	Agar dextrosa y papa
μm	Micrometros (1*10 ⁻⁹ m)

Las sustancias fragantes son compuestos orgánicos con un aroma penetrante y generalmente agradable. Estos compuestos se emplean en la industria alimentaria y farmacéutica con el fin de conferir o reforzar un aroma y/o sabor.

La mayor parte de los compuestos del aroma se obtienen por síntesis química o por extracción en plantas. Los problemas con los procesos químicos de síntesis son la purificación, la formación de mezclas racémicas y que algunos consumidores son cada vez más reacios al uso de sustancias químicas sintéticas añadidas a sus alimentos, cosméticos y medicamentos.

Los microorganismos juegan un papel muy importante en la producción de compuestos aromáticos en una gran variedad de productos alimenticios, el hombre ha sacado provecho de ellos durante siglos para mejorar la calidad de sus alimentos.

La mayor parte de los microorganismos productores de aromas son hongos, y de éstos, el género *Ceratocystis*, es un buen ejemplo. *Ceratocystis fimbriata* se caracteriza por su capacidad para sintetizar aromas frutales. La modificación de los parámetros de cultivo puede mejorar la producción de volátiles.¹ Los parámetros modificados en el presente trabajo fueron la composición del medio y la disponibilidad de agua en el medio.

Debido a que *Ceratocystis fimbriata* es un hongo que carece de tiamina y ésta es necesaria para la formación del peritecio²³ se complementó al medio estándar con 0.15 milimoles de tiamina/L.

La ruta metabólica para la formación de alcohol isoamílico tiene como precursor a la leucina. Se estudió el efecto de la adición de leucina al medio no solo para la producción del alcohol isoamílico sino para determinar su influencia en los demás volátiles.

El agua juega un papel central en los componentes celulares, actúa como disolvente, determina la estructura de las proteínas, ácidos nucleicos y membranas.²⁶ La actividad del agua (A_w) es un parámetro que mide la disponibilidad de agua de un determinado medio y su transferencia a través de membranas semipermeables. Su valor oscila entre 0 y 1.^{29 y 32}

Al adicionar un agente tensionante al medio de cultivo, etilenglicol por ejemplo, es posible hacer estudios con diferentes valores de A_w .³³

En diversos estudios con hongos y levaduras se ha demostrado el efecto positivo de la A_w en la producción de metabolitos, por ejemplo *Trichoderma viride* aumenta su producción de aroma a queso en un 300% cuando disminuye la A_w del medio externo.

33

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Sporidiobolus salmonicolor aumenta en un 80% la producción de compuestos aromáticos de bajo peso molecular. ³⁴

Con base a lo anterior se planteó la formulación de un medio de cultivo óptimo. Se evaluaron diferentes medios; medio estándar, medio más leucina y medio más tiamina.

Se evaluó la influencia de la A_w en cada medio y se determinó que existe una interacción compleja entre la actividad acuosa y el medio de cultivo.

La $A_w=0.99$ favoreció la producción de volátiles en el medio más tiamina y la adición de un nutriente extra al medio de cultivo estándar incrementa la producción de compuestos del aroma.

AROMAS

El término, aroma incluye a las sustancias químicas que huelen y saben. El aroma es ante todo una percepción lo que hace difícil su descripción, ya que cada individuo reacciona de forma individual.

La sensación del aroma se desencadena por mezclas muy complejas de moléculas pequeñas, volátiles, de diversa naturaleza química que están presentes en concentraciones muy bajas y se detectan por células receptoras del epitelio olfatorio de la cavidad nasal. Los mensajeros químicos no volátiles del sentido del sabor interaccionan con los receptores de la lengua e imparten cuatro impresiones básicas: dulce, amargo, salado y ácido. Los principios pungente, frío y caliente, también se perciben dentro de la cavidad oral, pero se transmiten al cerebro por neuronas no específicas.¹

Los compuestos del aroma son sustancias de gran impacto en las industrias alimentaria y de fragancias. La creciente demanda de aromas y fragancias naturales a intensificado la investigación para producirlas en procesos biotecnológicos.²

Las sustancias fragantes son compuestos orgánicos con un aroma penetrante y generalmente agradable. Estos compuestos se emplean en perfumes, productos perfumados y en saborizantes de alimentos y bebidas.³

La imitación y formulación de aromas ha sido desde siempre de sumo interés para el hombre que ha adicionado aromatizantes naturales y/o sintéticos a los alimentos con el fin de conferir, reforzar o acentuar su aroma y sabor.

La obtención de aromatizantes naturales se realiza mediante métodos físicos, químicos, microbiológicos o enzimáticos, a partir de materias primas aromatizantes naturales. Se entiende por materias primas aromatizantes los productos de origen animal o vegetal normalmente utilizados en la alimentación humana, que contengan sustancias odoríferas y/o sápidas, ya sea en su estado natural o después de un tratamiento adecuado (tal como destilación, cocción, fermentación, enriquecimiento, enzimático, etc.).⁴

Los aromas frutales son el campo más importante en cuanto a la imitación del olor y sabor. Antiguamente la obtención de aromas frutales era pobre y estaba limitado a la obtención de aceites esenciales, que además de requerir un tiempo prolongado para su obtención estaba sujeto a factores ambientales.⁵

Tradicionalmente, el crecimiento microbiano ha añadido aromas deseables a una gran cantidad de alimentos y bebidas: los productos lácteos y bebidas alcohólicas son ejemplos importantes. Diversos compuestos aromatizantes o intensificadores del sabor, extraídos de células microbianas, se utilizan con profusión en la actualidad en la industria alimentaria.⁶

BIOTECNOLOGÍA

El Convenio sobre la Diversidad Biológica (CDB) define la biotecnología como: "*Toda aplicación tecnológica que utilice sistemas biológicos y organismos vivos o sus derivados para la creación o modificación de productos o procesos para usos específicos*".⁷

En términos generales biotecnología es el uso de organismos vivos o de compuestos obtenidos de organismos vivos para obtener productos de valor comercial.⁸ Como tal, la biotecnología ha sido utilizada por el hombre desde los comienzos de la historia en procesos como la producción de cerveza, vino, queso y yogurt que implican el uso de bacterias o levaduras con el fin de convertir un producto natural como leche o jugo de uvas, en un producto de fermentación más apetecible, el yogurt o el vino.⁹ Tradicionalmente la biotecnología tiene muchas aplicaciones. Un ejemplo sencillo es el compostaje, el cual aumenta la fertilidad del suelo permitiendo que microorganismos del suelo descompongan residuos orgánicos.¹⁰

La biotecnología se aplica actualmente en sectores tan diversos como la salud animal y humana, agroalimentación, suministros industriales, producción de energía y protección del medio ambiente. Los principales productos en el mercado son antibióticos y péptidos de interés terapéutico, aditivos alimentarios (aromas, saborizante, colorantes, aminoácidos esenciales, etc.).¹¹

Dentro de los suministros industriales, el desarrollo de las técnicas de fermentación, la utilización y diseño de nuevos biorreactores, conjuntamente con las técnicas de ingeniería genética, han permitido la obtención de productos de gran interés económico para la industria alimentaria, química y farmacéutica, cuya

preparación por síntesis química es más costosa y menos limpia desde el punto de vista medioambiental.¹²

La biotecnología permite resolver los viejos problemas de los alimentos fermentados a través de la modificación genética de los microorganismos que intervienen en la fermentación, por ejemplo; introduciendo genes que mejoren el aroma (como los de *Aspergillus* y *Trichoderma* con enzimas que liberan terpenos que confieren el sabor afrutado); los derivados lácteos (leche ácida, quesos, yogurt, mantequilla, kéfir, etc.) y muchos otros alimentos fermentados (salami, salchichas Frankfurt, cerdo curado, aceitunas verdes, el chucrut, los encurtidos, etc.) se producen gracias a las bacterias lácticas. Estos microorganismos, a la vez que producen el alimento, contribuyen a incrementar el aroma, la textura y el valor nutritivo del mismo e incluso en muchas ocasiones conservan su calidad o pueden mejorar la salud del consumidor. Todas estas características son objeto de mejora por parte de la Biotecnología. ^{8,9 y 13}

La agricultura se enfrenta a tres problemas: alimentación y desarrollo; alimentación y población; alimentación y territorio. El equilibrio alimentario es precario, a pesar de que la agricultura ha experimentado, a lo largo de su historia, cambios muy profundos que han permitido su éxito, acelerando el ritmo para adaptarse al paso de las exigencias. En este terreno, las razones de los desequilibrios radican principalmente en cuestiones geopolíticas, las cuales residen generalmente en las relaciones conflictivas entre países productores y consumidores. Después del período de la agricultura "extensiva", caracterizado por el predominio de la química y la mecanización, se abre el período de la biotecnología. La mejora de las características organolépticas y nutricionales de los alimentos mediante procesos definidos ha sido sin duda el mayor aporte de la biotecnología moderna. ^{8,14}

Las levaduras y los hongos filamentosos juegan un papel importante en diversos procesos industriales. En la industria alimentaria (se emplean en la producción de pan, bebidas alcohólicas y quesos), en la industria química (emplea los hongos filamentosos debido a su habilidad para sintetizar ácidos orgánicos, vitaminas, hormonas, etc.), en la industria farmacéutica (en producción de antibióticos como la penicilina producida por *Penicillium chrysogenum* y *Penicillium notatum*). ¹⁵

Ceratocystis fimbriata

Nombre científico	<i>Ceratocystis fimbriata</i> Ellis & Halsted
División	Eumycota
Subdivisión	Ascomicotina
Clase	Pirenomicetos
Orden	Microascales
Familia	Ofiostomataceas
Género	<u><i>Ceratocystis</i></u>
Especie	<u><i>fimbriata</i></u>
Clave	CBS 374-83 (Ellis & Halsted)

Cuadro 1. Taxonomía y nomenclatura, ver apéndice III.

Recordando que los aromas frutales son el campo más importante en cuanto a la imitación del olor y sabor *Ceratocystis fimbriata* toma gran interés por ser un hongo filamentoso con capacidad de sintetizar aromas frutales dentro de un medio de cultivo adecuado (ver cuadros 2 y 3).¹⁶

Fuente de carbono	Aroma
Dextrosa	Plátano
Galactosa	Cítricos
Glicerol	Pera enlatada, nuez
Etanol	Naranja
Almidón de maíz	Melón y plátano

Cuadro 2. Aromas obtenidos con *C. fimbriata* con diferentes fuentes de carbono.

Fuente de nitrógeno	Aroma
Urea	Plátano
Leucina	Plátano maduro
Glicina	Piña
Metionina	Manzana

Cuadro 3. Aromas obtenidos con *C. fimbriata* con diferentes fuentes de nitrógeno.

De acuerdo con el medio de cultivo empleado para ésta tesis *Ceratocystis fimbriata* sintetiza compuestos del aroma a plátano, **cuadro 4**.

Grupo funcional	Compuesto del aroma
Alcoholes $R-OH$	Amílico Butanol Etanol Isoamílico Isopropanol Isobutanol
Ésteres $R-\overset{O}{\parallel}C-OR$	Acetato de etilo Acetato de butilo Acetato de isoamilo Propionato de etilo Butirato de etilo
Cetonas $R-\overset{O}{\parallel}C-R$	2-propanona Diacetilo
Aldehídos $R-\overset{O}{\parallel}C-H$	Acetaldehído

Cuadro 4. Principales compuestos del aroma a plátano producidos por *C. fimbriata*.

En los apéndices I y II se describen umbrales de olor y características de los volátiles más significativos que componen este aroma.

METABOLISMO

La característica principal de los organismos vivos es su capacidad para organizar moléculas y reacciones químicas en estructuras específicas y en secuencias sistemáticas. La expresión final de esta organización es la capacidad que tiene un organismo vivo de hacer réplicas de si mismo.

El término metabolismo se utiliza para aludir a todos los procesos químicos que tienen lugar dentro de una célula. Podemos considerar a una célula como una entidad que cambia continuamente al tiempo que realiza sus procesos vitales. Todas las moléculas biológicas se sintetizan a partir de los mismos compuestos, ocurriendo la síntesis y la degradación a través de secuencias de cambios químicos de alcance limitado y siguiendo reglas precisas.¹⁷

En los cultivos de laboratorio los carbohidratos se utilizan frecuentemente como fuente de energía para los microorganismos.¹⁸

GLUCÓLISIS

La glucólisis es el principio de las rutas metabólicas tanto respiratorias como fermentativas. A partir de la lisis de los hidratos de carbono se obtiene la llave intermedia que es el piruvato y el balance energético es un beneficio neto de dos moléculas de ATP por molécula de glucosa (*figura 1*).^{19 y 20}

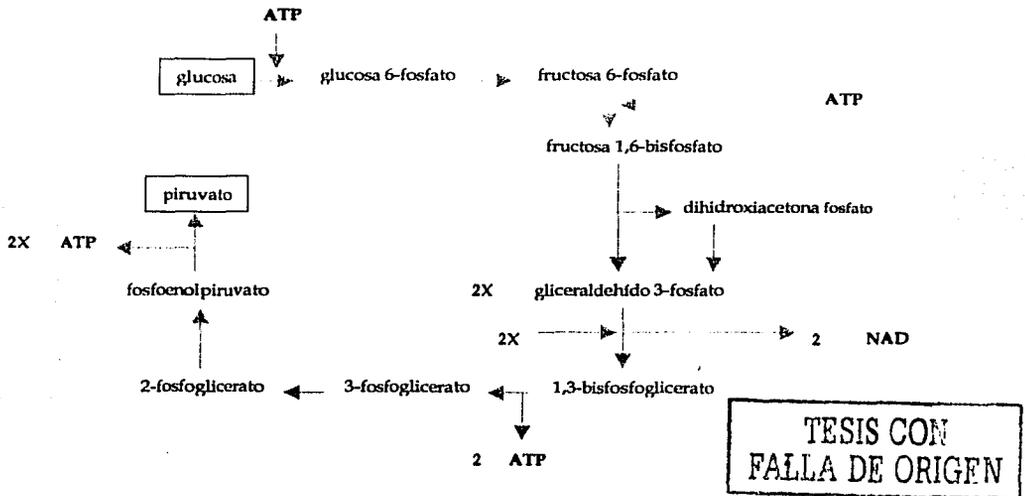
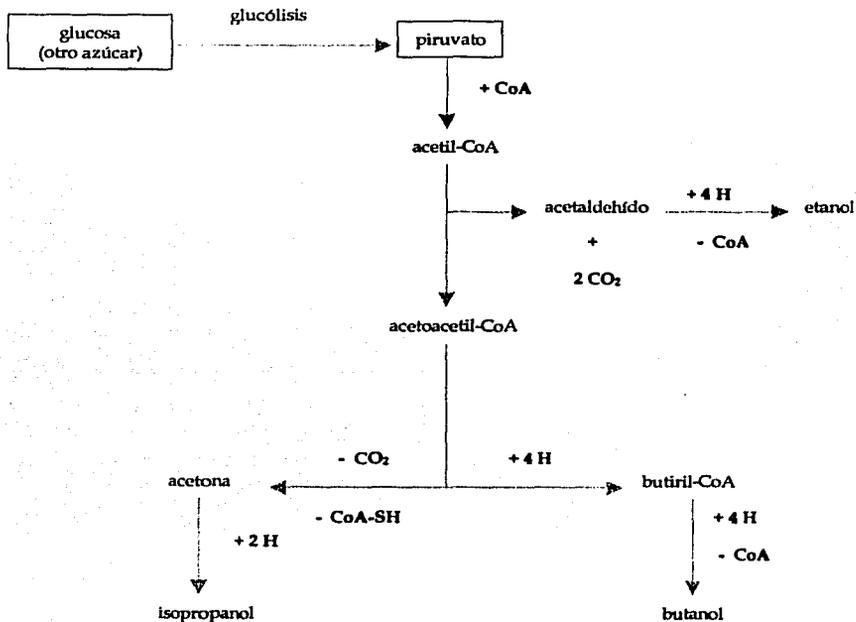


Figura 1. Glucólisis, un azúcar de seis carbonos es transformado en piruvato con la ganancia neta de dos moléculas de ATP.

FERMENTACIÓN

El proceso por el cual el piruvato es metabolizado en ausencia de oxígeno se denomina fermentación. En las fermentaciones, la glucólisis es la fuente principal de ATP de la célula. Las moléculas de piruvato permanecen en el citosol son transformadas en acetaldehído, CO_2 , etanol, acetona, isopropanol y butanol, las condiciones de reacción influyen en los productos finales *ver figura 2.* 18-20



**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Figura 2. El piruvato es empleado en la síntesis de varios compuestos, se muestran algunas rutas posibles y los siguientes productos de interés acetaldehído, etanol, acetona, isopropanol y butanol.

FUSEL

A partir de nitrógeno orgánico algunos microorganismos pueden sintetizar alcoholes. A estos alcoholes se les denomina fusel. Su obtención es a partir de la desaminación de aminoácidos, *figura 3*.

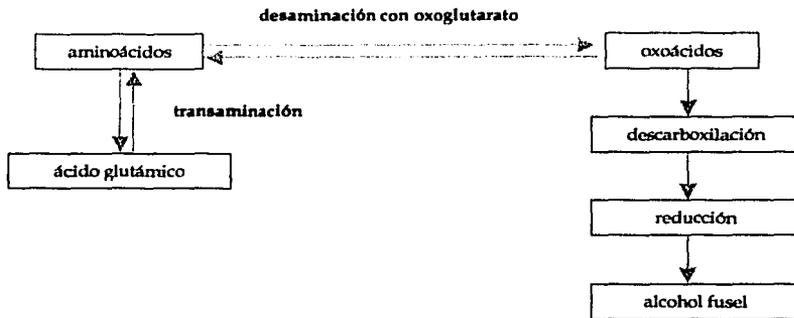


Figura 3. Formación de alcoholes de fusel.

Leucina y alcohol isoamílico

La leucina como sustrato es empleada por las levaduras como precursor del alcohol isoamílico. La transaminación, descaboxilación y finalmente la deshidrogenación del fragmento carbonado de la leucina forma el alcohol isoamílico. La serie de reacciones que se efectúan se muestran a continuación en la *figura 4*.^{21y 22}

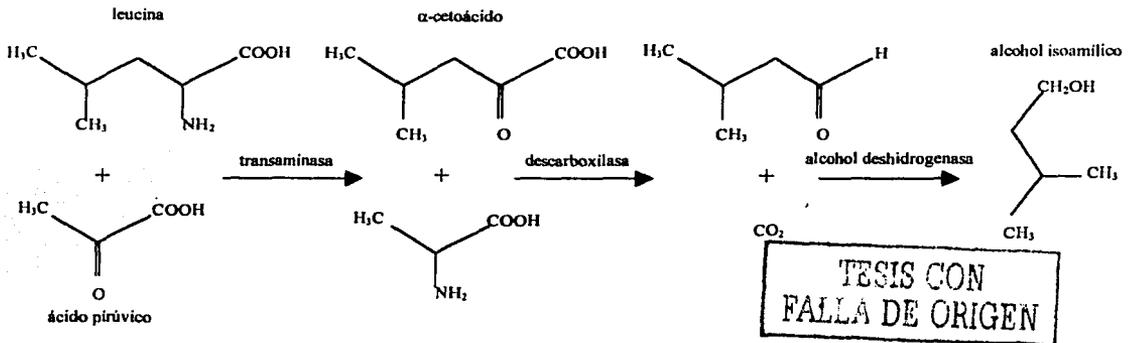


Figura 4. Ruta metabólica de Erlich para la producción de alcohol isoamílico.

Alcohol amílico

Los aminoácidos son sintetizados intracelularmente o pueden ser adicionados al medio de cultivo. Si se inicia la reacción con 2-oxobutirato se puede obtener el alcohol amílico, *figura 5*.¹⁸

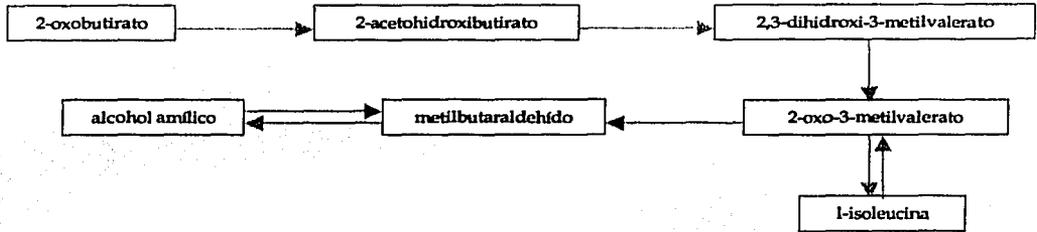


Figura 5. Síntesis de alcohol amílico.

Alcohol isobutílico

La obtención de éste alcohol puede llevarse a cabo por acción de la acetolactato sintetasa durante la síntesis de la valina, *figura 6*.¹⁸

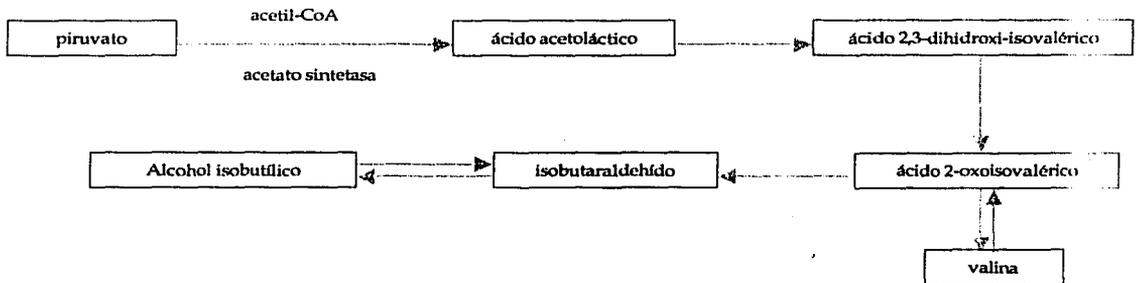


Figura 6. Mecanismo de síntesis de alcohol isobutílico.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Diacetilo

El diacetilo puede considerarse como un subproducto durante la síntesis de la valina, *figura 7*.¹⁸

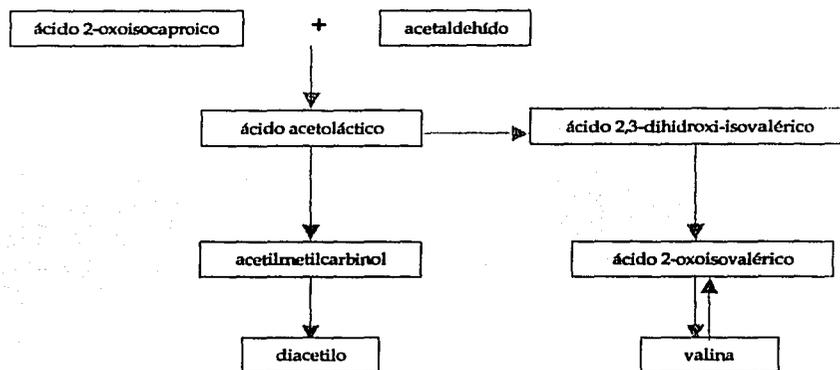


Figura 7. Ruta biosintética para el diacetilo.

Ésteres

La formación de ésteres a partir de la acetyl-CoA es mediante reacciones de alcoholisis catalizadas por la alcohol acetiltransferasa. Según las observaciones de Nordstrom las reacciones que involucran la formación de CoA y acetyl-CoA al ser inhibidas favorecen la formación de ácidos y no de sus respectivos ésteres *figura 8*.¹⁸

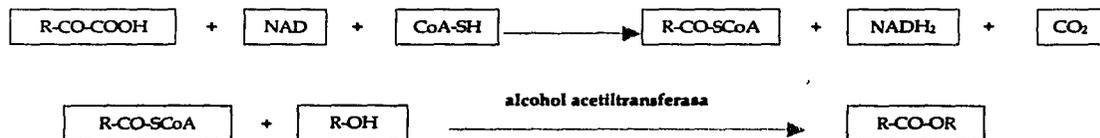


Figura 8. Reacción de alcoholisis a partir de la cual se forman los ésteres.

LIBRO CON
FALLA DE ORIGEN

Tiamina

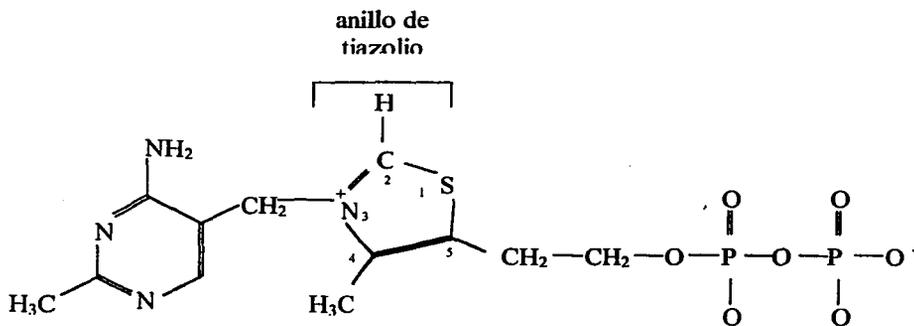
Las vitaminas son compuestos orgánicos que funcionan como coenzimas o como uno de sus constituyentes. Son eficientes en cantidades pequeñas y no son empleadas para la manufactura de partes estructurales de la célula. Todos los organismos requieren vitaminas, pero la capacidad de sintetizarlos no siempre existe.

Algunos hongos al proporcionarles azúcares, nitrógeno y minerales son capaces de sintetizar las vitaminas que requieren. Otro tipo de hongos sufren deficiencia parcial de vitaminas y crecen limitadamente sin ellas, pero si se agregan al medio el crecimiento se acelera notablemente. El último grupo de hongos sufren deficiencia total de vitaminas y necesitan de una fuente exógena.²³

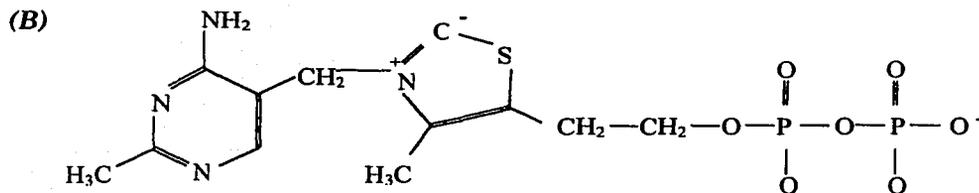
Ceratocystis fimbriata tiene deficiencia completa de tiamina y requiere de ésta para el desarrollo del peritecio.^{23 y 24}

La tiamina pirofosfato (TTP) es la forma coenzimática de la vitamina B₁ (tiamina). La estructura de la vitamina B₁ está formada por un grupo pirimidínico y otro tiazólico. La TTP es importante en la rotura de enlaces adyacentes a un grupo carbonilo (por ejemplo, la descarboxilación de α -cetoácidos) y en reordenamientos químicos en los que existe transferencia de un grupo aldehído activado desde un átomo de carbono a otro. El anillo de tiazolio es la parte funcional de la tiamina pirofosfato, *figura 9 (A)*. El protón C-2 del anillo es relativamente ácido y la pérdida de éste protón ácido produce un carbanión que actúa como nucleófilo y que es la especie activa en las reacciones dependientes de TTP, *figura 9 (B)*. Este carbanión se adiciona fácilmente a grupos carbonilo, lo que facilita en gran manera reacciones como la descarboxilación catalizada por la piruvato descarboxilasa *cuadro 5*.^{21 y 25}

(A)



tiamina pirofosfato (TTP)



carbanión de TTP

Figura 9. (A) La tiamina pirofosfato (TTP) es la forma coenzimática de la vitamina B₁ (tiamina). El carbono en rojo del anillo tiazolio es el carbono reactivo. (B) El protón C-2 del anillo es relativamente ácido y la pérdida de éste protón ácido produce un carbanión que es la especie activa en las reacciones dependientes de TTP.^{21 y 25}

Enzima	Ruta	Enlace roto	Enlace formado
Piruvato descarboxilasa	Fermentación alcohólica		
Piruvato deshidrogenasa	Síntesis de acetil-CoA		
α -cetoglutarato deshidrogenasa	Ciclo del ácido cítrico		
Transcetolasa	Reacciones de fijación de carbono en la fotosíntesis		
Acetolacto sintetasa	Biosíntesis de valina y leucina		

Cuadro 5. Algunas reacciones en las que el TTP es un cofactor esencial.^{21 y 25}

ACTIVIDAD DE AGUA

La supervivencia de las células depende de su habilidad para interactuar con su medio ambiente y de su capacidad de respuesta a cambios en el mismo. Los organismos unicelulares deben adaptarse a los cambios de su entorno para continuar con su proliferación. Alteraciones en las condiciones químicas o físicas que tengan un efecto negativo en el crecimiento celular requiere de respuestas rápidas y drásticas para asegurar la sobrevivencia del microorganismo. A los mecanismos moleculares inducidos por condiciones adversas se les denomina respuestas al estrés.²⁶

Los mecanismos de respuesta al estrés ajustan el metabolismo y procesos celulares necesarios para proteger a la célula en contra del efecto negativo de los cambios ambientales y para reparar cualquier daño molecular. La célula adquiere resistencia, tolerancia y mecanismos de prevención a daños además de producir proteínas a diferente nivel o actividad diferente a la presente antes de la exposición a condiciones de estrés.^{17 y 26}

Los microorganismos que no tienen acceso a la cantidad de agua que necesitan, se les dificulta la supervivencia y sufren agobio o tensión. El agobio o tensión, es la pérdida del estado fisiológico estable de un organismo vivo, es un factor que se produce cuando hay limitación o exceso en el valor de alguna variable del medio de cultivo y se traduce como una menor velocidad de crecimiento, puede ser provocado por cualquier variable que interrumpe, restringe o acelera peligrosamente el proceso metabólico normal de un ser vivo.²⁷

El agua juega un papel central en los componentes celulares, actúa como disolvente, determina la estructura de las proteínas, ácidos nucleicos y membranas. En las reacciones bioquímicas el agua otorga un ambiente adecuado como disolvente y/o como agente reactivo. Por último, el agua contenida determina el turgor, forma y tamaño de la célula.^{26 y 28}

Las reacciones que tienen lugar en el citoplasma transcurren en un medio acuoso y el citoplasma está rodeado por una membrana generalmente permeable a las moléculas de agua, las cuales pueden pasar libremente del citoplasma al medio y del medio al citoplasma. Este flujo dinámico de moléculas de agua en ambos sentidos normalmente se halla en estado estacionario de modo que todo organismo vivo sólo estará estresado si existe un flujo neto hacia el exterior del citoplasma, que conduce a la plasmólisis, o un flujo neto hacia el interior de la célula que conduce a la rotura de la membrana. En bacterias y hongos se impide la rotura por la existencia de una pared celular.^{26, 28 y 30}

Para comprender el desplazamiento del agua a través de la membrana se emplea un parámetro denominado actividad de agua, ***A_w***. *La ***A_w*** indica la disponibilidad de agua de un determinado medio para las reacciones químicas, bioquímicas, para los cambios de estado o*

transferencias a través de membranas semipermeables. Su valor oscila entre 0 y 1. La A_w de un sustrato, expresa cuantitativamente el requerimiento de agua para la actividad microbiana. ^{29 y 32}

La A_w se puede calcular de acuerdo a la ley de Raoult así:

$$A_w = \frac{n_2}{n_1 + n_2}$$

Donde:

n_1 = número de moles de soluto

n_2 = número de moles de disolvente

Puede también definirse como la relación entre la presión de vapor de la disolución (P) y la presión de vapor del agua pura (P_0). $\longrightarrow A_w = \frac{P}{P_0}$

Los valores calculados a partir de las molaridades difieren a menudo de los obtenidos experimentalmente y que son los verdaderamente representativos respecto a la incidencia del parámetro sobre el crecimiento de los microorganismos. El peso molecular de una sustancia influye sobre la A_w (dos sustancias a igual concentración porcentual, pero con pesos moleculares distintos producen diferentes A_w). ^{28, 29 y 30}

Un parámetro relacionado con la A_w es la presión osmótica, la cual se define como la fuerza por unidad de superficie necesaria para detener el flujo neto de moléculas de agua desde una zona con elevada actividad de agua a otra en la que esta actividad es baja. A medida que la A_w disminuye, o a medida que aumenta la presión osmótica, es esencial que la A_w del citoplasma sea aún más baja o que su presión osmótica sea aún más elevada. Esto se consigue mediante la producción de concentraciones crecientes de solutos que no deben obstaculizar la función del citoplasma. ^{28 - 30}

Con una reducción de la A_w , disminuye el número de microorganismos capaces de crecer activamente (*ver cuadro 4*), se les dificulta la formación de esporas y la producción de micotoxinas ya que esto exige un A_w más elevada que la que se requiere para el crecimiento o gemación dentro de una misma especie. Las esporas tienen mayor tolerancia a valores bajos de A_w . ^{28 y 31}

Existen muchos experimentos en algas, bacterias, levaduras y hongos filamentosos en donde se estudia la influencia de la A_w del medio en la producción de metabolitos. Es posible realizar este tipo de estudios empleando depresores de la A_w , como: glicerol y otros polioles, los cuales no influyen por su naturaleza en la fisiología de los microorganismos. ^{30 - 33}

El ambiente natural de hongos y levaduras generalmente son plantas, sus frutos y los azúcares contenidos en los jugos, regularmente la cantidad de agua disponible depende de factores climáticos. Los hongos y levaduras cuentan con los mecanismos suficientes para superar cualquier cambio osmótico en su medio ambiente. ¹⁷

Microorganismos	Aw
Bacterias	0.91
Levaduras	0.85
Mohos y hongos	0.75
Mohos y hongos xerofílicos	0.65
Levaduras osmofílicas	0.60

Cuadro 6. Valores de Aw para el crecimiento de microorganismos.

Es obvio que los organismos unicelulares en particular desarrollen mecanismos de adaptación a cambios de osmolaridad.

En estudios con *Trichoderma viride* al ocasionar una disminución de la Aw se han logrado aumentos en la producción de aroma de hasta un 300%, aunado a un incremento en la biomasa; este hecho puede deberse a la acumulación del aroma durante el periodo de tensión y estar relacionado con la osmorregulación del hongo. ³³

Estudios en *Sporidiobolus salmonicolor* demostraron un 80% más en la producción de compuestos aromáticos de bajo peso molecular. Los compuestos de bajo peso molecular intervienen eficientemente en las propiedades termodinámicas del agua en la célula acelerando la osmorregulación. ³⁴

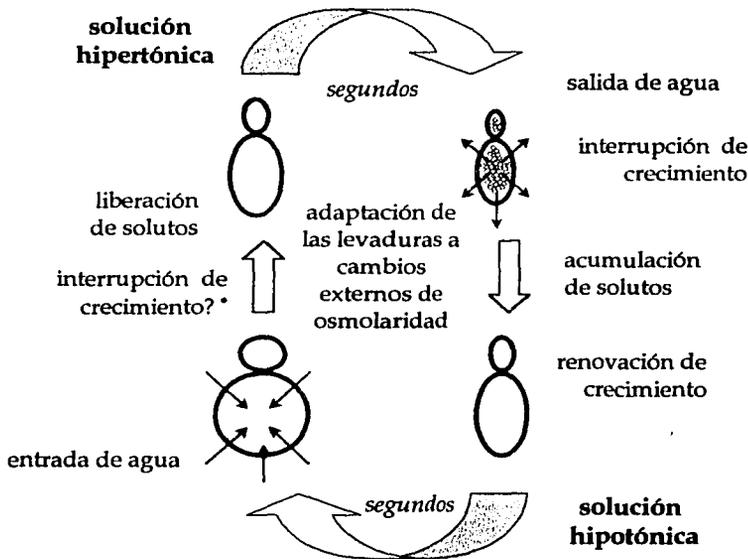
En la bacteria *Staphylococcus aureus* la disminución de la actividad del agua trae consigo un fenómeno de plasmólisis, por ejemplo, pierde un 50% de su agua intracelular cuando la Aw pasa de 0.995 a 0.950. Esto disminuye o paraliza el crecimiento de los microorganismos, a causa de la inhibición de las actividades enzimáticas. En la *figura 10* se resume el mecanismo de adaptación a un descenso en la Aw. Cuando la Aw pasa de 0.955 a 0.950, se observa un aumento de la concentración de potasio citoplasmático, éste activa la glutamato deshidrogenasa que transforma el cetoglutarato en glutamato, que se acumula y permite la recuperación del turgor. Dicho de otra forma, cuando se alcanza el equilibrio termodinámico, el medio intracelular es siempre un poco más alto en presión osmótica que el medio externo y ésta diferencia se equilibra por la resistencia de

la pared celular. De hecho la célula siempre está presurizada con relación al medio externo.³⁰

En resumen, los mecanismos de respuesta al estrés pueden dividirse en dos partes:

- 1) Respuesta S.O.S. temprana; es una respuesta pasiva termodinámica celular caracterizada por el flujo de agua y de solutos a través de la membrana celular. El flujo de agua está relacionado con el gradiente de potencial de agua entre la célula y el medio externo. Se observa un decremento rápido del volúmen celular (es constante y dura segundos) y depende de los solutos.
- 2) Respuesta sostenida de adaptación; llevada a cabo por un sistema de osmorregulación celular en el cual se sintetizan solutos y eventualmente se modifican las propiedades de permeabilidad de la membrana. Este sistema permite que la célula restaure su volumen interno en el caso de que la respuesta termodinámica no sea un daño irreversible.³⁴

Después de la respuesta sostenida de adaptación el volumen interno celular puede no restaurarse completamente. El volumen puede disminuir hasta en un 50% dependiendo de la presión osmótica exterior, *figura 10*.²⁶



TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Figura 10. Mecanismos de adaptación al estrés osmótico en levaduras.²⁶

*No hay estudios de respuesta en soluciones hipotónicas.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Con la finalidad de proponer una forma alterna de producción de compuestos del aroma y quizá la sustitución de procesos de síntesis química o de extracción, se han realizado estudios de optimización de condiciones de cultivo en *Ceratocystis fimbriata* el cual es un hongo filamentoso con capacidad de producir aromas frutales que pueden ser de interés para las industrias farmacéutica y de los alimentos.

En este trabajo se pretende determinar el efecto de la adición de leucina o tiamina en el medio de cultivo estándar y la posible interacción con la disponibilidad de agua en el cultivo.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Conocer los efectos de la actividad de agua, la leucina y la tiamina en la cinética de producción de compuestos del aroma por *Ceratocystis fimbriata*.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar la influencia de A_w en la producción de compuestos del aroma en un medio de cultivo enriquecido con leucina.
- Determinar la influencia de A_w en la producción de compuestos del aroma en un medio de cultivo enriquecido con tiamina.
- Establecer si el efecto de A_w es positivo para la obtención de compuestos del aroma.

HIPÓTESIS

El efecto de tensión acuosa sobre *Ceratocystis fimbriata* en un medio de cultivo enriquecido debe ser positivo, aumentando la tasa de crecimiento y la producción de metabolitos volátiles que permitan la estabilidad y sobrevivencia del hongo.

MATERIAL

Material biológico

Microorganismo	Especificaciones
Cepa de <i>Ceratocystis fimbriata</i>	Clave CBS 374-83 (Ellis & Halst) proveniente de Baan, The Netherlands (Centraalbureau Voor Schimmelcultures).

Reactivos

Sustancias (estándar de referencia Merck)
Alcohol amílico
Butanol
Etanol
Alcohol isoamílico
Isopropanol
Isobutanol
Acetato de etilo
Acetato de butilo
Acetato de isoamilo
Propionato de etilo
Butirato de etilo
2-propanona
Acetaldehído
Diacetilo

Sustancias	Proveedor
Medio de cultivo	
Agar dextrosa y papa	BIOXON
Glucosa	J. T. Baker
Fosfato de potasio monobásico	J. T. Baker
Nitrato de calcio	J. T. Baker
Sulfato de amonio	J. T. Baker
Sulfato de magnesio	J. T. Baker
Urea	J. T. Baker
Nitrato férrico	J. T. Baker
Sulfato de zinc	J. T. Baker
Sulfato de magnesio	J. T. Baker
Leucina	Merck
Tiamina	Merck

Colorantes
Azul de algodón lactofenol

Equipo

Descripción	Modelo
Balanza analítica Bosch	S 2000
Conductronic	pH 20
Shaker orbit	Lab-Line Inc
Agitador y parrilla de calentamiento	Nuova II
Cromatógrafo de gases masas Hewlett Packard	5890
Autoclave AESA	300
Microscopio Nykon	104
Centrífuga Beckman	TJ-6
Campana de flujo laminar Veco	
Bomba de vacío Koblenz	
Refrigerador General Electric	
Estufa	

Material de vidrio

Descripción	Capacidad (en mL)
Matraces Erlenmeyer	250, 500 y 1000
Matraces Kitazato	250 y 500
Pipetas graduadas	1.0, 2.0, 5.0 y 10
Probetas	25
Frascos serológicos	100

Descripción
Pipetas Pasteur
Termómetros (escala de -10 a 150°C)
Cámara Neubauer
Porta y cubre objetos
Frascos goteros

Otros

Descripción
Embudos Büchner
Espátulas metálicas
Barras magnéticas para agitación
Tubos plásticos para centrifuga

Descripción
Papel Whatman No. 2
Gasa
Algodón
Mangueras

MÉTODOS

Mantenimiento de la cepa

Las cepas se conservaron en agar PDA inclinado (Agar dextrosa y papa Bioxon), cubierto con aceite mineral estéril.

Preparación del inóculo

Se emplearon esporas frescas cultivadas en matraces erlenmeyer de 250 mL con 75 mL de PDA, se inocularon empleando un cubo de agar de aproximadamente 2 mm de lado, la temperatura de incubación fue de 30 °C durante 120 horas.

Cosecha de esporas

La obtención de esporas se realizó colocando un matraz con crecimiento de esporas en la parrilla de agitación, se adicionó 70 mL de agua, 3 gotas de tween, 30 perlas de vidrio y un agitador magnético (todo el material empleado para dicho fin estaba estéril). Se agitó durante 3 minutos y al terminar se vació el contenido al siguiente matraz con crecimiento de esporas. Esto se realizó sucesivamente hasta terminar con todos los matraces.

Conteo de esporas

Se tomó 0.5 mL de esporas (de el último de los matraces de la cosecha de esporas) y se transfirieron a 4.5 mL de agua (dilución 1:10). La suspensión se agitó en el vortex durante un minuto. Con una pipeta Pasteur se tomó suspensión y se colocó cuidadosamente una gota en la cámara de Neubauer. La cuenta de esporas se realizó contando 13 cuadros. El número de esporas recuperadas fue dado por la siguiente relación:

$$N = (T) \frac{(25 \times 10^4)}{13} (D)(V) \rightarrow \text{Donde:}$$

13

N = número de esporas recuperadas

T = número de esporas contadas

D = factor de dilución

V = volumen de la solución de esporas

Preparación del medio de cultivo líquido

El medio estándar¹⁶ es el que se usó como base (medio de control) para éste trabajo, la composición del medio líquido estándar (M.E.) se ve en el *cuadro 1*.

Medio de cultivo estándar (M.E.)		
Sustancia	Cantidad	Unidades
Glucosa	50.00	g / L
Fosfato de potasio monobásico	1.00	g / L
Nitrato de calcio	1.00	g / L
Sulfato de amonio	4.50	g / L
Sulfato de magnesio	0.75	g / L
Urea	1.90	g / L

Cuadro 1. Composición del M.E.

Complementado con 2 mL/L de la siguiente solución de oligoelementos, *cuadro 2*.

Oligoelementos		
Sustancia	Cantidad	Unidades
Nitrato férrico	723	mg / L
Sulfato de zinc	439	mg / L
Sulfato de magnesio	203	mg / L

Cuadro 2. Composición de oligoelementos en el M.E.

El medio de cultivo se preparó bajo las especificaciones que se observan en los cuadros 3 y 4.

Sustancia	Disolución en agua	Especificaciones de esterilización (Calor húmedo)
<u>Macrosales</u> (fosfato de potasio monobásico, nitrato de calcio y sulfato de magnesio)	400 mL	121 °C, 15 libras de presión / 15 minutos
<u>Oligoelementos</u>	1000 mL	121 °C, 15 libras de presión / 15 minutos

Cuadro 3. Procedimiento de esterilización parte I.

Por separado (cada sustancia en diferente matraz):

Sustancia	Disolución en agua	Especificaciones de esterilización (Calor húmedo)
Glucosa (el pH de la glucosa, se reguló a 6 con NaOH 0.5 M)	390 mL	116 °C, 10 libras de presión / 20 minutos
Urea	100 mL	116 °C, 10 libras de presión / 20 minutos
Sulfato de amonio	100 mL	121 °C, 15 libras de presión / 15 minutos

Cuadro 4. Procedimiento de esterilización parte II.

Al final se dejaron enfriar y se mezclaron todos los componentes del medio.

Medios de cultivo enriquecidos

Al M.E. preparado se le adicionó leucina o tiamina y se agitó hasta disolver. Se adicionó 20 milimoles de leucina/L de medio ó 0.15 milimoles de tiamina/L de medio.

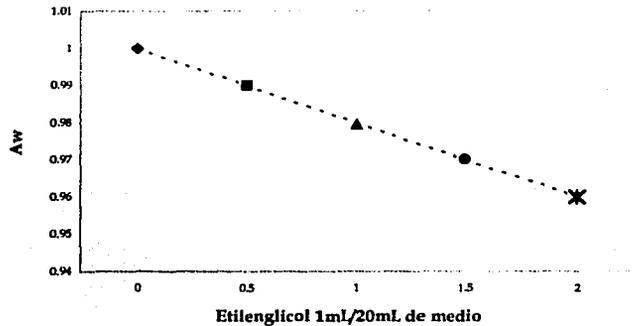
Medios con valores de A_w diferentes a uno

Todas estas fermentaciones, se llevaron a cabo en microcosmos, empleando frascos serológicos de 100 mL a los cuales se les adicionaron 20 mL de medio de cultivo y agente tensionante (etilenglicol) como se indica en la *tabla y gráfico 1*.

Etilenglicol (mL/20mL)	A_w
0.00	1.00
0.50	0.99
1.00	0.98
1.50	0.97
2.00	0.96

Tabla 1. Volumen de agente tensionante y diferentes valores de A_w .

Gráfico1. Actividad acuosa contra agente tensionante (etilenglicol)

Tamaño del inóculo

El tamaño del inóculo fue de 1×10^7 esporas por cada 100 mL de medio de cultivo.

Fermentación

Una vez inoculados los frascos se cubrieron con 6 capas de gasa con los hilos entrecruzados, se incubaron durante 120 horas a 30 °C y 250 r.p.m.

Determinación de biomasa

El caldo de fermentación se centrifugó durante 15 minutos a 4000 r.p.m. Se decantó y el botón se resuspendió en solución isotónica (en caso de ser necesario se almacenó en congelador a -10 °C). La solución isotónica con el material biológico se filtró al vacío en

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

papel Whatman No. 2, puesto a peso constante, se secó en estufa a 70 °C hasta que se mantuvo el peso constante y se determinó el peso seco.

Medición del pH

El pH se midió empleando un electrodo de vidrio y un potenciómetro Cornig.

Actividad acuosa (Aw)

Se determinó al principio y al final de la fermentación en el equipo Decagon Aqua Lab modelo cx-2 el cual usa la temperatura de rocío para medir la Aw. Esta técnica es un método de medición primaria de humedad relativa el cual emplea el punto de rocío; cuando se mide la muestra, un espejo de acero inoxidable dentro de la cámara se enfría repetidamente y se calienta mientras que se forma rocío y es eliminado. El ventilador del instrumento circula aire dentro de la cámara sensora acelerando este proceso de equilibrio.

Análisis del espacio de cabeza

El análisis de espacio de cabeza consiste en tomar una muestra de los compuestos volátiles que se acumulan en la parte superior del frasco serológico del cultivo con una jeringa de cromatografía para gases de 2 mL. Se empleó un cromatógrafo de gases, equipado con un detector de ionización de flama y una columna capilar de Carbowax. La temperatura del inyector y del detector que se usó fue de 225 °C. La temperatura del horno, con un programa de calentamiento con una temperatura inicial de 35 °C durante 3 minutos, una rampa de temperatura de 5 °C cada minuto hasta llegar a 190 °C. El gas acarreador fue helio. La relación del split 1:40 y el volumen de inyección de 2 mL.

Para cuantificar los componentes del espacio de cabeza se elaboraron curvas estándar inyectando de 0-40 µL de los compuestos de interés en una ampolleta de 500 mL, se equilibró la temperatura de la ampolleta durante 15 minutos a 30 °C. El volumen de la inyección fue de 2 mL del espacio de cabeza. Se elaboraron las curvas estándar graficando área contra concentración en microlitros por litro, ver apéndice IV.

Tinción con azul de algodón lactofenol

En un portaobjetos se colocó una asada del cultivo líquido y se adicionó una gota de la solución colorante, se colocó un cubreobjetos. La preparación se selló con laca para uñas.

Recordemos que *Ceratocystis fimbriata* es un hongo filamentoso capaz de producir compuestos del aroma dependiendo del sustrato que se le proporcione, y en este caso se estudió la interacción entre el medio de cultivo complementado con leucina o tiamina y con cinco valores diferentes de A_w .

Se determinó biomasa, pH y producción de volátiles. Todos los resultados obtenidos se trataron estadísticamente haciendo un análisis de varianza con $P < 0.05$.

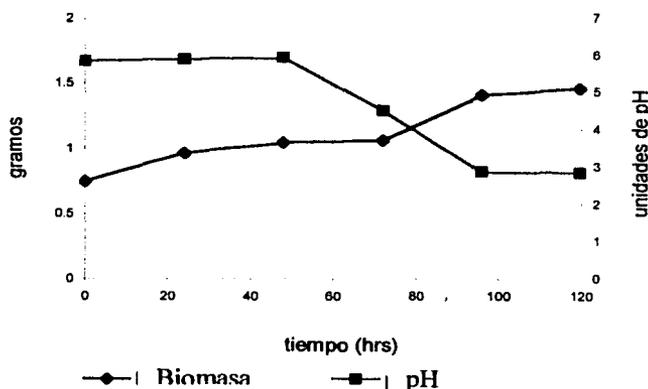
Biomasa* y pH

En la determinación de biomasa y de pH en medio estándar (M.E.) con $A_w=1.00$ se observó que al aumentar la biomasa disminuye el pH, *ver tabla y gráfico 1*.

Tabla 1. Valores de biomasa de *C.fimbriata* y del pH del M.E. con $A_w = 1.00$

Tiempo (hrs)	Biomasa (g)	pH
0	0.745	5.84
24	0.965	5.89
48	1.040	5.93
72	1.060	4.50
96	1.404	2.86
120	1.456	2.83

GRÁFICO 1. Valores de biomasa de *C. fimbriata* y del pH del M.E. con $A_w = 1.00$



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

* Los valores de biomasa en este trabajo siempre se reportan en peso seco.

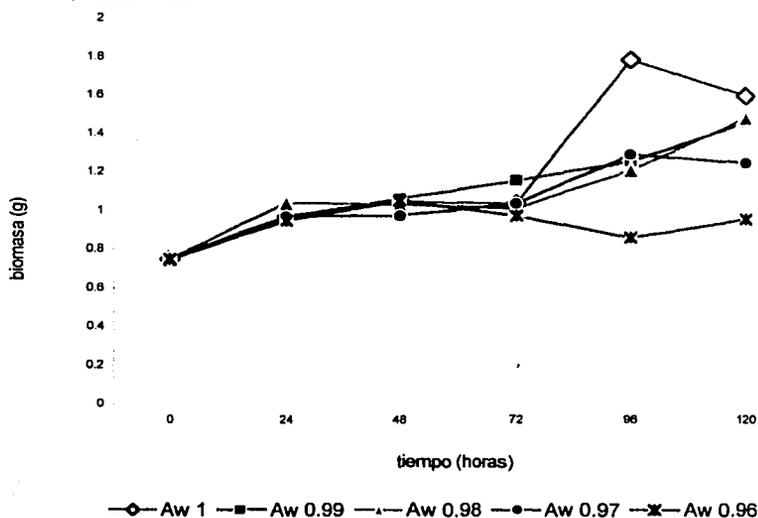
Efecto de la Aw sobre la biomasa*

Se determinó el efecto de la Aw en la producción de biomasa en M.E. a intervalos de 24 horas durante 5 días. La producción máxima se observó en Aw=1 y la mínima en Aw=0.96, ver tabla y gráfico 2.

Tabla 2. Producción de biomasa (g) de *Ceratocystis fimbriata* en M.E. con cinco valores diferentes de Aw.

Tiempo (hrs)	Valores de Aw				
	1	0.99	0.98	0.97	0.96
0	0.745	0.745	0.745	0.745	0.745
24	0.965	0.960	1.035	0.965	0.945
48	1.040	1.055	1.025	0.970	1.045
72	1.030	1.150	1.005	1.030	0.970
96	1.780	1.250	1.205	1.285	0.855
120	1.590	1.450	1.475	1.240	0.950

Gráfico 2. Producción de biomasa (g) de *Ceratocystis fimbriata* en M.E. con cinco valores diferentes de Aw.



TESIS CON
FALTA DE ORIGEN

* Los valores de biomasa en este trabajo siempre se reportan en peso seco.

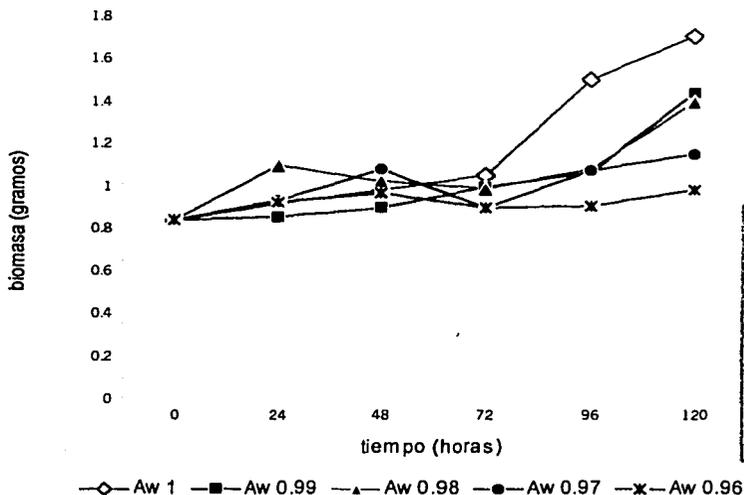
Efecto de la Aw sobre la biomasa*

Se determinó la producción de biomasa en medio más leucina (M+L) con diferentes valores de Aw en intervalos de 24 horas durante 120 horas. En la *tabla y gráfico 3* puede observarse el efecto negativo de la disminución de Aw sobre la producción de biomasa.

Tabla 3. Producción de biomasa (g) de *C. fimbriata* en M+L con cinco valores diferentes de Aw.

Tiempo (hrs)	Valores de Aw				
	1	0.99	0.98	0.97	0.96
0	0.840	0.840	0.840	0.840	0.840
24	0.915	0.850	1.095	0.925	0.920
48	0.975	0.895	1.020	1.075	0.960
72	1.045	0.990	0.985	0.890	0.890
96	1.500	1.060	1.075	1.070	0.903
120	1.700	1.435	1.390	1.145	0.978

Gráfico 3. Producción de biomasa (g) de *C. fimbriata* en M+L con cinco valores diferentes de Aw.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

* Los valores de biomasa en este trabajo siempre se reportan en peso seco.

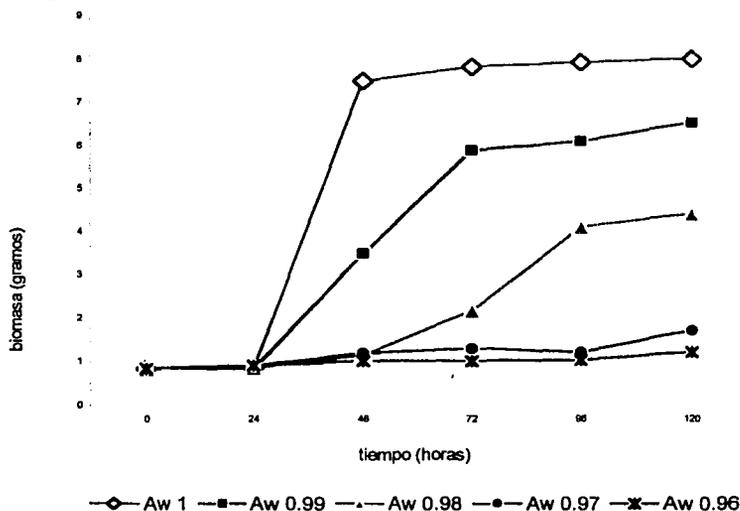
Efecto de la Aw sobre la biomasa*

Se determinó la producción de biomasa en medio más tiamina (M+T) a diferentes Aw en intervalos de 24 horas durante 5 días y se observó que el aumento de la presión osmótica produce un efecto negativo en la producción de biomasa, *ver tabla y gráfico 4.*

Tabla 4. Producción de biomasa (g) de *Ceratocystis fimbriata* en M+T con cinco valores diferentes de Aw.

Tiempo (hrs)	Valores de Aw				
	1	0.99	0.98	0.97	0.96
0	0.840	0.840	0.840	0.840	0.840
24	0.860	0.840	0.860	0.900	0.905
48	7.490	3.480	1.135	1.180	1.000
72	7.820	5.880	2.165	1.295	1.002
96	7.920	6.080	4.100	1.200	1.025
120	7.990	6.515	4.400	1.700	1.205

Gráfico 4. Producción de biomasa (g) de *Ceratocystis fimbriata* en M+T con cinco valores diferentes de Aw.



* Los valores de biomasa en este trabajo siempre se reportan en peso seco.

Aw y pH

Se estudió la variación de pH en todos los valores de Aw y con los tres medios de cultivo.

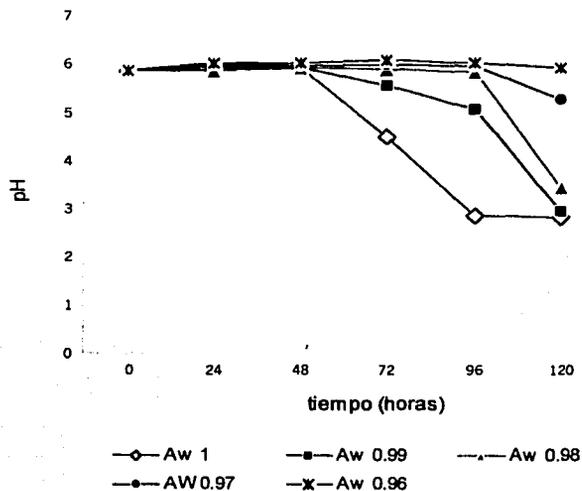
Medio estándar

Se observa en la *tabla y gráfico 5* que para los valores de Aw=0.97 y 0.96 el cambio de pH no es significativo.

Tabla 5. Cambio de pH en M.E. con cada uno de los valores de Aw

Tiempo (hrs)	Valores de Aw				
	1	0.99	0.98	0.97	0.96
0	5.84	5.84	5.84	5.84	5.84
24	5.89	5.95	5.85	5.97	6.01
48	5.93	2.92	5.93	5.94	6.00
72	4.50	5.55	5.89	5.97	6.07
96	2.86	5.06	5.82	5.96	6.00
120	2.83	2.94	3.43	5.27	5.91

Gráfico 5. Cambio de pH en M.E. para cada uno de los valores de Aw.



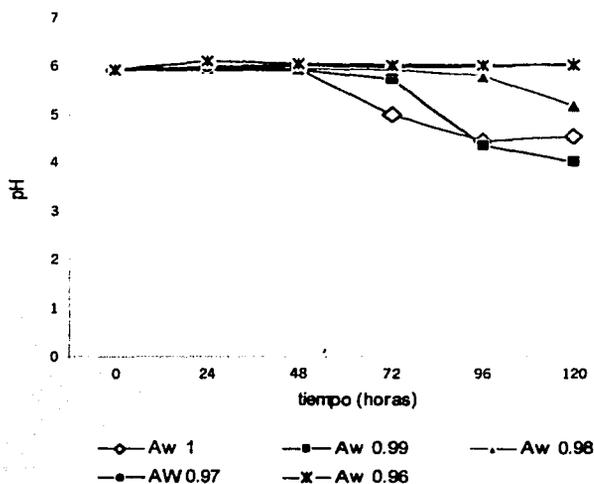
Medio con leucina

La adición de leucina al medio interfiere directamente en la producción de biomasa, el pH prácticamente no cambia en los valores de A_w menores a 0.98. Probablemente sea efecto de la interacción del medio con el cambio de presión osmótica, *ver tabla y gráfico 6.*

Tabla 6. Cambio de pH en M+L en cada uno de los valores de A_w

Tiempo (hrs)	Valores de A_w				
	1	0.99	0.98	0.97	0.96
0	5.93	5.93	5.93	5.93	5.93
24	5.99	5.91	5.97	5.99	6.10
48	5.96	5.91	5.94	6.00	6.04
72	4.99	5.74	5.92	5.98	6.01
96	4.45	4.34	5.80	5.97	6.02
120	4.53	4.01	5.19	6.03	6.00

Gráfico 6. Cambio de pH en M+L para cada uno de los valores de A_w .



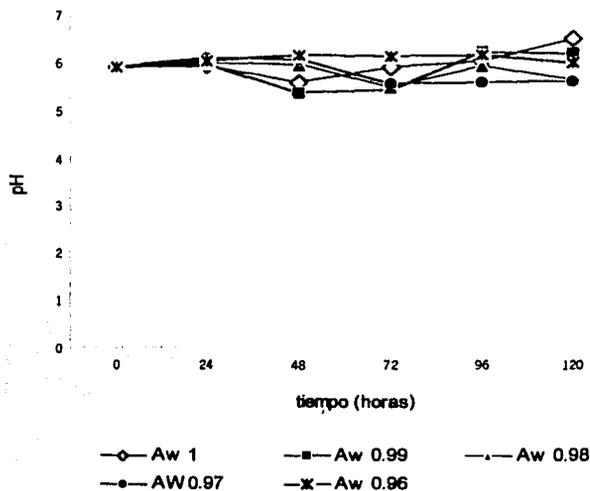
Medio con tiamina

Es obvio que la adición de tiamina al medio cambia el metabolismo del hongo. A pesar de que la producción de biomasa aumentó no se observó la disminución del pH como en el caso del M.E., *ver tabla y gráfico 7*

Tabla 7. Cambio de pH en M+T en cada uno de los valores de Aw

Tiempo (hrs)	Valores de Aw				
	1	0.99	0.98	0.97	0.96
0	5.90	5.90	5.90	5.90	5.90
24	5.93	5.95	5.99	6.08	6.02
48	5.59	5.38	5.96	6.07	6.16
72	5.91	5.44	5.50	5.55	6.13
96	6.03	6.23	5.92	5.59	6.15
120	6.50	6.17	5.65	5.61	5.98

Gráfico 7. Cambio de pH en M+T para cada uno de los valores de Aw.



Producción de volátiles

Se determinó la producción de volátiles empleando el análisis de espacio de cabeza tomando una muestra de la parte superior del frasco serológico de cultivo cada 24 horas durante 120 horas.

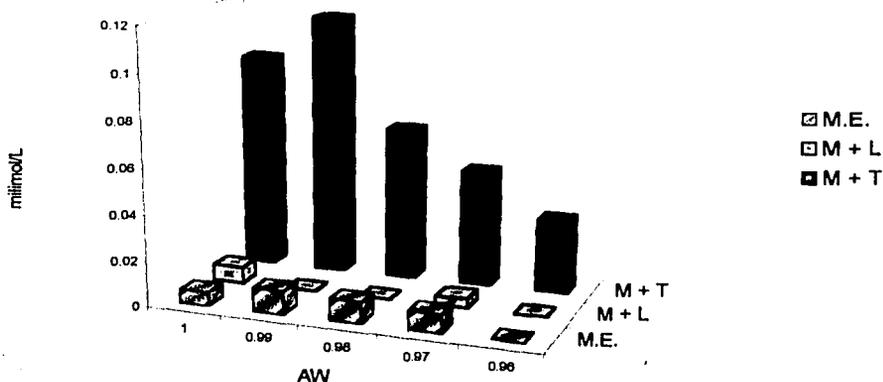
Medios de cultivo y actividad acuosa

A continuación se presentan los gráficos con la concentración acumulada por compuesto de aroma (milimol/L) para cada valor de A_w y para cada medio.

Acetaldehído

La producción de acetaldehído en M+T fue elevada en todos los valores de A_w . La producción en el M.E. y en el M+L no fue mayor de 0.02 milimol/L como se observa en el *gráfico 8*. Estadísticamente se determinó que la producción del compuesto se ve directamente afectada por el medio de cultivo pero no por el estrés acuoso.

Gráfico 8. Producción acumulada de acetaldehído en tres medios de cultivo con diferentes valores de A_w

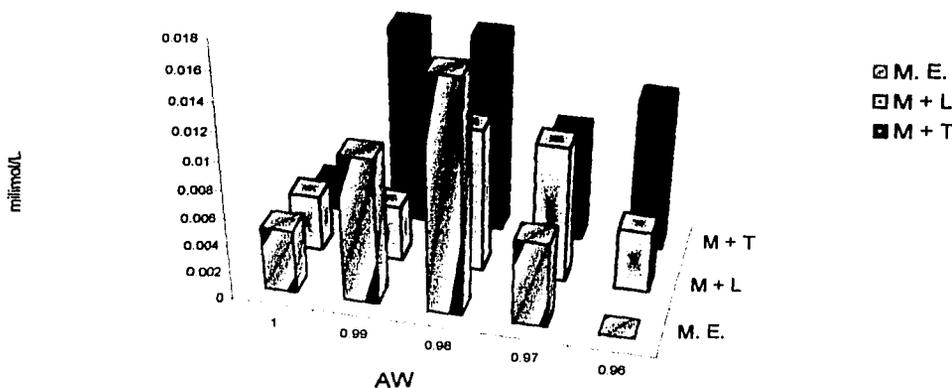


TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Acetona

En M.E. y $A_w=0.98$ se obtuvo la mayor producción de acetona. El tratamiento estadístico resalta la influencia de la A_w sobre la producción del volátil y en este caso el medio de cultivo no es determinante para la producción de la acetona, *gráfico 9*.

Gráfico 9. Producción acumulada de acetona en tres medios de cultivo con diferentes valores de A_w



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Diacetilo

El valor máximo de diacetilo fue de 0.0198 milimol/L y se produjo en M+T con $A_w=0.99$. Estadísticamente se determinó que la producción del volátil está estrechamente relacionado con el estrés acuoso y que se ve favorecida en el M+T. Se observó la menor producción del compuesto en el M+L, *ver gráfico 10*.

Etanol

Al observar el *gráfico 11* destaca notablemente que la producción máxima de etanol es en el M+T. El volátil se produjo nueve veces más que en el M.E. y en este caso el medio de cultivo influye al máximo en la síntesis del compuesto.

Gráfico 10. Producción acumulada de diacetilo en tres medios de cultivo con diferentes valores de Aw

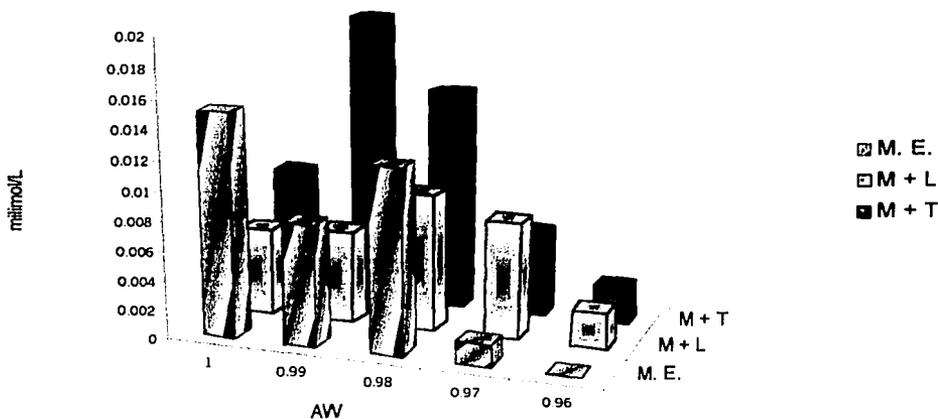
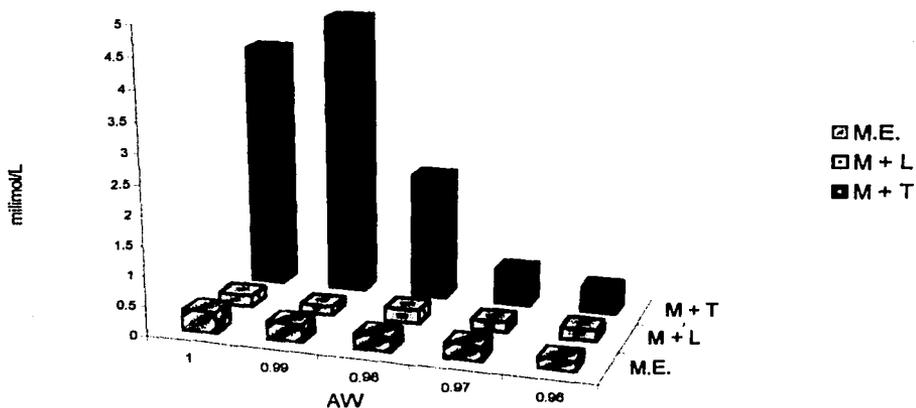


Gráfico 11. Producción acumulada de etanol en tres medios de cultivo con diferentes valores de Aw

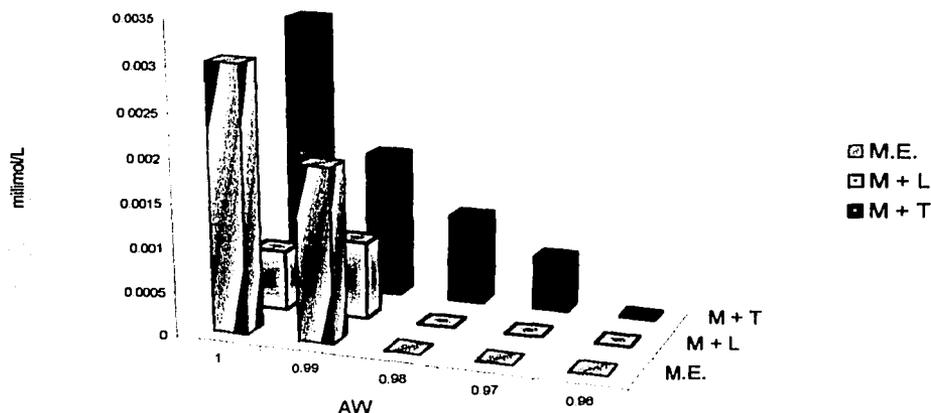


TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Alcohol amílico

De acuerdo con el análisis estadístico la producción del compuesto fue determinada por el estrés acuoso. El *gráfico 12* muestra como al aumentar la presión osmótica disminuye la producción del alcohol. En el M+T siempre se produjo el volátil.

Gráfico 12. Producción acumulada de alcohol amílico en tres medios de cultivo con diferentes valores de Aw



Alcohol isoamílico

En este caso tanto el medio de cultivo como la actividad acuosa influyen en la producción del volátil. La concentración máxima de alcohol isoamílico se obtuvo en el M+L con Aw=1. Gráficamente se observa que al disminuir la disponibilidad de agua también disminuye la producción del compuesto, *ver gráfico 13*.

Butanol

Estadísticamente la producción de butanol depende tanto del medio de cultivo como de la tensión acuosa. En el *gráfico 14* puede observarse que se produjo más alcohol en el M.E con Aw=1 y que la producción en M+T se presentó en todos los valores de Aw.

FALLA DE ORIGEN

Gráfico 13. Producción acumulada de alcohol isoamílico en tres medios de cultivo con diferentes valores de Aw

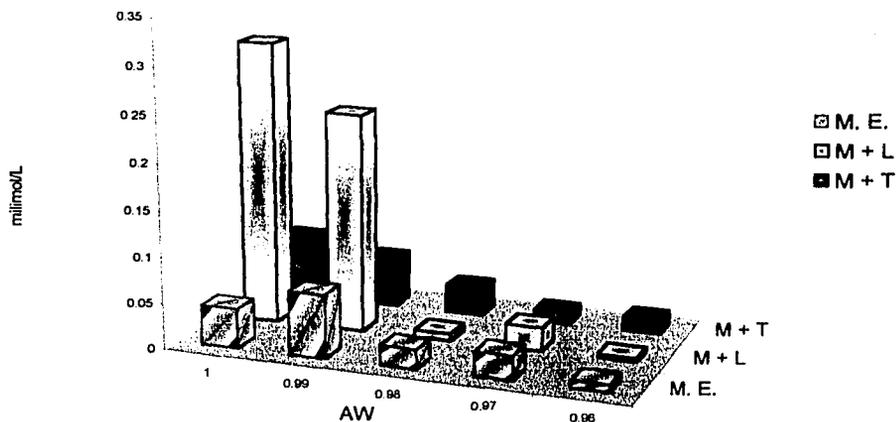
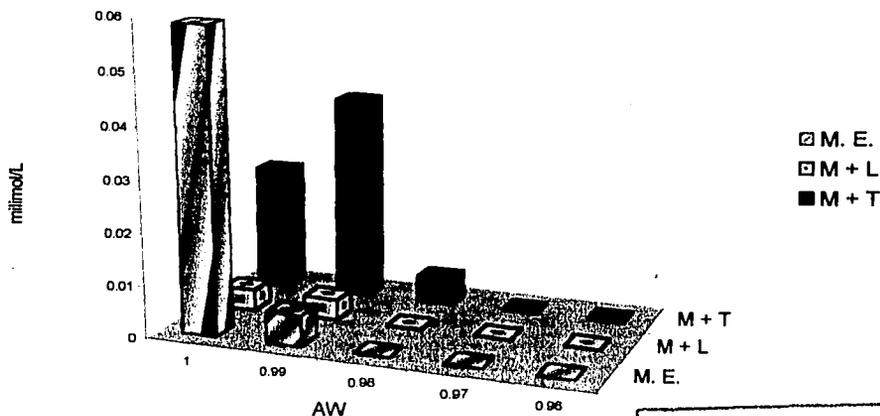


Gráfico 14. Producción acumulada de butanol en tres medios de cultivo con diferentes valores de Aw

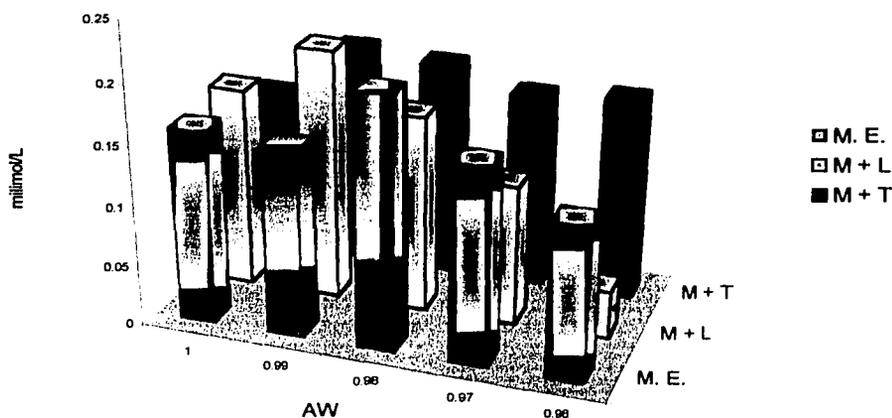


TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Isobutanol

La producción de este volátil no depende del medio de cultivo ni de la actividad acuosa. La producción máxima es prácticamente la misma en M.E. $A_w=0.98$ y M+L $A_w=0.99$, ver gráfico 15.

Gráfico 15. Producción acumulada de isobutanol en tres medios de cultivo con diferentes valores de A_w



Isopropanol

La concentración más elevada del alcohol se observó en M.E. con $A_w=0.97$. El estrés acuoso induce mayor producción del compuesto, ver gráfico 16.

Acetato de etilo

El medio de cultivo es sumamente importante para la producción de este compuesto. La máxima producción se observó en el M+T. La tensión acuosa produce un efecto negativo en la síntesis del acetato de etilo, ver gráfico 17.

Gráfico 16. Producción acumulada de isopropanol en tres medios de cultivo con diferentes valores de Aw

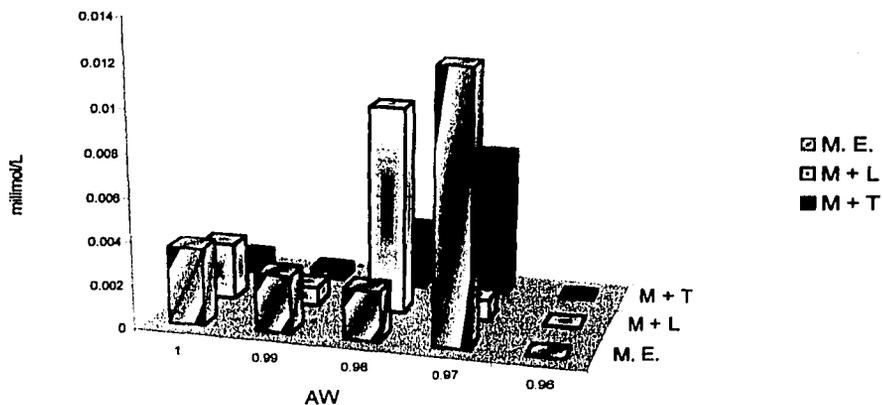
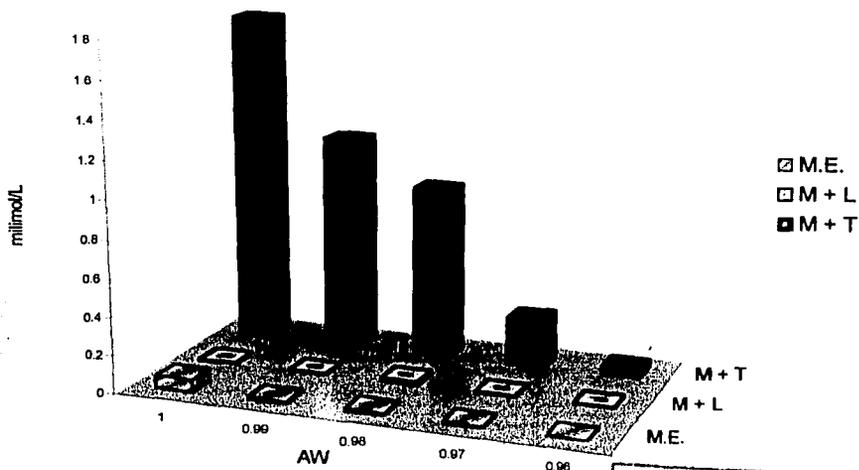


Gráfico 17. Producción acumulada de acetato de etilo en tres medios de cultivo con diferentes valores de Aw

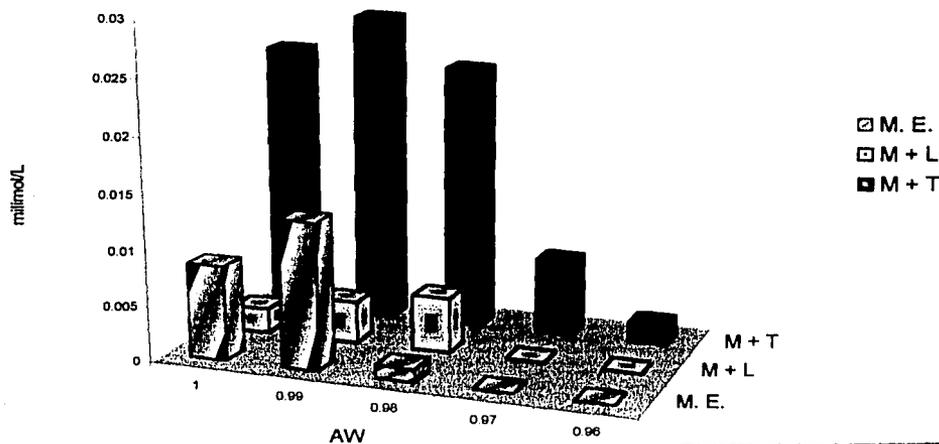


TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Acetato de isobutilo

La concentración máxima de acetato de isobutilo se obtuvo en M+T con $A_w=0.99$ y fue de 0.02906 milimol/L. La producción del volátil se ve favorecida por el medio y por la A_w , ver *gráfico 18*.

Gráfico 18. Producción acumulada de acetato de isobutilo en tres medios de cultivo con diferentes valores de A_w



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Acetato de isoamilo

El M+T es el medio óptimo para incrementar la producción de acetato de isoamilo. La influencia de la A_w es negativa en todos los casos, ver *gráfico 19*.

Butirato de etilo

La mayor producción del compuesto se observó en el M+T. El aumento de la presión osmótica disminuye la síntesis del volátil, ver *gráfico 20*.

Gráfico 19. Producción acumulada de acetato de isoamilo en tres medios de cultivo con diferentes valores de Aw

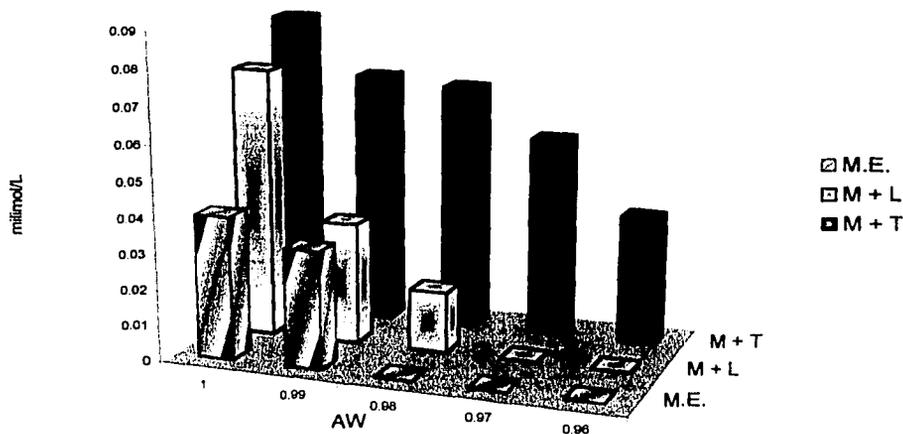
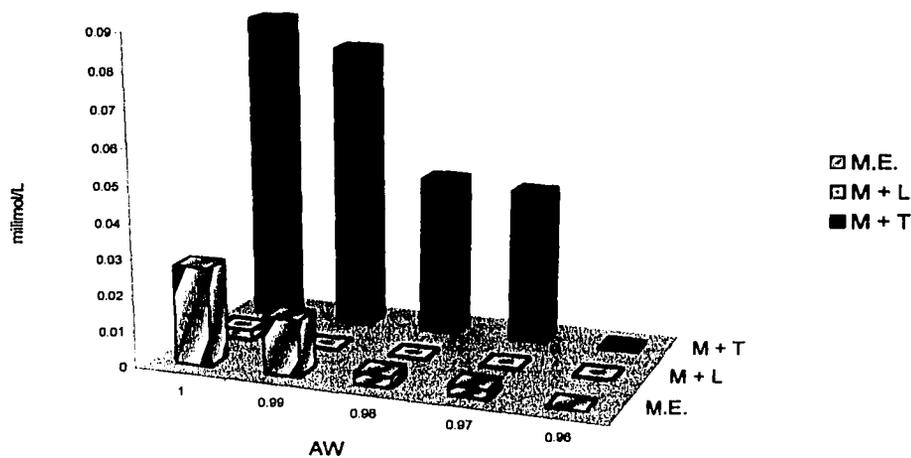


Gráfico 20. Producción acumulada de butirato de etilo en tres medios de cultivo con diferentes valores de Aw

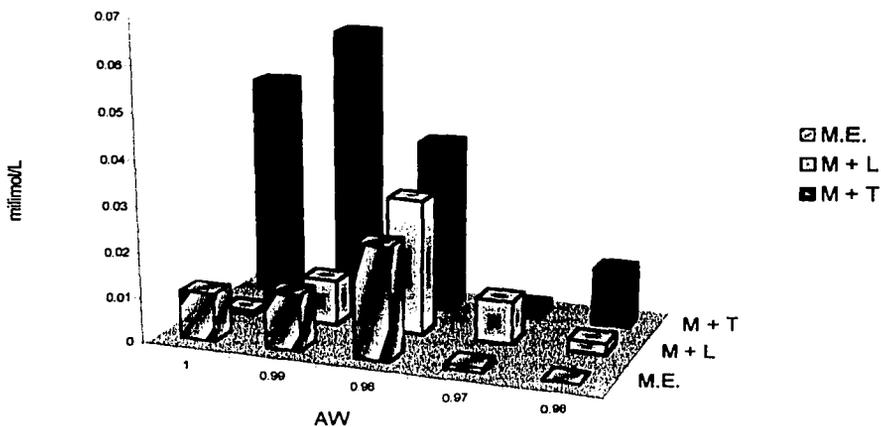


TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Propionato de etilo

La influencia del medio de cultivo y de la actividad acuosa en la producción del compuesto se observa en el *gráfico 21*. La producción máxima del volátil fue de 0.0616 milimol/L y se obtuvo en el M+T con $A_w=0.99$.

Gráfico 21. Producción acumulada de propionato de etilo en tres medios de cultivo con diferentes valores de A_w



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Observación microscópica

Figura 1. Cosecha de esporas de C. fimbriata, fotografía tomada en microscopio óptico a 40X. Tinción con azul de algodón.



Figura 2. Cosecha de esporas de C. fimbriata, fotografía tomada en microscopio óptico a 100X. Tinción con azul de algodón.

a)

b)

a)



Figura 3. Micelio septado de C. fimbriata. Las septas tienen 18 μm de longitud y 8 μm de ancho. Fotografía tomada en microscopio óptico a 100X. Tinción con azul de algodón.

b)



Figura 4. Esporas de C. fimbriata. Tienen 11 μm de longitud y 6 μm de ancho. Fotografía tomada en microscopio óptico a 100X. Tinción con azul de algodón.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Influencia de la Aw en el tamaño celular de *C. fimbriata*

Micelio en M.E con diferentes valores de Aw

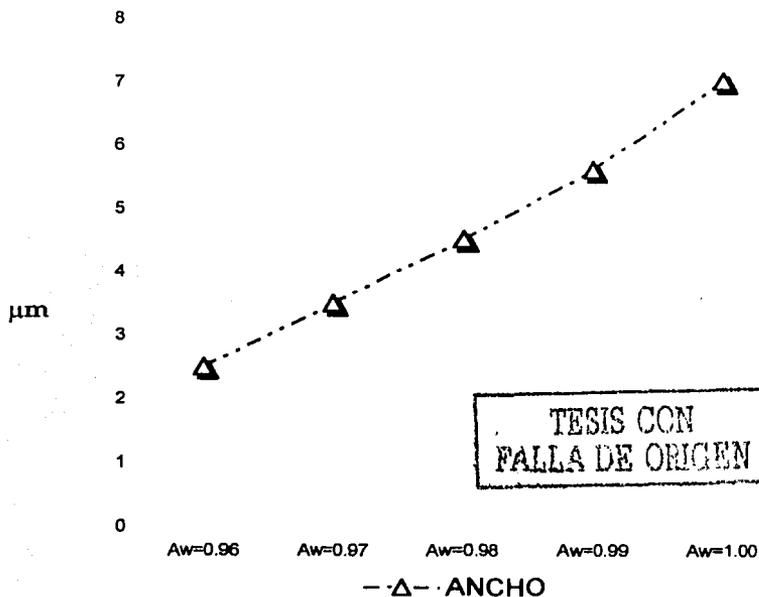


Figura 5. Micelio de *C. fimbriata* en M.E. con diferentes Aw. Se observa en orden progresivo el aumento en el diámetro. Fotografías tomadas en microscopio óptico a 100X. Tinción con azul de algodón.

Gráfico 22. Aumento progresivo en el diámetro del micelio de *C. fimbriata*.

Tabla 3. Diámetro del micelio en diferentes valores de Aw.

	Aw	Diámetro (μm)
A)	0.96	2-3
B)	0.97	3-4
C)	0.98	4-5
D)	0.99	5-6
E)	1.00	6-8



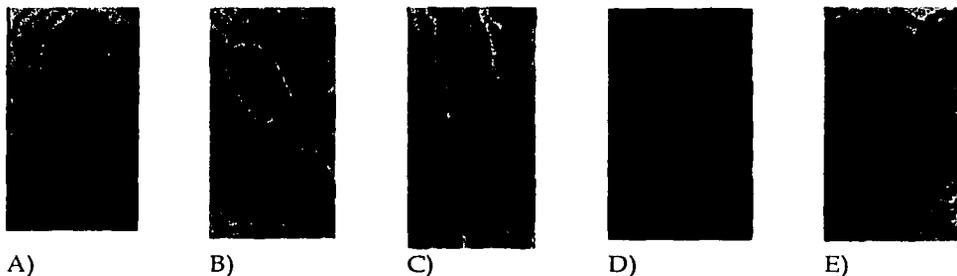
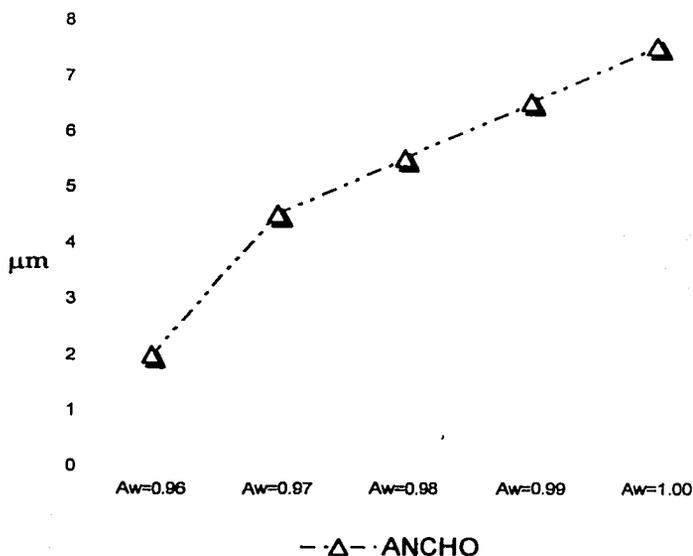
Micelio en M+L con diferentes valores de A_w 

Figura 6. Micelio de *C. fimbriata* en M+L con valores crecientes de A_w . El volumen del micelio aumenta al disminuir la presión osmótica. Fotografías tomadas en microscopio óptico a 100X. Tinción con azul de algodón.

Gráfico 23. Aumento progresivo en el diámetro del micelio de *C. fimbriata*.

Tabla 4. Diámetro del micelio en diferentes valores de A_w .

	A_w	Diámetro (μm)
A)	0.96	2
B)	0.97	4-5
C)	0.98	5-6
D)	0.99	6-7
E)	1.00	7-8



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

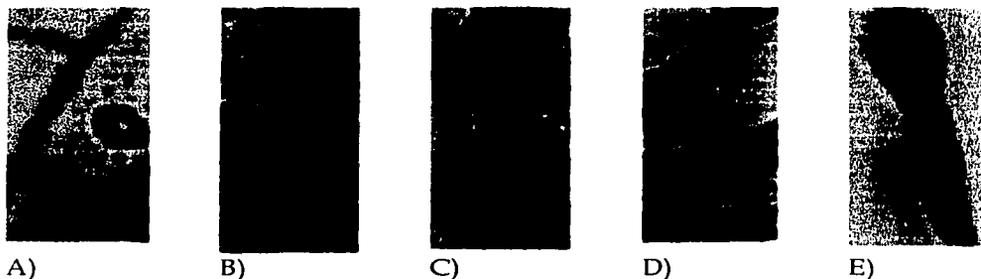
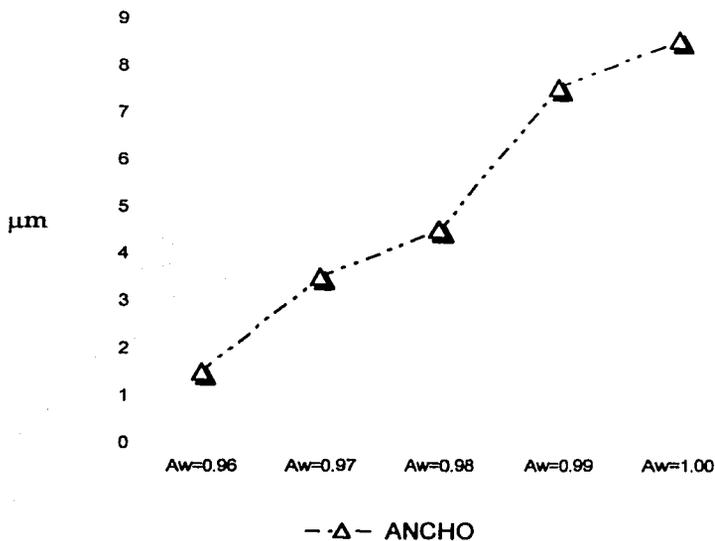
Micelio en M+T con diferentes valores de A_w 

Figura 7. Micelio de *C. fimbriata* en M.T. con diferentes valores de A_w . Al disminuir la presión osmótica aumenta progresivamente el diámetro del micelio. Fotografías tomadas en microscopio óptico a 100X. Tinción con azul de algodón

Tabla 5. Diámetro del micelio en diferentes valores de A_w .

	A_w	Diámetro (μm)
A)	0.96	1-2
B)	0.97	3-4
C)	0.98	4-5
D)	0.99	5-7
E)	1.00	8-9

Gráfico 24. Aumento progresivo en el diámetro del micelio de *C. fimbriata*.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Influencia de la Aw en el tamaño celular de *C. fimbriata*

Esporas en M.E con diferentes valores de Aw

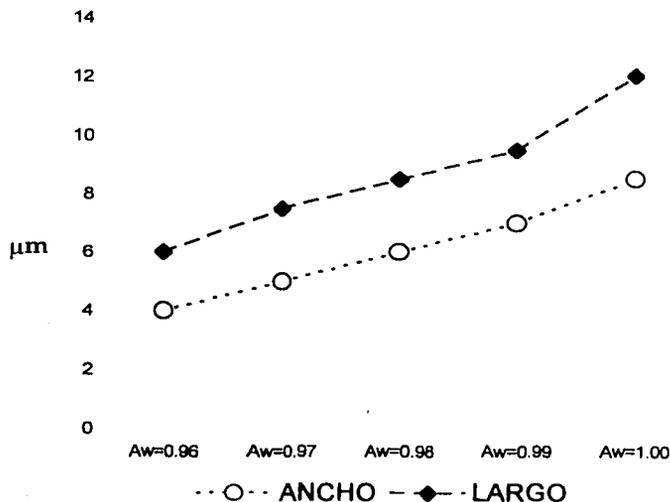


Figura 8. Esporas de *C. fimbriata* en M.E. con diferentes Aw. Se observa en orden progresivo el incremento en el tamaño celular. Fotografías tomadas en microscopio óptico a 100X. Tinción con azul de algodón.

Tabla 6. Aumento progresivo de Aw y del tamaño celular.

	Aw	Largo (μm)	Diámetro (μm)
A)	0.96	6.0	4.0
B)	0.97	7.5	5.0
C)	0.98	8.5	6.0
D)	0.99	9.5	7.0
E)	1.00	12	8.5

Gráfico 25. Con el aumento de la Aw las esporas tienden a ser más grandes.



TESIS DE
FALLA DE ORIGEN

Influencia de la Aw en el tamaño celular de *C. fimbriata*

Esporas en M+L con diferentes valores de Aw



A)

B)

C)

D)

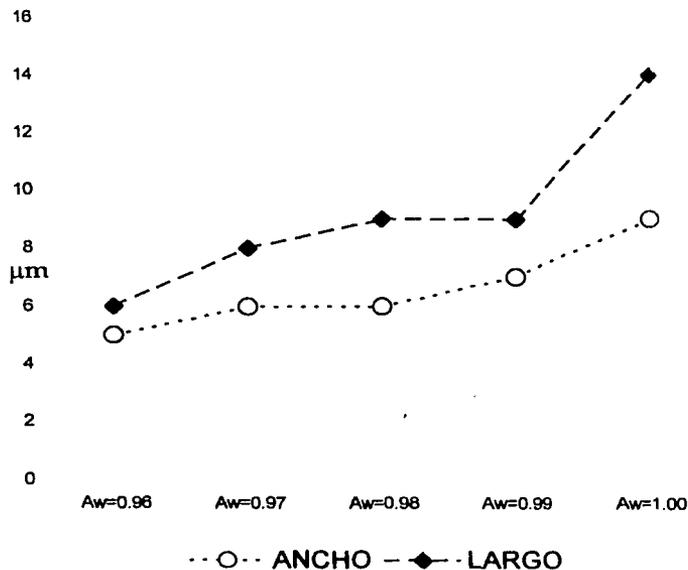
E)

Figura 9. Esporas de *C. fimbriata* en M+L con valores de Aw en aumento. El tamaño celular se incrementa progresivamente junto con el aumento de la Aw. Fotografías tomadas en microscopio óptico a 100X. Tinción con azul de algodón.

Gráfico 26. Con el aumento de la Aw las esporas tienden a ser más grandes.

Tabla 7. Aumento progresivo de Aw y del tamaño celular.

	Aw	Largo (μm)	Diámetro (μm)
A)	0.96	6	5
B)	0.97	8	6
C)	0.98	9	6
D)	0.99	9	7
E)	1.00	14	9



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Influencia de la Aw en el tamaño celular de *C. fimbriata*

Esporas en M+T con diferentes valores de Aw

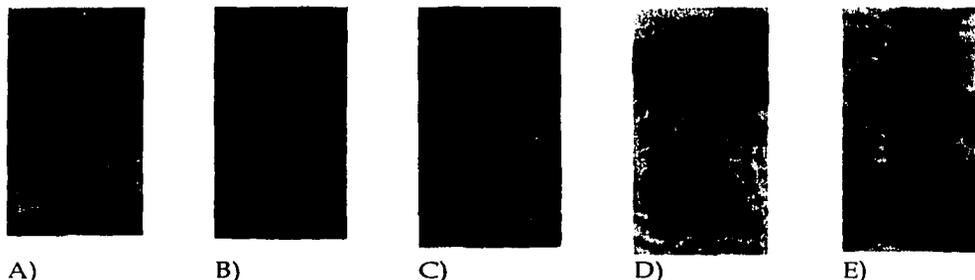
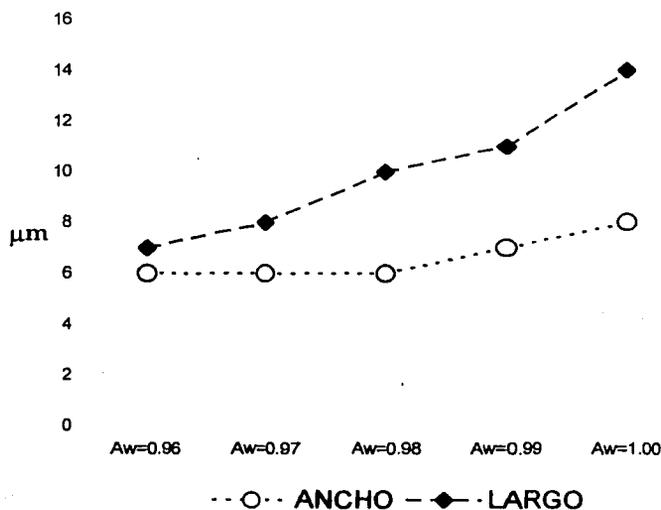


Figura 10. Esporas de *C. fimbriata* en M.E. con diferentes Aw. Se observa en orden progresivo el incremento en el tamaño celular. Fotografías tomadas en microscopio óptico a 100X. Tinción con azul de algodón.

Tabla 8. Aumento progresivo de Aw y del tamaño celular.

	Aw	Largo (μm)	Ancho (μm)
A)	0.96	7	6
B)	0.97	8	6
C)	0.98	10	6
D)	0.99	11	7
E)	1.00	14	8

Gráfico 27. Con el aumento de la Aw las esporas tienden a ser más grandes.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Biomasa y pH

La disminución del pH en el medio estándar durante la producción de biomasa indica agotamiento del sustrato y presencia de los productos formados por el hongo (ácidos carboxílicos).³⁶ En la tabla y gráfico de biomasa y pH a las 72 horas de iniciada la cinética se observa un descenso significativo en el pH lo cual señala el inicio de la fase exponencial de crecimiento.

Efecto de la Aw sobre la biomasa

La influencia de la Aw en la producción de biomasa es significativa en valores menores de 0.99 no importando la adición de un nutriente extra como la leucina o tiamina al medio de cultivo estándar. A valores menores de Aw menor biomasa (*tablas y gráficos de resultados 2, 3 y 4*).

La necesidad celular de sobrevivir a cambios drásticos de Aw impone el metabolismo orientado hacia la resistencia y tolerancia al medio externo antes que la reproducción del hongo. Probablemente la respuesta al estrés en $Aw=0.99$ está orientada a la síntesis de solutos con el fin de restaurar la presión osmótica, la forma y el volumen celular.^{26 y 31}

Por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*²² y *Trichoderma viride*³³ efectúan la síntesis de compuestos de bajo peso molecular ya que intervienen eficientemente en la osmorregulación.

Aw y pH

Si comparamos las *tablas y los gráficos de resultados 5, 6 y 7* resalta el hecho de que el pH es independiente de la Aw que se maneje y sí depende del nutriente extra.

Para el M.E. y M+L es claro que el pH es inversamente proporcional a la biomasa. El comportamiento del pH en el M+L puede explicarse a la desaminación de la leucina y formación de amoníaco. En el caso de M+T, la tiamina favorece la esterificación de ácidos carboxílicos y prácticamente no cambia el pH, *ver tablas y gráficos de resultados 5, 6, 7*.³⁶

Producción de volátiles

La producción de cada compuesto del aroma se vió determinada por las condiciones de cultivo. No siempre el efecto de la tensión acuosa sobre la cinética de producción de volátiles de C. fimbriata fue positivo.

La adición de tiamina al medio incrementó en la mayoría de los casos la producción de los volátiles a su vez la tiamina favorece el crecimiento de peritecio en el hongo y al existir más biomasa la síntesis de compuestos del aroma aumenta.

Durante la fermentación se producen compuestos como; acetaldehído, acetona, etanol, isopropanol y butanol. Las condiciones de fermentación influyen en la concentración final de los productos.

A continuación se presentan las condiciones de mayor producción para cada volátil.

Acetaldehído

El medio de cultivo es determinante en este caso (*gráfico de resultados 8*) ya que para cualquier valor de A_w la producción del compuesto fue mayor en el M+T que en el M.E. Al aumentar la presión osmótica sólo en el caso de $A_w=0.99$ la síntesis del volátil fue mayor que en $A_w=1.00$.

Acetona

La producción de acetona depende principalmente de la A_w y no del medio. En el M.E. en $A_w=0.98$ se obtuvo la mayor producción pero la producción del M+T con $A_w=0.99$ es muy próxima, *ver gráfico de resultados 9*.

Diacetilo

La mayor producción de diacetilo se obtuvo en el M+T con $A_w=0.99$. Como se muestra en el *gráfico de resultados 10* existe gran interacción entre el medio de cultivo y la A_w ya que al aumentar la presión osmótica se produjo más compuesto en los casos de M.E y M+T.

Etanol

En M+T se obtuvo la mayor producción de etanol y se produjo más que en el M.E inclusive en $A_w=0.96$. La adición de tiamina determinó la producción del volátil y la interacción con la A_w fue favorable sólo en el caso de M+T y $A_w=0.99$ como se observa en el *gráfico de resultados 11*.

Alcohol amílico

En este caso la presión osmótica fue un factor limitante en la producción del compuesto. En todos los medios de cultivo al disminuir la A_w también se produjo menos compuesto. La producción de alcohol amílico en el M.E. y M+T es prácticamente la misma, *ver gráfico de resultados 12*.

Alcohol isoamílico

La máxima producción del volátil se obtuvo en el M+L. La A_w tuvo un efecto negativo en la síntesis del compuesto, *ver el gráfico de resultados 13*.

Butanol

La A_w interactúa negativamente con el medio de cultivo. El medio de cultivo determina la producción de butanol y la influencia de la leucina y la tiamina en este caso es negativa. En el *gráfico de resultados 14* se observa que en M.E con $A_w=1.00$ hubo la mayor producción del compuesto.

Isobutanol

El efecto del medio de cultivo y de la A_w no es significativo en la producción de éste volátil ya que el rendimiento fue semejante. La mayor producción se obtuvo en M.E. y M+L con 0.98 y 0.99 de A_w respectivamente. Cabe señalar que al observar el *gráfico de resultados 15* se resalta el hecho de que en el M+T la producción fue constante a pesar del cambio de A_w .

Isopropanol

El aumento de la presión osmótica en algunos casos influyó en la mayor producción de isopropanol. Si observamos el *gráfico de resultados 16* la producción máxima es en los valores de A_w menores de 0.99. En el caso de $A_w=0.96$ la producción es mínima en cualquier medio porque hay gran presión osmótica. Es fácil observar que la interacción del M+L con $A_w=0.98$ aumentó la producción del volátil.

Acetato de etilo

El medio de cultivo es determinante en la producción de acetato de etilo, la adición de tiamina al medio favoreció su producción inclusive en $A_w=0.96$. La disminución de los valores de A_w tuvo un efecto negativo en la síntesis del compuesto, *ver el gráfico de resultados 17*.

Acetato de isobutilo

Se observa en el *gráfico de resultados 18* que una vez más que en el M+T con $A_w=0.99$ es en donde hubo una mayor producción de volátil. La interacción del medio con la tensión acuosa fue positiva en este caso para las condiciones antes mencionadas.

Acetato de isoamilo

El efecto del aumento de la presión osmótica fue negativo en cualquier medio para la síntesis de este compuesto. La máxima producción se obtuvo en el M+T con $A_w=1.00$, ver el *gráfico de resultados 19*.

Butirato de etilo

La producción de butirato de etilo se afecta con la disminución de la A_w . En el M+T siempre se sintetizó el compuesto a pesar del aumento de la presión osmótica, ver el *gráfico de resultados 20*.

Propionato de etilo

En el M+T con $A_w=0.99$ se obtuvo la máxima producción del volátil, no sólo en este caso la interacción del medio y de la presión osmótica fue positivo, en el caso de $A_w=0.98$ se incrementa la síntesis en el M.E. y en el M+T con respecto a los demás valores de A_w , ver el *gráfico de resultados 21*.

En general el mejor medio la mayor producción de los compuestos del aroma se observó en el M+T con $A_w=0.99$. *Ceratocystis fimbriata* es un hongo filamentoso que carece de tiamina. La tiamina favorece el crecimiento de peritecio y al haber mayor biomasa se incrementa la síntesis de volátiles. ^{26 y 31}

- 1) En el caso del medio estándar y del medio más leucina la producción de biomasa de *Ceratocystis fimbriata* está relacionada directamente con el cambio de pH y con la producción de metabolitos.
- 2) En general la influencia de la Aw en la producción de biomasa es negativa en valores menores de 0.99 no importando la adición de un nutriente extra como la leucina o tiamina al medio de cultivo estándar.
- 3) Se observó interacción entre la Aw y el medio de cultivo esto es, la producción de cada compuesto del aroma es determinada por ambos factores.
- 4) La adición de leucina al medio favoreció la producción de alcohol isoamílico (ver página 43) pero la Aw tuvo un efecto negativo sobre la producción del compuesto.
- 5) El M+L no es recomendado para la producción de volátiles en general. El rendimiento fue bajo en prácticamente todos los casos y no se justifica el gasto del nutriente extra para la producción industrial de un solo compuesto.
- 6) En general la adición de tiamina tuvo un efecto positivo en la producción de volátiles, pero además en algunos casos se observó que la Aw favorecía e incrementaba la producción del compuesto.
- 7) Al comparar la concentración de volátiles totales se concluye que la adición de leucina o tiamina al medio sí favoreció la síntesis de compuestos del aroma y que se observó la máxima concentración en M+T.
- 8) La mayor producción de volátiles se presentó en el medio más tiamina con actividad acuosa de 0.99

Se sugiere aumentar el tiempo de estudio de la cinética de crecimiento hasta la fase estacionaria del medio más tiamina ya que las 120 horas no fueron suficientes por que cuando se llegó al límite aún existía crecimiento exponencial.

Los medios empleados en esta tesis fueron sintéticos y su costo puede incrementarse demasiado si se pensara en un proceso industrial, se sugiere revisar los estudios hasta ahora efectuados en C. fimbriata con medios de cultivo naturales (ejemplos; harinas de maíz, arroz y amaranto).

Por último, considerar el planteamiento de separar los volátiles producidos durante la fermentación. Existen estudios en donde se demuestra que al aumentar la concentración de los productos del metabolismo celular en el medio de cultivo pueden tener un efecto tóxico e inducir la muerte de la célula.

Información de aromas: Compuestos del aroma producidos por C. fimbriata, usos y umbrales de olor.

Compuesto	Aroma	Usos	Concentración Empleada	Referencia	Umbral del aroma.	Referencias
Aldehídos						
Acetaldehído	En altas diluciones reminiscente al café o vino	Manzana, durazno, plátano, piña	4 -25 ppm	Arctander, 1982 Fenaroli, 1975	15 ppb	Buttery et al 1988
Ésteres						
Acetato de etilo	Frutal	Plátano, piña, pera, manzana, durazno, melón, uva, menta	200 -1500 ppm	Arctander, 1982 Fenaroli, 1975	25 ppb	Mc Donald et al 1992
Acetato de isobutilo	Muy difusivo, etéreo, plátano, recuerda al ron (olor a fermentado), diluido es dulce y frutal	Plátano- piña-frambuesa- pera, fresa, mantequilla, tutifruiti	150 -160 ppm 800 -900 ppm en chicle	Arctander, 1982 Fenaroli, 1975		
Acetato de butilo	Muy difusivo, etéreo, frutal, pungente, reminiscente de muchas clases de fruta madura y pasada. Olor a pera, plátano, fresa	Plátano, piña, pera, durazno, fresa, chabacano, mantequilla	30 -35 ppm 200 ppm en chicle	Arctander, 1982 Fenaroli, 1975	8.8 ppm en jugo	Berger et al, 1992
Acetato de isoamilo	Olor a fruta fresca, pera, plátano, manzana, bergamota, plátano maduro	Plátano, pera, fresa, frambuesa, piña, manzana, caramelo, cola, coco, cereza, uva, mantequilla, durazno, ron, vainilla	200 ppm en dulces 3000 ppm en chicle	Arctander, 1982	2 ppm en cerveza	
Propionato de etilo	Etéreo, frutal	Ron, manzana, plátano, pera, piña, ciruela, mantequilla tutifruiti	10 - 100 ppm	Arctander, 1982		
Butirato de etilo	Piña dulce	Fresa, olivo y aceites vegetales	20 - 1400 ppm	Fenaroli's, 1975		

Información de aromas: Compuestos del aroma producidos por *C. fimbriata*, usos y umbrales de olor.

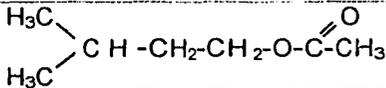
Compuesto	Aroma	Usos	Concentración Empleada	Referencia	Umbral del aroma.	Referencias
Alcoholes						
Amílico	Alcohólico	Bebidas alcohólicas y no alcohólicas, frutal	7 - 340 ppm		5 ppm	Maga, 1976
Butanol	Alcohólico seco	Bebidas alcohólicas y no alcohólicas,	12 - 34 ppm	Fenaroli, 1975	3 ppm	
Etanol	Alcohólico	Manzana, plátano, pera	1 - 34 ppm	Fenaroli, 1975	5.7 ppm	Maga, 1976
Isoamílico	Quemante	Frutales, bebidas alcohólicas y no alcohólicas	7 - 300 ppm		10 ppm	
Isopropanol	Alcohólico	Manzana, coñac	10 - 75 ppm			Maga, 1976
Isobutanol	Diluido suave, dulce, plátano	Cola, frutal, ron, mantequilla, licor	30 - 35 ppm	Arctander, 1982	7 ppm (100 en cerveza)	
Cetonas						
2-propanona	Dulce	Pera, manzana, uva, piña, fresa, frambuesa, café	5 - 10 ppm	Fenaroli, 1975		
Diacetilo	Olor penetrante a mantequilla	Bebidas alcohólicas, mantequilla	2 - 45 ppm		1 ppm	

Acetaldehído; etanal

<i>Fórmula empírica:</i> C ₂ H ₄ O	<i>Estructura química:</i> $\text{H}_3\text{C}-\overset{\text{H}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}$												
<i>Características físicas/químicas apariencia</i>	Líquido flamable, volátil e incoloro												
<i>Peso molecular</i>	44.05												
<i>Punto de fusión</i>	120.0 °C (123.3 °C)												
<i>Punto de ebullición</i>	20.8 °C												
<i>Punto de inflamación</i>	30.0 °C												
<i>Densidad específica</i>	0.8009												
<i>Índice de refracción</i>	1.3392 (18 °C)												
<i>Solubilidad</i>	Es soluble en agua, alcohol etílico y éter												
<i>Características organolépticas</i>	Olor característico penetrante e irritante												
<i>Se encuentra naturalmente en:</i>	<ul style="list-style-type: none"> ⇒ Hojas de: roble y tabaco ⇒ Aromas frutales de: pera, manzana, frambuesa, fresa, piña ⇒ En el agua de destilación de: lirio, comino ⇒ Aceites esenciales de: <i>Litsea cubeba</i>, <i>Magnolia grandiflora</i>, <i>Artemisia brevifolia</i>, romero, bálsamo, menta, narciso, naranja agria, alcanfor, angélica, hinojo, mostaza, etc. 												
<i>Usos reportados (en ppm)</i>	<table border="0"> <tr> <td>*Bebidas no alcohólicas</td> <td>3.9</td> <td>*Productos ahumados</td> <td>12.0</td> </tr> <tr> <td>*Helados</td> <td>25.0</td> <td>*Budines y gelatinas</td> <td>6.8</td> </tr> <tr> <td>*Dulces</td> <td>22.0</td> <td>*Goma de mascar</td> <td>20-270</td> </tr> </table>	*Bebidas no alcohólicas	3.9	*Productos ahumados	12.0	*Helados	25.0	*Budines y gelatinas	6.8	*Dulces	22.0	*Goma de mascar	20-270
*Bebidas no alcohólicas	3.9	*Productos ahumados	12.0										
*Helados	25.0	*Budines y gelatinas	6.8										
*Dulces	22.0	*Goma de mascar	20-270										

Acetato de etilo; éter acético

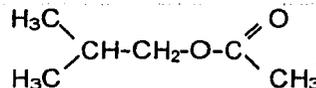
<i>Fórmula empírica:</i> C ₄ H ₈ O ₂	<i>Estructura química:</i> $\text{H}_3\text{C}-\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}-\text{CH}_2-\text{C H}_3$																
<i>Características físicas/químicas apariencia</i>	Líquido, fumante e incoloro																
<i>Ensayo</i>	99-100%																
<i>Peso molecular</i>	88.10																
<i>Punto de fusión</i>	- 83.4 °C																
<i>Punto de ebullición</i>	75-76 °C (77.11 °C)																
<i>Punto de inflamación</i>	3.0 °C																
<i>Densidad específica</i>	0.9000-0.9040 (0.9065-0.9070) a 15 °C																
<i>Índice de refracción</i>	1.3723 (1.3470) a 20 °C																
<i>Ensayo de acidez</i>	No más de 0.01%																
<i>Solubilidad</i>	En prácticamente todos los disolventes orgánicos; es soluble en alcohol etílico, éter y en agua (1:10)																
<i>Características organolépticas</i>	Olor característico semejante al éter, sabor dulce y quemante																
<i>Se encuentra naturalmente en</i>	<ul style="list-style-type: none"> > Se ha reportado su presencia en algunos aromas frutales y en destilados. > Se ha identificado en los pétalos de <i>Magnolia fuscata</i> 																
<i>Usos reportados (en ppm)</i>	<table border="0"> <tr> <td>*Bebidas no alcohólicas</td> <td>67.0</td> <td>*Productos ahumados</td> <td>170.0</td> </tr> <tr> <td>*Bebidas alcohólicas</td> <td>50-65</td> <td>*Budines y gelatinas</td> <td>200.0</td> </tr> <tr> <td>*Helados</td> <td>99.0</td> <td>*Goma de mascar</td> <td>1400.0</td> </tr> <tr> <td>*Dulces</td> <td>170.0</td> <td></td> <td></td> </tr> </table>	*Bebidas no alcohólicas	67.0	*Productos ahumados	170.0	*Bebidas alcohólicas	50-65	*Budines y gelatinas	200.0	*Helados	99.0	*Goma de mascar	1400.0	*Dulces	170.0		
*Bebidas no alcohólicas	67.0	*Productos ahumados	170.0														
*Bebidas alcohólicas	50-65	*Budines y gelatinas	200.0														
*Helados	99.0	*Goma de mascar	1400.0														
*Dulces	170.0																

Acetato de isoamilo; β-metilbutil acetato													
<i>Fórmula empírica:</i> C ₇ H ₁₄ O ₂	<i>Estructura química:</i> 												
<i>Características físicas/químicas apariencia</i>	Líquido incoloro												
<i>Ensayo</i>	95% mínimo												
<i>Peso molecular</i>	130.18												
<i>Punto de fusión</i>	-78.5 °C												
<i>Punto de ebullición</i>	142.5 °C; 30 °C a 2 mm de Hg												
<i>Densidad específica</i>	0.868-0.878 a 25 °C												
<i>Índice de refracción</i>	1.4000-1.4040 a 20 °C; 1.4017 a 18 °C												
<i>Ensayo de acidez</i>	No más de 1												
<i>Solubilidad</i>	Soluble en alcohol etílico al 60% en 1:3 ó más; prácticamente insoluble en agua; soluble en éter y en la mayoría de los disolventes orgánicos												
<i>Características organolépticas</i>	Olor a frutas, penetrante, con sabor agrídulce y semejante a pera; impuro el olor es fuerte, penetrante e irritante												
<i>Se encuentra naturalmente en:</i>	⇒ Se ha identificado en la porción de volátiles de plátano y en la semilla de cacao												
<i>Usos reportados (en ppm)</i>	<table border="0"> <tr> <td>*Bebidas no alcohólicas</td> <td>28.0</td> <td>*Productos ahumados</td> <td>120.0</td> </tr> <tr> <td>*Helados</td> <td>56.0</td> <td>*Budines y gelatinas</td> <td>100.0</td> </tr> <tr> <td>*Dulces</td> <td>190.0</td> <td>*Goma de mascar</td> <td>2700.0</td> </tr> </table>	*Bebidas no alcohólicas	28.0	*Productos ahumados	120.0	*Helados	56.0	*Budines y gelatinas	100.0	*Dulces	190.0	*Goma de mascar	2700.0
*Bebidas no alcohólicas	28.0	*Productos ahumados	120.0										
*Helados	56.0	*Budines y gelatinas	100.0										
*Dulces	190.0	*Goma de mascar	2700.0										

Acetato de isobutilo

Fórmula empírica: C₆H₁₂O₂

Estructura química:



Características físicas/químicas apariencia

Líquido incoloro

Ensayo

95 % mínimo

Peso molecular

116.16

Punto de ebullición

116.5 °C

Punto de inflamación

30.0 °C (19 °C)

Densidad específica

0.8710-0.8785 a 15 °C

Índice de refracción

1.3890-1.3910 a 20 °C

Solubilidad

Soluble en prácticamente todos los disolventes orgánicos

Características organolépticas

Olor frutal (grosella-pera) y floral (jacinto-rosa); sabor semejante al del éter y ligeramente agrio

Se encuentra naturalmente en

➤ *Endoconidiophora coerulescens*, frambuesa, pera, piña

Usos reportados (en ppm)

*Bebidas no alcohólicas	1.0	*Budines y gelatinas	170.0
*Helados	16.0	*Goma de mascar	860.0
*Dulces	36.0	*Glaciados	5.5
*Productos ahumados	35.0		

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Acetona; 2-propanona; dimetil cetona; β-cetopropano; éter piroacético													
<i>Fórmula empírica :</i> C ₃ H ₆ O	<i>Estructura química:</i> $\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C} \\ \diagdown \\ \text{C}=\text{O} \\ \diagup \\ \text{H}_3\text{C} \end{array}$												
<i>Características físicas/químicas apariencia</i>	Líquido altamente flamable, volátil e incoloro												
<i>Peso molecular</i>	58.08												
<i>Punto de fusión</i>	- 95.35 °C												
<i>Punto de ebullición</i>	57.0 °C												
<i>Punto de inflamación</i>	- 20.0 °C												
<i>Densidad específica</i>	0.7880 a 25 °C y 0.8186 a 0 °C												
<i>Índice de refracción</i>	1.3588 (20 °C)												
<i>Solubilidad</i>	Es soluble en agua (a cualquier proporción), alcohol etílico, éter, benceno y cloroformo												
<i>Características organolépticas</i>	Olor característico e irritante, sabor dulce												
<i>Se encuentra naturalmente en</i>	⇒ Pera, manzana, uva, piña, frambuesa, fresa, grosella, cacao, patata, tomate, cebolla, ⇒ Aceites de: naranja agria , cilantro y lavanda ⇒ Se ha identificado en el aroma del café												
<i>Usos reportados (en ppm)</i>	<table border="1"> <tr> <td>*Bebidas no alcohólicas</td> <td>5.0</td> <td>*Productos ahumados</td> <td>8.0</td> </tr> <tr> <td>*Helados</td> <td>5.0</td> <td>*Budines y gelatinas</td> <td>5.0</td> </tr> <tr> <td>*Dulces</td> <td>8.0</td> <td></td> <td></td> </tr> </table>	*Bebidas no alcohólicas	5.0	*Productos ahumados	8.0	*Helados	5.0	*Budines y gelatinas	5.0	*Dulces	8.0		
*Bebidas no alcohólicas	5.0	*Productos ahumados	8.0										
*Helados	5.0	*Budines y gelatinas	5.0										
*Dulces	8.0												

Alcohol amílico; 1-pentanol; alcohol pentílico

<i>Fórmula empírica :</i> C ₅ H ₁₂ O	<i>Estructura química:</i> CH ₃ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ OH												
<i>Características físicas/químicas apariencia</i>	Líquido incoloro												
<i>Peso molecular</i>	88.15												
<i>Punto de fusión</i>	-73.85 °C (-78.5 °C)												
<i>Punto de ebullición</i>	138.06 °C (137.8-138°C)												
<i>Punto de inflamación</i>	39.0 °C												
<i>Densidad específica</i>	0.8144 a 20 °C												
<i>Índice de refracción</i>	1.4113 a 20 °C												
<i>Solubilidad</i>	En agua 1:5 a 30 °C; miscible en prácticamente todos los disolventes orgánicos												
<i>Características organolépticas</i>	Olor característico, sabor quemante; es más tóxico que el alcohol etílico > En aceites esenciales de: menta americana y brasileña; orégano español; algodón; <i>Thymus marshallianus</i> , <i>Artemisia herba-alba</i> , <i>Eucalyptus cornuta</i> , <i>Eucalyptus aggregata</i> , > Se ha identificado como constituyente del aceite de naranja agria												
<i>Se encuentra naturalmente en</i>													
<i>Usos reportados (en ppm)</i>	<table border="1"> <tr> <td>*Bebidas no alcohólicas</td> <td>18.0</td> <td>*Productos ahumados</td> <td>24.0</td> </tr> <tr> <td>*Helados</td> <td>15.0</td> <td>*Budines y gelatinas</td> <td>7.7-50</td> </tr> <tr> <td>*Dulces</td> <td>35.0</td> <td>*Goma de mascar</td> <td>150-340</td> </tr> </table>	*Bebidas no alcohólicas	18.0	*Productos ahumados	24.0	*Helados	15.0	*Budines y gelatinas	7.7-50	*Dulces	35.0	*Goma de mascar	150-340
*Bebidas no alcohólicas	18.0	*Productos ahumados	24.0										
*Helados	15.0	*Budines y gelatinas	7.7-50										
*Dulces	35.0	*Goma de mascar	150-340										

Alcohol isoamílico; isobutil carbinol; alcohol isopentílico; 3-metil-1-butanol																	
<i>Fórmula empírica</i> : C ₅ H ₁₂ O	<i>Estructura química</i> : $\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C} \\ \diagdown \\ \text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{OH} \\ \diagup \\ \text{H}_3\text{C} \end{array}$																
<i>Características físicas/químicas apariencia</i>	Líquido aceitoso transparente																
<i>Peso molecular</i>	88.15																
<i>Punto de fusión</i>	- 117.2 °C																
<i>Punto de ebullición</i>	132.0 °C																
<i>Densidad específica</i>	0.812 a 20 °C																
<i>Índice de refracción</i>	1.4084 a 17.8 °C																
<i>Solubilidad</i>	Soluble en agua; es soluble en prácticamente todos los disolventes orgánicos																
<i>Características organolépticas</i>	Olor característico irritante; sabor repulsivo																
<i>Se encuentra naturalmente en</i>	⇒ Como producto de fermentación del alcohol amílico ⇒ Se ha identificado como constituyente de muchos aceites esenciales (menta; geraneo, cidronela, <i>Teucrium chamaedrys</i> , <i>Artemisia camphorata</i> , <i>Eucalyptus amigdalina</i> , etc.) ⇒ En aromas de fresa y frambuesa																
<i>Usos reportados (en ppm)</i>	<table border="0"> <tr> <td>*Bebidas no alcohólicas</td> <td>17.0</td> <td>*Productos ahumados</td> <td>24.0</td> </tr> <tr> <td>*Bebidas alcohólicas</td> <td>100.0</td> <td>*Budines y gelatinas</td> <td>46.0</td> </tr> <tr> <td>*Helados</td> <td>7.6</td> <td>*Goma de mascar</td> <td>300.0</td> </tr> <tr> <td>*Dulces</td> <td>52.0</td> <td></td> <td></td> </tr> </table>	*Bebidas no alcohólicas	17.0	*Productos ahumados	24.0	*Bebidas alcohólicas	100.0	*Budines y gelatinas	46.0	*Helados	7.6	*Goma de mascar	300.0	*Dulces	52.0		
*Bebidas no alcohólicas	17.0	*Productos ahumados	24.0														
*Bebidas alcohólicas	100.0	*Budines y gelatinas	46.0														
*Helados	7.6	*Goma de mascar	300.0														
*Dulces	52.0																

Alcohol butílico; 1-butanol; alcohol n-butílico

<i>Fórmula empírica</i> : C ₄ H ₁₀ O	<i>Estructura química</i> : CH ₃ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ OH												
<i>Características físicas/químicas apariencia</i>	Líquido incoloro												
<i>Peso molecular</i>	74.12												
<i>Temperatura de congelación</i>	-90 °C												
<i>Punto de ebullición</i>	117-118 °C												
<i>Punto de inflamación</i>	35-36 °C												
<i>Densidad específica</i>	0.8096-0.8099 a 20 °C												
<i>Índice de refracción</i>	1.39949 a 20 °C												
<i>Solubilidad</i>	En agua 1:11- 1:12 ; soluble en alcohol etílico y éter												
<i>Características organolépticas</i>	Olor similar al del alcohol amílico; su sabor es seco y quemante <ul style="list-style-type: none"> ➤ En aceites esenciales de: menta del Brasil; <i>Achillea ageratum</i>, té ➤ En el aroma de las manzanas 												
<i>Se encuentra naturalmente en</i>													
<i>Usos reportados (en ppm)</i>	<table border="0"> <tr> <td>*Bebidas no alcohólicas</td> <td>12.0</td> <td>*Dulces</td> <td>34.0</td> </tr> <tr> <td>*Bebidas alcohólicas</td> <td>1.0</td> <td>*Productos ahumados</td> <td>32.0</td> </tr> <tr> <td>*Helados</td> <td>7.0</td> <td>*Cremas</td> <td>4.0</td> </tr> </table>	*Bebidas no alcohólicas	12.0	*Dulces	34.0	*Bebidas alcohólicas	1.0	*Productos ahumados	32.0	*Helados	7.0	*Cremas	4.0
*Bebidas no alcohólicas	12.0	*Dulces	34.0										
*Bebidas alcohólicas	1.0	*Productos ahumados	32.0										
*Helados	7.0	*Cremas	4.0										

Butirato de etilo													
<i>Fórmula empírica :</i> C ₆ H ₁₂ O ₂	<i>Estructura química:</i> CH ₃ -CH ₂ -CH ₂ -C(=O)-CH ₂ -CH ₃												
<i>Características físicas/químicas apariencia</i>	Líquido incoloro												
<i>Ensayo</i>	Mínimo 98 % (97.5%)												
<i>Peso molecular</i>	116.16												
<i>Punto de ebullición</i>	121-122 °C												
<i>Punto de inflamación</i>	26 °C												
<i>Densidad específica</i>	0.870-0.877 a 25 °C/ 0.8825-0.8860 a 15 °C												
<i>Índice de refracción</i>	1.3910-1.3940 a 20 °C												
<i>Evaluación de acidez</i>	No más de 1												
<i>Solubilidad</i>	1:3 en alcohol etílico al 60%; 1:1-1.5 alcohol etílico al 70%												
<i>Características organolépticas</i>	Olor y sabor a piña dulce												
<i>Se encuentra naturalmente en</i>	⇒ Se ha identificado mediante cromatografía de gases en el aceite de olivo y en aceites de otros vegetales. En jugo de fresa												
<i>Usos reportados (en ppm)</i>	<table border="0"> <tr> <td>*Bebidas no alcohólicas</td> <td>28.0</td> <td>*Productos ahumados</td> <td>93.0</td> </tr> <tr> <td>*Helados</td> <td>44.0</td> <td>*Gelatinas y budines</td> <td>54.0</td> </tr> <tr> <td>*Dulces</td> <td>98.0</td> <td>*Goma de mascar</td> <td>1400.0</td> </tr> </table>	*Bebidas no alcohólicas	28.0	*Productos ahumados	93.0	*Helados	44.0	*Gelatinas y budines	54.0	*Dulces	98.0	*Goma de mascar	1400.0
*Bebidas no alcohólicas	28.0	*Productos ahumados	93.0										
*Helados	44.0	*Gelatinas y budines	54.0										
*Dulces	98.0	*Goma de mascar	1400.0										

Diacetilo; biacetilo													
<i>Fórmula empírica :</i> C ₄ H ₆ O ₂	<i>Estructura química:</i> H ₃ C-C(=O)-C(=O)-CH ₃												
<i>Características físicas/químicas apariencia</i>	Líquido amarillo verdoso, volátil												
<i>Peso molecular</i>	86.09												
<i>Punto de fusión</i>	-3 a -4 °C												
<i>Punto de ebullición</i>	87-88 °C												
<i>Densidad específica</i>	0.9734 a 22 °C												
<i>Índice de refracción</i>	1.3933 a 18.5 °C												
<i>Solubilidad</i>	Soluble en casi todos los disolventes orgánicos; miscible en agua en 1:4												
<i>Características organolépticas</i>	<p>Olor penetrante y muy fuerte semejante al de la mantequilla derretida; concentrado tiene olor similar a cloro quinona</p> <ul style="list-style-type: none"> > En aceites de: piña, angélica, geraneo y lavanda > En flores: <i>Polyalthia canangioides</i> var. <i>Angustifolia</i> y <i>Fagroea racemosa</i> > En plantas: <i>Monodora grandiflora</i>, <i>Magnolia tripetale</i>, <i>Ximenia aegyptiaca</i>, <i>Petasites fragrans</i>, narcisos y tulipanes > En los aromas naturales de: fresa, frambuesa > La mantequilla de buena calidad contiene no menos de 1.2 mg y no más de 2.5 mg de diacetilo por Kg. 												
<i>Se encuentra naturalmente en</i>													
<i>Usos reportados (en ppm)</i>	<table border="0"> <tr> <td>*Bebidas no alcohólicas</td> <td>2.5</td> <td>* Mantequilla</td> <td>11.0</td> </tr> <tr> <td>*Helados</td> <td>5.9</td> <td>*Goma de mascar</td> <td>35.0</td> </tr> <tr> <td>*Dulces</td> <td>21.0</td> <td>*Productos ahumados</td> <td>44.0</td> </tr> </table>	*Bebidas no alcohólicas	2.5	* Mantequilla	11.0	*Helados	5.9	*Goma de mascar	35.0	*Dulces	21.0	*Productos ahumados	44.0
*Bebidas no alcohólicas	2.5	* Mantequilla	11.0										
*Helados	5.9	*Goma de mascar	35.0										
*Dulces	21.0	*Productos ahumados	44.0										

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Etanol: alcohol etílico;	
<i>Fórmula empírica :</i> C ₂ H ₆ O	$\begin{array}{c} \text{H H} \\ \\ \text{H-C-C-OH} \\ \\ \text{H H} \end{array}$ <i>Estructura química:</i>
<i>Características físicas/químicas apariencia</i>	Líquido incoloro, transparente, inflamable, volátil
<i>Peso molecular</i>	46.07
<i>Punto de fusión</i>	- 114.1 °C
<i>Punto de ebullición</i>	78.5 °C
<i>Punto de inflamación</i>	13 °C
<i>Densidad específica</i>	0.789 a 20 °C
<i>Índice de refracción</i>	1.361 20 °C
<i>Solubilidad</i>	Es miscible en agua y en prácticamente todos los disolventes orgánicos
<i>Características organolépticas</i>	Olor agradable, sabor quemante
<i>Se encuentra naturalmente en</i>	⇒ Aromas frutales: manzana, plátano

Isobutanol; alcohol isobutilico; 2-metilpropanol

<i>Fórmula empírica :</i> C ₄ H ₁₀ O	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C} \\ \diagdown \\ \text{CH-CH}_2\text{OH} \\ \diagup \\ \text{H}_3\text{C} \end{array}$ <i>Estructura química:</i>												
<i>Características físicas/químicas apariencia</i>	Líquido												
<i>Peso molecular</i>	74.42												
<i>Punto de fusión</i>	-108 °C												
<i>Punto de ebullición</i>	108.4 °C												
<i>Densidad específica</i>	0.803 a 20 °C												
<i>Índice de refracción</i>	1.396 a 20 °C												
<i>Solubilidad</i>	Soluble en agua (forma azeotropos); miscible en prácticamente todos los disolventes orgánicos												
<i>Características organolépticas</i>	Olor desagradable												
<i>Se encuentra naturalmente (libre o esterificado) en</i>	> En aceites esenciales de: citronela de Java, té, <i>Eucalyptus amygdalina</i> , y algunos otros > En los aromas de: manzana y grosella												
<i>Usos reportados (en ppm)</i>	<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td>*Bebidas no alcohólicas</td> <td>12.0</td> <td>*Dulces</td> <td>34.0</td> </tr> <tr> <td>*Bebidas alcohólicas</td> <td>1.0</td> <td>*Productos ahumados</td> <td>32.0</td> </tr> <tr> <td>*Helados</td> <td>7.0</td> <td>*Cremas</td> <td>4.0</td> </tr> </table>	*Bebidas no alcohólicas	12.0	*Dulces	34.0	*Bebidas alcohólicas	1.0	*Productos ahumados	32.0	*Helados	7.0	*Cremas	4.0
*Bebidas no alcohólicas	12.0	*Dulces	34.0										
*Bebidas alcohólicas	1.0	*Productos ahumados	32.0										
*Helados	7.0	*Cremas	4.0										

Isopropanol; alcohol isopropílico; 2-propanol							
<i>Fórmula empírica</i> : C ₃ H ₈ O	<i>Estructura química</i> : $\begin{array}{c} \text{CH}_3\text{-CH-CH}_3 \\ \\ \text{OH} \end{array}$						
<i>Características físicas/químicas apariencia</i>	Líquido incoloro						
<i>Peso molecular</i>	60.09						
<i>Punto de fusión</i>	- 81.0 a 83.0 °C						
<i>Punto de ebullición</i>	82.3 a 82.4 °C						
<i>Punto de inflamación</i>	15 °C						
<i>Densidad específica</i>	0.7854 a 20 °C						
<i>Índice de refracción</i>	0.37757 a 20 °C						
<i>Solubilidad</i>	Miscible en agua, alcohol, éter y cloroformo						
<i>Características organolépticas</i>	Olor alcohólico, un poco desagradable; sabor quemante						
<i>Se encuentra naturalmente (en forma esterificada) en</i>	⇒ Aromas: manzana y coñac						
<i>Usos reportados (en ppm)</i>	<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td>*Bebidas no alcohólicas</td> <td style="text-align: right;">25.0</td> </tr> <tr> <td>*Dulces</td> <td style="text-align: right;">10.0-75.0</td> </tr> <tr> <td>*Productos ahumados</td> <td style="text-align: right;">75.0</td> </tr> </table>	*Bebidas no alcohólicas	25.0	*Dulces	10.0-75.0	*Productos ahumados	75.0
*Bebidas no alcohólicas	25.0						
*Dulces	10.0-75.0						
*Productos ahumados	75.0						

Propionato de etilo													
<i>Fórmula empírica</i> : C ₅ H ₁₀ O ₂	<i>Estructura química</i> : $\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-C-O-CH}_2\text{-CH}_3 \end{array}$												
<i>Características físicas/químicas apariencia</i>	Líquido incoloro, volátil												
<i>Ensayo</i>	No menos del 98 %												
<i>Peso molecular</i>	102.14												
<i>Punto de fusión</i>	99 °C												
<i>Punto de inflamación</i>	12 °C (aproximadamente 15°C)												
<i>Densidad específica</i>	0.8945-0.8985 a 15 °C; 0.8917 a 20 °C												
<i>Índice de refracción</i>	1.3830-1.3850 a 20 °C												
<i>Solubilidad</i>	Completamente miscible en alcohol al 95%; soluble en prácticamente todos los disolventes orgánicos 1:1-2 en alcohol al 60%												
<i>Características organolépticas</i>	Olor similar al de piña > En la mayoría de los vinos (de uva blanca o roja) > En cocoa												
<i>Se encuentra naturalmente en</i>													
<i>Usos reportados (en ppm)</i>	<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td>*Bebidas no alcohólicas</td> <td style="text-align: right;">7.7</td> <td>*Productos ahumados</td> <td style="text-align: right;">110.0</td> </tr> <tr> <td>*Helados</td> <td style="text-align: right;">29.0</td> <td>*Gelatinas y budines</td> <td style="text-align: right;">10-15</td> </tr> <tr> <td>*Dulces</td> <td style="text-align: right;">78.0</td> <td>*Goma de mascar</td> <td style="text-align: right;">100.0</td> </tr> </table>	*Bebidas no alcohólicas	7.7	*Productos ahumados	110.0	*Helados	29.0	*Gelatinas y budines	10-15	*Dulces	78.0	*Goma de mascar	100.0
*Bebidas no alcohólicas	7.7	*Productos ahumados	110.0										
*Helados	29.0	*Gelatinas y budines	10-15										
*Dulces	78.0	*Goma de mascar	100.0										

CERATOCYSTIS FIMBRIATA

Ceratocystis fimbriata es un hongo filamentososo con capacidad de sintetizar aromas frutales dentro de un medio de cultivo adecuado. ¹⁶

Taxonomía y nomenclatura

Subdivisión: Ascomicotina

Subdivisión de Dikaryomycota, forman meiosporas endogenamente en ascomas.

Existen cuatro tipos de ascomas: a) apotecial; b) peritecial; c) pseudotecial; d) cleistotecial.

Ceratocystis es del tipo b), los ascomas son estructuras que producen "sacos" denominados ascos, *figura 1*. ³⁷

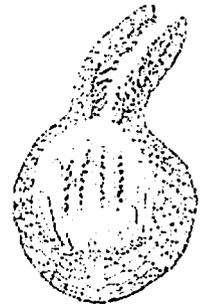
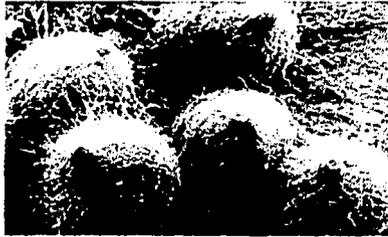


Figura 1. Ascoma peritecial (Gr. *peri* = alrededor + *theke* = caja), en su interior se producen estructuras denominadas ascos. ³⁸

Orden: Microascales

Las características principales de los *Microascales* son: ascosporas dextrinoides, con poros germinales y una fase asexual de aneloconidios o aleuroconidios. Las ascosporas son esporas sexuales y resultan de la fusión del núcleo de dos células que pueden ser morfológicamente iguales o distintas. Estas esporas se producen dentro de ascos. Se han reconocido las familias *Microascáceas* y *Ofiostomataceas*. La familia de *Ofiostomataceas* incluye el género Ceratocystis. ²

Familia: Ofiostomataceas

Los miembros de esta familia se reconocen por tener peritecios superficiales o sólo parcialmente hundidos, son de base esférica y cuello muy alargado el cual presenta una

longitud de varias veces el diámetro del peritecio, con un ápice deshilachado, plumoso. La pared del asco es gelatinizada durante la formación del peritecio y las esporas son exudadas por el largo cuello del peritecio englobadas en mucus que forma una gotita en la abertura ostiolar, *figura 2.* ²

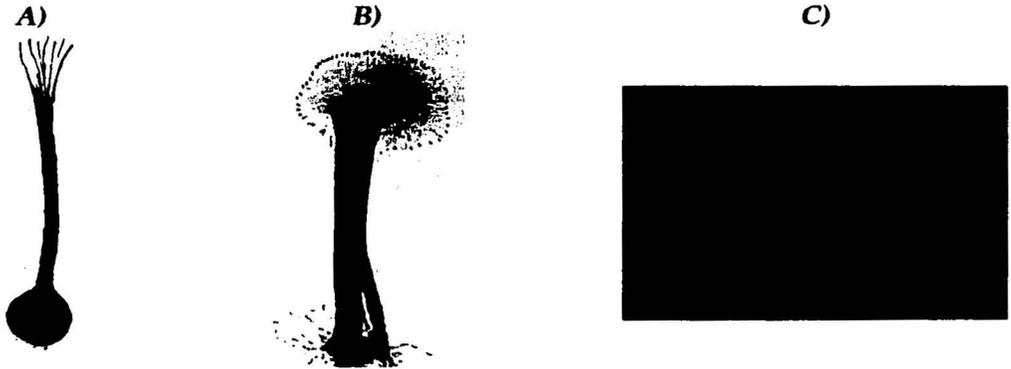


Figura 2. A) y B) Peritecios superficiales o parcialmente hundidos con base esférica y cuello muy alargado. C) Ápice deshilachado plumoso. ²

➤ HISTORIA

Ceratocystis fimbriata Ellis & Halsted fue descrito originalmente como un género causante de la podredumbre de papas en 1890 (Halsted, 1890). Saccardo (1892) cambio el nombre a *Sphaeronaema fimbriatum* (Ell. & Halst.) Sacc. Elliot (1923) lo reclasificó como *Ceratostomella fimbriata* (Ell. & Halst.). Más tarde el género fue transferido a *Ophiostoma* (Melin y Nannfeldt, 1934), *Endoconidiophora* (Davidson, 1935), y finalmente regresó a *Ceratocystis* (Bakshi, 1950).

En Indonesia se observó un hongo que dañaba los cultivos de café, fue denominado *Rostrella coffea*, (Zimmerman, 1900); este nombre se consideró sinónimo de *Ceratocystis fimbriata* (Pontis, 1951).

Walter et al. (1952) designaron un patógeno cuyo huésped era *Platanus spp.* como una forma independiente a *C. fimbriata f. platani* Walter tomó como único criterio de clasificación al hospedero.

En África del Sur se observó como patógeno invasor de *Acacia mearnsii* y actualmente se le considera una especie diferente, *C. albofundis* (Wingfield et al., 1996).

Se encontró C. variospora, en robles y fue descrita por Davidson (1944), como similar a C. fimbriata (Hunt, 1956). No obstante Upadhyay (1981) considera C. variospora como sinónimo de C. fimbriata, probablemente no sean la misma especie (ver tabla 1).¹⁻¹²

Nombres científicos anteriores	Autor taxonómico
<u>Ceratostomella fimbriata</u>	(Ellis & Halsted) Elliott
<u>Endoconidiophora fimbriata</u>	(Ellis & Halsted) Davidson
<u>Ophiostoma fimbriatum</u>	(Ellis & Halsted) Nannf.
<u>Sphaeronema fimbriata</u>	(Ellis & Halsted) Sacc.
<u>Rostrella coffea</u>	Zimmerman
<u>Ceratocystis fimbriata f. Platani</u>	(Ellis & Halsted) Walter

Tabla 1. Nombres científicos anteriores de C. fimbriata.

Nombres comunes / Idioma

Inglés
Ceratocystis wilt
Ceratocystis canker
Ceratostomella wilt
cacao wilt
Canker stain of plane
Mango wilt
Mango blight
black rot of sweet potato
black rot of taro
black rot of sunn hemp
canker of coffee
mouldy rot of rubber

Español
mal de machete de cacao
mal de choroni de cacao
llaga macana de cacao
secamiento de los citricos
muerte subita de citrus

Francés
chancre
colore du platane
tache
chancreuse

Portugués
seca da mangueira
gomose da Acacia negra

➤ CLASIFICACIÓN DE ACUERDO AL HOSPEDERO

Una gran variedad de plantas son infectadas por C. fimbriata (ver tabla 2). Se han descubierto muchas variedades aparentes de invasión especializada algunas veces denominadas "tipos", "formas", o "razas" (Wellman, 1972; Harrington, 2000).

Estudios de inoculación cruzada han demostrado que algunas cepas son específicas para cada huésped. Por ejemplo, muestras tomadas de mango (Ribeiro, Coral, 1968) y otros hospederos (Coral et al., 1984) no son capaces de infectar el cacao.

Cepas aisladas de la papa y taro no invaden a otro huésped al realizar inoculación cruzada (Mizukami, 1951), y muchas cepas tomadas de otros hospederos no fueron capaces de infectar a la papa (Kojima and Uritani, 1976).

C. fimbriata aislada de cacao, papa, y Platanus es específica al huésped (Baker and Harrington, 2000). La especificidad para huésped parece ser distribuida geográficamente. 13, 14, 32, 15-17

<i>Alocasia sp.</i> (taro gigante); <i>Acacia mearnsii</i> ; <i>Acacia decurrens</i>
<i>Carya sp.</i> (nogal americano); <i>Citrus spp.</i> ; <i>Coffea arabica</i> (café); <i>Crotalaria juncea</i> (palmeras)
<i>Erythrina sp.</i> ; <i>Eucalyptus sp.</i>
<i>Hevea brasiliense</i> (caucho)
<i>Ipomoea batatas</i> (papa)
<i>Mangifera indica</i> (mango); <i>Manihot esculenta</i> (mandioca)
<i>Pimenta officinalis</i> (pimiento); <i>Platanus spp.</i> ; <i>Prunus spp.</i> (albaricoque, almendro, melocotón, etc.) <i>ver Figura 3</i>
<i>Theobroma cacao</i> (cacao) <i>ver Figura 4</i>
<i>Xanthosoma sp.</i> (taro, cocotero)

Tabla 2. Plantas comúnmente afectadas por C. fimbriata



Figura 3. Corte transversal de dos troncos de Platanus infectados por C. fimbriata. Lesiones características de la infección



Figura 4. Colonias miceliales de C. fimbriata formadas en un corte de Theobroma branch.

➤ DESCRIPCIÓN DE SÍNTOMAS DE LA INFECCIÓN

El hongo fue reportado como patógeno superficial de la cosecha de cacao, causando lesiones de coloración ligeramente café (Malaguti, 1958), que se observaban especialmente en periodos de lluvia (Siller, 1958).

En árboles (cacao, mango, álamo, etc.), típicamente la infección ocurre en lesiones frescas. Esporas y micelio penetran en la lesión e invaden el interior del árbol. El hongo causa una coloración negruzca, púrpura o café en la madera que a menudo se acompaña de un exudado gomoso de la llaga. La infección se extiende por todo el tronco hasta llegar a las ramas. En la superficie y a lo largo del tronco pueden observarse llagas particularmente en árboles de *Populus*, *Prunus*, y *Platanus*. La invasión puede ser superada de manera natural. En periodos de sequía la infección no causa más estragos en la madera que una coloración amarillenta, que puede durar semanas.

En algunos árboles (*Platanus*, mango, eucalipto, y otros) la infección en los troncos puede extenderse hasta la raíz entonces, muere el árbol en pocos meses. En plantas como papa y taro el hongo invade la raíz y causa podredumbre negra en el fruto.^{55,56}

➤ MORFOLOGÍA

El micelio es de color hialino a café oscuro o negro, usualmente con abundantes conidioforos que producen cadenas de conidias hialinas, llamadas también endoconidias. Las conidias son cilíndricas y pueden variar de longitud de 11 a 16 μm y de 4 a 5 μm de ancho (Hunt, 1956).⁵⁷ Los conidióforos especializados crecen en forma ascendente y con pared gruesa, las aleurioconidias ligeramente pigmentadas (algunas veces llamadas clamidosporas), probablemente sean un estado de supervivencia. Las aleurioconidias miden de 9 a 16 μm de largo y 6 a 13 μm de ancho, crecen solas o en cadenas cortas. Se pueden producir los dos tipos de esporas asexuales en el sustrato.

C. fimbriata, produce cuerpos fructíferos denominados peritecios. El peritecio puede ser de color café oscuro a negro, con cuello largo y un extremo globoso, a través del delgado cuello se exudan las esporas sexuales (ascosporas). El peritecio tiene un diámetro de base aproximado a 130-200 μm y el cuello llega a medir hasta 800 μm de largo (ver figura 5 y 6). Se extienden de ocho a quince ascosporas desde el ápice del cuello en diferentes niveles del centro del peritecio, en un intervalo aproximado de 50 a 90 μm . Las ascosporas son pequeñas, hialinas, con o sin vaina y su forma característica es la de sombrero, su largo es de 4.5 a 8 μm por 2.5 a 5.5 μm de ancho (ver figura 7). Las ascosporas se acumulan en una matriz pegajosa al final del cuello del peritecio, en donde se observan semejantes a un clavel o a un espiral.

➤ SIMILITUDES CON OTRAS ESPECIES

C. fimbriata usualmente se identifica por sus característicos cuerpos frutales los cuales tienen similitudes con frutos de otras especies del género. Algunas veces ha sido confundido con *C. paradoxa*, que es patógeno de las plantas monocotiledonas. *C. fimbriata* puede distinguirse de *C. paradoxa* por las ascosporas similares a un sombrero. En árboles de cacao, *C. fimbriata* puede confundirse con *C. moniliformis*. *C. moniliformis* es menos patógeno, usualmente sólo produce ligeros daños.

En el laboratorio, *C. moniliformis* crece a mayor velocidad que *C. fimbriata*, y al ser observados en un microscopio compuesto la base del peritecio de *C. moniliformis* tiene extensiones semejantes a espinas.

La infección del árbol de caucho causada aparentemente por *Fusarium solani*, algunas veces puede ser causa de *Ceratocystis*. Un examen microscópico de las esporas puede determinar que hongo causa la infección.¹⁵

➤ BIOLOGÍA Y ECOLOGÍA

Los cuerpos fructíferos (peritecios) se producen en una semana. El hongo quizá se dispersa por fragmentos de micelio, conidias, aleuroconidia o ascosporas; la aleuroconidia probablemente se unidad de supervivencia común debido a su resistencia y a su pared gruesa. *C. fimbriata* es capaz de sobrevivir en fragmentos de madera en aguas de ríos (Grosclaude et al., 1991) y en sólidos (Accordi, 1989) en periodos de hasta tres meses durante invierno.^{58 59}

El hongo produce un fuerte olor a fruta, dependiendo del medio de cultivo en el que crezca. La finalidad de esta adaptación es que el hongo pueda dispersarse por medio de los insectos, los cuales al ser atraídos por el olor se posan en las plantas infectadas y fácilmente se impregnan de esporas las cuales son esparcidas.

La temperatura de crecimiento de *C. fimbriata* oscila entre 18-28 °C y produce ascosporas durante una semana. En la naturaleza el hongo resiste condiciones adversas en forma de micelio o de aleuroconidia, *C. fimbriata* infecta plantas bajo estrés, particularmente por drogas (Spence, 1958) lluvia excesiva (Malaguti, 1952). La infección en la papa se genera por deficiencia de boro en el sólido (Hu et al., 1999).^{60,61 y 62}

➤ DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

Los lugares en donde ha sido recolectado el hongo incluyen Sudáfrica (en *Acacia*), Estados Unidos (Iowa en *Carya cordiformis*, Missouri en *Platanus occidentalis*, Dakota del sur en *Populus tremuloides*, y Wisconsin en *Carya spp.*), en Brasil (Río de Janeiro), las muestras fueron recolectadas de *Mangifera* y *Annona*.

Muchos de los artículos reportados antiguamente con respecto a *C. fimbriata* son erróneos. En primer lugar se había reportado como saprófito de *Hevea* en Uganda (Snowden, 1925), dos reportes posteriores sugieren que el hongo era patógeno para *Hevea* en la República Democrática del Congo (Ringoet, 1923).

C. fimbriata es nativo de norte y sur América y de Asia. Los hospederos son de regiones diferentes, y en lugares en donde abunda el hongo no todos los hospederos son afectados. Por ejemplo, la infección en el mango solo se presenta en Brasil. En comunidades en donde se produce mango, *C. fimbriata* causa daños en otras plantas. A pesar de que el hongo capaz de infectar al cacao es común en América solo se observa la invasión a café en América central, en el Caribe y algunos lugares del sudeste de Asia, ver tabla 3.

Tabla 3. Distribución geográfica de *C. fimbriata* (continúa).

País / Región	Huésped	Referencias
ASIA		
CHINA	<i>Ipomoea</i>	Sy, 1956
Fujian	<i>Ipomoea</i>	Hu et al., 1999
INDIA	<i>Populus, Hevea</i>	Kaushik and Toky, 1992; Ramakrishnan and Radhakrishna, 1963
Karnataka	<i>Punica</i>	Somasekhara, 1999
INDONESIA	<i>Hevea</i>	Wright, 1925
Java	<i>Hevea, Coffea</i>	Leefmans, 1934; South and Sharples, 1925; Zimmermann, 1900
Kalimantan	<i>Hevea</i>	Tayler and Stephens, 1929
Sumatra	<i>Hevea</i>	Tayler and Stephens, 1929
JAPÓN	<i>Ipomoea, Colocasia</i>	Asuyama, 1938; Okamoto, 1940; Shimizu, 1939
Kyushu	<i>Ficus, Ipomoea</i>	Kajitani and Kudo, 1993
MALASIA	<i>Hevea</i>	Beeley, 1929; South and Sharples, 1925
MYANMAR (BURMA)	<i>Hevea</i>	Turner and Myint, 1980
TAIWAN	<i>Crotalaria</i>	Lee and Kuo, 1997

Tabla 3. Distribución geográfica de *C. fimbriata* (continúa).

País / Región	Huésped	Referencias
ÁFRICA		
CONGO	<i>Eucalyptus</i>	Roux et al., 2000
COTE D'IVOIRE	<i>Crotalaria</i>	Davet, 1962
ÁFRICA - SUR	<i>Acacia</i>	Roux et al., 2000
AMÉRICA NORTE y CENTRAL		
CANADA		
British Columbia	<i>Populus</i>	Lowe, 1969
Manitoba	<i>Populus</i>	Zalasky, 1965
Quebec	<i>Populus</i>	Anonymous, 1965; Vujanovic et al., 1999
Saskatchewan	<i>Populus</i>	Zalasky, 1965
COSTA RICA	<i>Theobroma, Coffea</i>	Echandi and Segall, 1956; Martin, 1949; Siller, 1958
CUBA	<i>Spathodea, Xanthosoma, Citrus</i>	Isla and Ravelo 1989; Triana and Diaz, 1989; Rodriguez and Alfonso 1978
REPÚBLICA DOMINICANA	<i>Theobroma</i>	Schieber, 1969
GUATEMALA	<i>Theobroma, Coffea, Hevea</i>	Schieber and Sosa, 1960; Szkolnik, 1951; Tejada, 1983
HAITI	<i>Ipomoea</i>	Barker, 1926
JAMAICA	<i>Pimenta</i>	Leather, 1966
MÉXICO	<i>Hevea, Erythrina</i>	Martin, 1947; BPI specimens 596218, 595433
TRINIDAD Y TOBAGO	<i>Ipomoea, Theobroma</i>	Baker, 1936; Baker and Dale, 1951; Briant, 1932; Iton, 1959; Leach, 1946
ESTADOS UNIDOS		
Alaska	<i>Populus</i>	Hinds and Laurent, 1978
Arkansas	<i>Platanus</i>	McCracken and Burkhardt, 1977

Tabla 3. Distribución geográfica de *C. fimbriata* (continúa).

País / Región	Huésped	Referencias
AMÉRICA NORTE y CENTRAL		
California	<i>Syngonium, Platanus, Prunus</i>	Davis, 1953; DeVay et al. 1968; Perry and McCain, 1988; Teviotdale and Harper 1991
Colorado	<i>Populus</i>	Hinds, 1972
Delaware	<i>Platanus</i>	Mook, 1940; Walter, 1946
Florida	<i>Syngonium, Alocasia, Colocasia</i>	Alfieri et al., 1994
Hawaii	<i>Syngonium, Colocasia</i>	Uchida and Aragaki, 1979
Kentucky	<i>Platanus</i>	Mook, 1940
Louisiana	<i>Platanus, Ipomoea</i>	Greene and Lowe, 1992
Maryland	<i>Platanus</i>	Dodge, 1940
ESTADOS UNIDOS		
Massachusetts	<i>Ipomoea</i>	BPI specimen 595868
Minnesota	<i>Populus</i>	Wood and French, 1962
Mississippi	<i>Platanus</i>	Walter, 1946
New Jersey	<i>Platanus</i>	Dodge, 1940; Walter, 1946
New York	<i>Platanus</i>	Walter, 1946
North Carolina	<i>Platanus, Ipomoea</i>	Walter, 1946
Pennsylvania	<i>Platanus</i>	Dodge, 1940; Jackson and Sleeth, 1935; Walter, 1946
Rhode Island	<i>Ipomoea</i>	BPI specimen 595867
Tennessee	<i>Platanus</i>	Mook, 1940; Walter, 1946
Texas	<i>Platanus</i>	Greene and Lowe, 1992
Virginia	<i>Platanus</i>	Walter, 1946
West Virginia	<i>Platanus</i>	Walter, 1946

Tabla 3. Distribución geográfica de *C. fimbriata* (continúa).

País / Región	Huésped	Referencias
AMÉRICA DEL SUR		
BRASIL		
Bahia	<i>Theobroma, Hevea</i>	Bezerra, 1997; Pereira and Santos, 1986
Minas Gerais	<i>Crotalaria</i>	Chardon et al., 1940; Muller, 1937
Pará	<i>Hevea, Gmelina</i>	Albuquerque et al., 1972; Deslandes, 1944; Muchovej et al., 1978
Pernambuco	<i>Crotalaria, Mangifera</i>	Batista, 1947, 1960
Rondonia	<i>Theobroma</i>	Bastos and Evans, 1978
São Paulo	<i>Cassia, Ficus, Hevea, Mangifera</i>	Arruda, 1940; Oliveira, 1966; Ribeiro et al., 1987; Silveira et al. 1985; Valarini and Tokeshi, 1980
COLOMBIA		
	<i>Theobroma, Coffea, Citrus</i>	Arbelaez, 1957; Borja et al., 1995; Garces, 1944; Mourichon, 1994; Pontis, 1951
ECUADOR		
	<i>Theobroma</i>	Chalmers, 1969; Desrosiers, 1957; Desrosiers and Diaz, 1956; Rorer, 1918
GUYANA		
	<i>Theobroma</i>	Bisessar, 1965
PERU		
	<i>Theobroma, Ipomoea</i>	Krug and Quartey-Papafio, 1964; Rada, 1939; Soberanis et al., 1999
SURINAME		
	<i>Coffea</i>	ATCC culture 14503
VENEZUELA		
	<i>Coffea, Theobroma</i>	Malaguti, 1952a, 1952b; Pontis, 1951; Reyes, 1988
EUROPA		
AZORES		
	<i>Ipomoea</i>	Bensaude, 1927
FRANCIA		
	<i>Platanus</i>	Ferrari and Pechenot, 1979, 1974, 1976; Grosclaude et al., 1991; Vigouroux, 1986
ITALIA		
	<i>Platanus</i>	Pancohesi, 1981

Tabla 3. Distribución geográfica de <i>C. fimbriata</i> .		
País / Región	Huésped	Referencias
EUROPA		
POLONIA	<i>Populus</i>	Gremmen and deKam, 1976; Przybyl, 1980, 1986
SUIZA	<i>Platanus</i>	Anonymous, 1988
OCEANÍA		
AUSTRALIA		
New South Wales	<i>Syngonium</i>	Walker et al., 1988
Queensland	<i>Syngonium</i>	Walker et al., 1988
Victoria	<i>Syngonium</i>	Walker et al., 1988
FIJI	<i>Xanthosoma</i>	Firman, 1972; Graham, 1965; Walker et al., 1988
NUEVA ZELANDA	<i>Ipomoea</i>	Slade, 1960
PAPUA NUEVA GUINEA	<i>Ipomoea</i> , <i>Hevea</i>	Mann, 1953

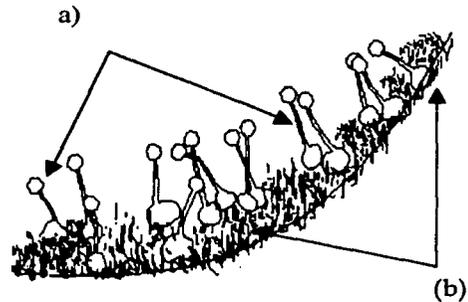


Figura 5. Micelio y peritecio negro y naranja (a), se observa la masa de ascosporas en el ápice (b), cultivo en papa.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Figura 6. Peritecio, tiene un diámetro de base aproximado a 130-200 μm y el cuello llega a medir hasta 800 μm de largo

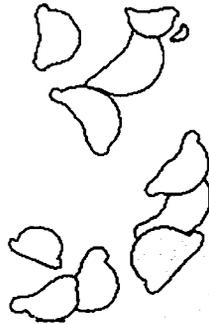


Figura 7. Ascosporas, forma característica semejante a un sombrero, su largo es de 4.5 a 8 μm por 2.5 a 5.5 μm de ancho

➤ IMPACTO ECONÓMICO

C. fimbriata ocasionalmente es el causante de los mayores desastres en América latina, causando graves daños en la producción de café y cacao. En las plantaciones de cacao, el hongo ha destruido aproximadamente el 50 % de los árboles en algunas localidades (Idrobo, 1958). Actualmente tiene gran relevancia en Brasil, en mango la infección ocurre esporádicamente *ver figuras 8-12*. Los plataneros en E.U, Italia, Francia y Suiza han sido afectados recientemente, y el 10 % de los plataneros de Inglaterra y Suecia han muerto desde principios de los 80's (Matasci and Gessler, 1997). Las pérdidas por *Ceratocystis wilt* en el distrito de Bijapur en la India se calculan en \$69,770 dólares estadounidenses (Somasekhara, 1999). La producción de papa por E.U. disminuyó por causa del hongo.^{63,64,65}

➤ CONTROL

La propagación del hongo puede ser controlada por medio de la sanitización por ejemplo, desinfectando machetes y herramientas de poda. La resistencia del huésped se ha aprovechado en casos como el mango (Ribeiro et al., 1995; Rossetto et al., 1997), cacao (Desrosiers, 1956; Delgado y Echandi, 1965; Gardella et al., 1982; Ocampo et al., 1982; Simmonds, 1994), papa (Martin, 1954), y *Crotalaria* (Ribeiro et al., 1977).³³⁻⁴¹

El empleo de fungicidas también es una buena opción. No existen métodos de control naturales.

Árboles de cacao infectados por *C. fimbriata*



Figura 8. Hojas secas del árbol de cacao



Figura 9. El hongo infecta el tronco e invade hasta la raíz produciendo la muerte del árbol

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Árboles de mango infectados por *Ceratocystis fimbriata*:

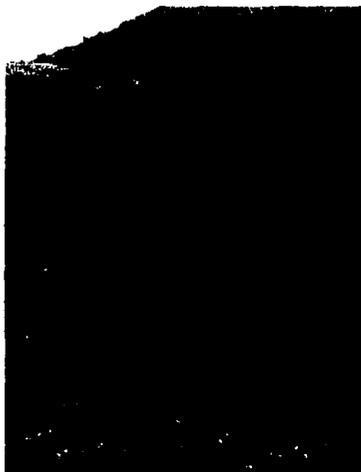


Figura 10. En Brasil la infección se ha convertido en una epidemia.



Figura 11. Los árboles infectados o muertos son un foco de propagación del hongo.



Figura 12. Daño típico, de la infección.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La cromatografía es una técnica físico-química de separación, en la que los componentes a separar se distribuyen entre dos fases: una estacionaria, de gran desarrollo superficial, y otra móvil, que pasa a través o a lo largo de la fase estacionaria. Cuando se introduce en el sistema una mezcla de sustancias, se genera una serie de equilibrios de distribución entre las dos fases, generalmente de distinta magnitud para cada componente de la mezcla, por lo que cada uno de ellos se desplazará con diferente velocidad a lo largo del sistema.^{75 y 76}

CROMATOGRAFÍA DE GASES

Es la técnica más utilizada en la separación de compuestos orgánicos e inorgánicos térmicamente estables y volátiles. La cromatografía gas-líquido (CGL) lleva a cabo la separación por medio del reparto de los componentes de la mezcla, entre una fase gaseosa que fluye y una fase líquida estacionaria depositada sobre un soporte sólido.

La cromatografía gas-sólido (CGS) utiliza un adsorbente sólido como fase estacionaria, de modo que la retención selectiva de los componentes de la mezcla se debe a fenómenos de adsorción superficial regidos por las teorías del equilibrio gas-sólido.

Por lo que concierne a la instrumentación, el esquema de un cromatógrafo de líquidos puede observarse en la **figura 1** y se conforma de los siguientes elementos:

- **Fuente de gas portador (G):** Es una fuente de gas comprimido (normalmente nitrógeno o helio) que proporciona la fase móvil. A la salida se acopla un sistema para la regulación (V) y medida (M) del gas.
- **Inyector (I):** Es un dispositivo que permite la introducción de la muestra en la corriente del gas portador. Existe cierta variedad de diseño según el tipo de muestra que se pretenda analizar. El más común es el inyector de líquidos, que puede utilizarse para sólidos en disolución, líquidos y gases. Se trata de una cámara situada a la entrada de la columna cromatográfica (C) y calentada independientemente de ésta, que va provista de una membrana de goma (septum) a través de la cual se introduce la muestra con la ayuda de una jeringa hipodérmica especial. Las cantidades de muestra inyectadas oscilan entre 0,1 y 2 ml en el trabajo analítico ordinario.
- **Columna cromatográfica (C):** Es el elemento que define de un cromatógrafo, donde tiene lugar el proceso físico de separación. Consiste en un tubo de vidrio o metal (acero inoxidable, aluminio...) de longitud que oscila normalmente entre 1 y 20 m y cuyo diámetro interior varía entre 0,1 y 25 mm. Hay una gran variedad de columnas

cromatográficas debido a la diversidad de posibilidades existentes en cuanto a la elección de dimensiones del tubo, fases estacionarias, disposición de dichas fases, etc. Los dos tipos de columnas básicas de uso más general son las empacadas o de relleno y las capilares. El éxito de un análisis depende básicamente de la selección adecuada de la columna.

- **Horno (H):** Es el habitáculo, en cuyo interior se sitúa la columna. Debe disponer de una buena regulación de la temperatura.
- **Detector (D):** Es un dispositivo que permite medir de modo continuo una propiedad física del gas portador, que se modifica ampliamente con la presencia de muy pequeñas concentraciones de la sustancia problema. En otros casos se mide directamente la propiedad del componente. El detector se sitúa a la salida de la columna. Aunque se ha diseñado una amplia gama de detectores, los más utilizados son los de conductividad térmica y los de ionización.
- **Registrador (R):** Dispositivo que integra la señal que recibe del detector y la presenta en una pantalla o en papel. La interfase y el sistema de cómputo facilitan la obtención de datos. ^{75 y 76}

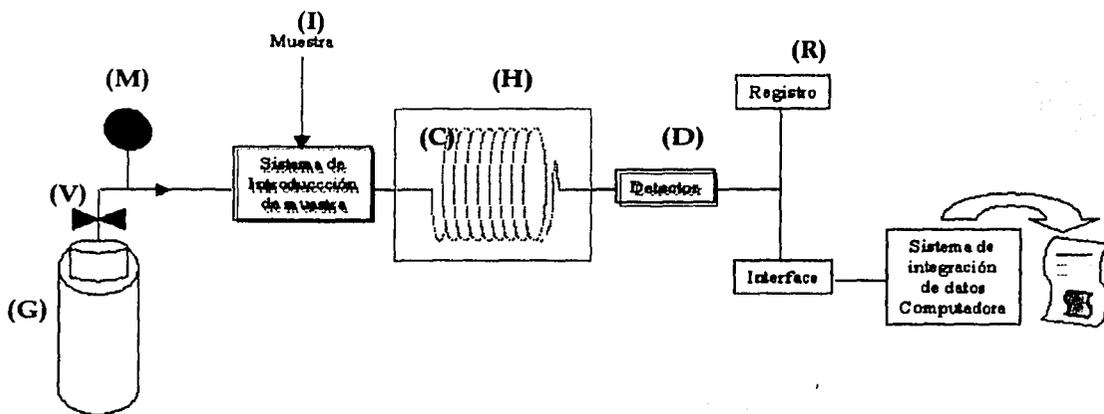


Figura 1. Cromatógrafo de gases. ^{75 y 76}

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CUANTIFICACIÓN DE LOS COMPONENTES DEL EXTRACTO ETÉREO POR EL MÉTODO DEL ESTÁNDAR INTERNO.

Este es un método de cuantificación en el que la cantidad inyectada no es crítica. Un peso o un volumen de un estándar se mezcla con una cantidad conocida de la muestra problema, y se cromatografía. Todo aumenta o disminuye proporcionalmente con el volumen que se inyecta. Si se permanece en el rango de concentración en donde la respuesta es lineal, los factores de respuesta relativos (área compuesto problema/ área estándar interno) permanecen constantes.

Las grandes ventajas de este método se deben al hecho de que tanto el estándar como la muestra desconocida se corren juntas en la misma inyección, por eso a esta técnica se le llama estándar interno. Si la sensibilidad del detector se altera, todos los picos se afectan en igual forma; las cantidades relativas no cambian. Si dos operadores inyectan diferentes cantidades de la misma muestra, las alturas de los picos serán diferentes, pero las cantidades relativas permanecen constantes. La clave de todo el procedimiento es el estándar interno de cada muestra.

Una ventaja de este método de cuantificación es, entre otras, que no se necesitan inyecciones repetitivas, sino que se conserve la relación de áreas. La dificultad de este método está en buscar un estándar interno adecuado que no interfiera con los componentes de la muestra. Los requisitos que debe cumplir un estándar interno son:

- Que no se encuentre en la muestra problema.
- Debe ser posible obtenerlo en alta pureza.
- Debe ser estable bajo condiciones cromatográficas.
- Debe ser inerte a todos los componentes de la muestra y de la columna.
- Debe ser cromatográficamente limpio, dando un pico bien formado y separado de todos los picos de la muestra.
- Debe ser soluble en la muestra.
- Debe tener un tiempo de retención comparable a los de los componentes de la muestra.

Una vez obtenido el cromatograma, se calcularon los factores de área y de volumen de la siguiente manera:

$$\text{factor de área} = \frac{\text{área del estándar}}{\text{área del est. interno}} \quad \dots(1)$$

$$\text{factor de volumen} = \frac{\text{vol. del estándar}}{\text{vol. del est. interno}} \quad \dots(2)$$

Estos factores, se emplean para hacer una gráfica en la que el factor de volumen se coloca en el eje X y en el eje Y el factor de área, la pendiente de ésta recta, es el factor de respuesta. Se calculó la regresión lineal, la pendiente (m), la ordenada al origen (b) y el coeficiente de correlación (R).

La ecuación de la recta es : $Y = mx + b \quad \dots(3)$

Donde :

- Y = factor de área
- m = pendiente
- x = factor de volumen
- b = ordenada al origen

Si despejamos x de 3 tenemos que :

$$x = \frac{Y - b}{m} \quad \dots(4)$$

Se sabe que: $\text{factor de volumen} = \frac{\text{vol. prob.}}{\text{vol. est. interno}} = x \quad \dots(5)$

Como la cantidad adicionada de 2-octanol (1.2 mcl/ml) fué siempre constante tenemos que:

$$x = \frac{\text{vol. prob.}}{1.2} \quad \dots(6)$$

Entonces la ecuación 7 queda :

$$\text{vol prob.} = \frac{Y - b}{m} \quad (1.2) \quad \dots(7)$$

para encontrar la concentración del problema sustituir en la ecuación 7 los valores de la m, la b y el factor de área de cada uno de los compuestos a cuantificar.

En el **tabla 1** se indican los valores obtenidos para el coeficiente de regresión lineal (R), la R² de los estándares encontrados en las muestras disueltos en éter.

Tabla 1. Curvas estándar en éter, valores de la regresión lineal y rangos de aplicación de las curvas.

Compuesto	b	A	R	R ²	Rango de aplicación μL/L
Acetaldehido	0.09930	0.26845	0.99453	0.9890	1-20
Butanol	0.00955	1.04224	0.99681	0.9936	0.006 - 0.5
Acetato de butilo	0.00665	1.10630	0.98901	0.9781	0.006 - 0.2
Acetato de etilo	-0.31147	0.51377	0.98808	0.9763	0.5 - 20
Acetato de isoamilo	-0.46781	0.78472	0.99416	0.9883	0.5-20
Etanol	-1078695	0.58555	0.99250	0.9850	50 - 600
Alcohol amílico	-0.51459	0.80939	0.99194	0.9839	0.01 - 20
Alcohol isoamílico	0.00881	0.99118	0.98704	0.9742	0.006 - 100
Isobutanol	-0.00631	0.67441	0.99692	0.9938	0.5 - 20
Isopropanol	0.00340	0.67236	0.99715	0.9943	0.004 - 0.5
Butirato de etilo	0.01301	0.74448	0.99239	0.9848	0.006 - 0.5
Propionato de etilo	0.00987	0.71025	0.99087	0.9818	0.006 - 0.05
2-propanona	0.01756	0.57730	0.99978	0.9995	0.5 - 22
Diacetilo	-0.21993	0.28273	0.99373	0.9874	3 - 24

En el **tabla 2**, se dan los valores encontrados para las curvas estándar realizadas para el análisis de espacio de cabeza.

Tabla 2. Curvas estándar en espacio de cabeza, valores de la regresión lineal y rangos de aplicación de las curvas.

Compuesto	b	m	R	R ²	Rango de aplicación $\mu\text{L/L}$
Alcohol amílico	815.346	68242.29	0.9998	0.9978	0.1-3.0
Alcohol isoamílico	-7518.02	41124.38	0.9904	0.9808	0.02-2
Butanol	-9772.00	68378.47	0.9937	0.9874	0.2-4.5
Etanol	4528.42	53753.84	0.9975	0.9950	0.15-6
Isobutanol	1122.00	62005.00	0.9943	0.9886	0.02-2
Isopropanol	-5909.00	5636.69	0.9968	0.9936	0.1-3.0
Acetato de etilo	-9817.64	55477.49	0.9977	0.9954	0.2-6
Acetato de butilo	370.57	51729.65	0.9932	0.9864	0.02-2
Acetato de isoamilo	10607.00	40758.70	0.9904	0.9808	0.02-2
Butirato de etilo	370.57	51729.66	0.9899	0.9781	0.03-3.0
Propionato de etilo	-5581.00	54808.26	0.9974	0.9948	0.2-4.5
Acetaldehído	176.21	32499.86	0.9900	0.9801	0.01 - 0.1
2-propanona	-8526.00	25683.91	0.9889	0.9752	0.01 - 0.1
Diacetilo	-258.63	45236.58	0.9919	0.9894	0.01 - 0.1

TIEMPO DE RETENCIÓN

Dentro de la columna cromatográfica, el tiempo de retención es uno de los valores más importantes. El tiempo de retención involucra el período siguiente a la inyección que es necesario para que un compuesto pase a través de una columna.

El tiempo de retención se determina a partir del tiempo en que se inyectó la muestra hasta el tiempo en que se presenta la máxima desviación del pico de la sustancia que se está analizando.

Este valor es siempre constante para un conjunto de condiciones definidas (temperatura y longitud de la columna, gas acarreador, velocidad de flujo, etc.), por lo cual es posible identificar a un compuesto por una comparación directa de este dato con valores de compuestos conocidos determinadas bajo las mismas condiciones. ^{75 y 76}

En el **tabla 3** se presentan los tiempos de retención obtenidos experimentalmente para los compuestos estudiados en este trabajo bajo las siguientes condiciones:

- Cromatógrafo de gases, equipado con un detector de ionización de flama y una columna capilar de Carbowax.
- Temperatura del inyector y del detector de 225 °C.
- Para el horno se empleó un programa de calentamiento con temperatura inicial de 35°C durante 3 minutos y una rampa de temperatura de 5°C cada minuto.
- Temperatura final del horno de 190°C.
- Gas acarreador helio.
- Relación del split 1:40
- Volumen de inyección de 2 mL

Compuesto	Tiempos de retención (minutos)
Alcoholes	
Amílico	9.75
Butanol	8.90
Etanol	3.70
Isoamílico	10.80
Isopropanol	3.50
Isobutanol	7.30
Ésteres	
Acetato de etilo	2.90
Acetato de butilo	6.70
Acetato de isoamilo	8.30
Propionato de etilo	4.10
Butirato de etilo	5.75
Cetonas	
2-propanona	4.10
Diacetilo	4.50
Aldehídos	
Acetaldehído	1.70

Cuadro 3. Tiempos de retención de compuestos del aroma producidos por *C. fimbriata*.

- 1 Ronald S, Kirt I, Harol E. Composición y análisis de los alimentos de Pearson. México: Cecsa, 1996; 13 -16
- 2 Bluemke W, Schrader J. Integrated bioprocess for enhanced production of natural flavors and fragrances by *Ceratocystis moniliformis*. *Biomolecular Engineerin*, 2001; 17, 137-142.
- 3 Bauer K, Garba D. Common fragrance and flavor materials. 2a ed. Germany: VCH, 1990;14.
- 4 Artículo 13 de la Decisión No. 4/91 del Consejo del Mercado Común y la Recomendación No. 36/93 del Subgrupo de Trabajo No. 3 " Normas Técnicas".
- 5 Furia TE, Bellanca N. Fernaroli's handbook of flavor ingredients. 2a ed. United States of America: CRC Press, 1975; vol. II. 3, 6, 28, 62,123, 157, 164, 567-585.
- 6 Brown CM, Campbell I, Priest FG. Introducción a la biotecnología. Zaragoza España: Editorial Acribia S.A, 1989;108-109.
- 7 Barahona E. El protocolo de la Bioseguridad. España: Vida Rural, 2000; 108, 42-44.
- 8 Albert A. Aplicaciones de la biotecnología en el mundo actual. España: Vida rural, 1999; 79, 29-31.
- 9 Muñoz E. *Biotechnology, Environment and Society*. E.U.: Technology and Ecology, SPT/Shouthern Illinois University, 1993; II, 240-262.
- 10 NOVARTIS INTERNATIONAL AG. La biotecnología. Basilea. Suiza: Ed. Novartis International AG, 1998; 42.
- 11 Muñoz E. *Biotecnología y Medio Ambiente: encuentros y desencuentros*. Anales de la Real Academia de Farmacia, 1996; LXIII, 2, 135-154.
- 12 Giddens A. *Living in a post-traditional society*. Cambridge: Politics, Tradition and Aesthetics in the Modern Social Order, Polity Press, 1994; 56-59.
- 13 Lash S, Wynne B. *Introduction*. London: V. Beck, Risk Society. Towards a New Modernity, Sage Publicacions, Thousand Oaks (Ca), New Delhi, 1992; 1-8.
- 14 Muñoz E. El lugar de la genética en las políticas científicas y tecnológicas. Madrid España: Genes en el Estrado, Grupo ESFERAS, Colección Politeya, Estudios de Política y Sociedad, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Instituto de Estudios Sociales Avanzados, 1996d; 39-61.
- 15 Fassatiova O. *Moulds and filamentous fungi in technical microbiology*. Czechoslovakia: Progress in Industrial Microbiology, 1986; II, 9-12.
- 16 Christen P, Raimbault M. Optimization of culture medium for aroma production by *Ceratocystis fimbriata*. *Biotechnology Letters*, 1991; 13, 7, 521-526.

- 17 Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson J. *Biología molecular de la célula*. 3° ed. Barcelona España: Ediciones Omega S.A., 1996; 43-116, 541-558
- 18 Rose A. H. *Microbiología química: introducción a la fisiología microbiana*. España: Alhambra, 1977; 219-249
- 19 Stanier R.Y, Ingraham J.L, Wheelis M.L, Painter P.R. *The microbial world*. 5° ed. U.S.A.: Prentice-Hall , 1986; 87-96.
- 20 Black J.G. *Microbiology principles & applications*. 3° ed. U.S.A.: Prentice-Hall, 1996; 78,98-99,116-129.
- 21 Lenhinger A, *Bioquímica*. 2° ed. Barcelona España: Ediciones Omega S.A., 1994; 341-345, 989-997.
- 22 Dickinson J.R, Harrison S.J, Hewlins M. An investigation of metabolims of valine to isobutyl alcohol in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 1998; 273: 25751-25756
- 23 Robbins W. Ma R. Vitamin deficiencies of *Ceratostomella*. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, 1942; 69, 184-204
- 24 Webster R, Butler E. A morphological and biological concept of the species *Ceratocystis fimbriata*. *Canadian Journal of Botany*, 1967; 45, 1457-1460
- 25 Voet D, Voet J. *Bioquímica*. Barcelona: Ediciones omega, 1992: 356-380, 424-450, 619-622.
- 26 Hohmann S, Willen H. *Yeast stress responses*. Austin, Texas, U.S.A.: Landes Bioscience Chapman & Hall, 1997; 1-4, 101-115.
- 27 Pessarakli M. *Handbook of plant crop stress*. Marcel Dekker, N.Y.: 1994
- 28 Adams M, Moss M. *Microbiología de los alimentos*. Zaragoza España: Editorial Acribia, S.A., 1997; 41-50.
- 29 Gervais P, Sarrette M. Influence of age of mycelium and water activity of the medium on aroma production by *Trichoderma viride* grown on solid substrate. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 1990: 69, 1, 46-50.
- 30 Bourgeois C, Mescle J, Zucca J. *Microbiología alimentaria*. Zaragoza España: Editorial Acribia, S.A., 1994; I, 20-27.
- 31 Marechal P. A, Gervais P. Yeast viability related a water potential variation: influence of the transient phase. *Appl. Microbial Biotechnol*. 1994: 42, 617-622.
- 32 Gervais P, Batut G. Influence of water potential on γ -decalactona production by the yeast *Sporidiobolus salmonicolor*. *Applied and Environmental Microbiology*. 1989: 55, 11, 2939-2943.

- 33 Gervais P, Belin J. M, Grajek W, Sarrette M. Influence of water activity on aroma production by *Trichoderma viride* TS growing on a solid substrate. *J. Ferment. Technol.* 1988; 66, 4, 403-407.
- 34 Marechal P.A, Gervais P. Yeast viability related a water potential variation: influence of the transient phase. *Appl. Microbial Biotechnol.* 1994; 42, 617-622.
- 35 Berger R.G, Detweiler G.R, Krempler G, Drawert F. Precursor atmosphere technology. Efficient aroma enrichment in fruit cells. In *Flavor precursors. Thermal and Enzymatic Conversions.* Washington, D.C. Teranishi R, Takeoka G.R, Guntert M. ACS Symposium series 490. Am. Chem. Soc. 1992.
- 36 Sánchez L, Seila R.L, Chirsten P, Revah S. Effect of leucine on aroma volatiles production from *Ceratocystis fimbriatag* grown in liquid culturee. *World Journal of microbiology & Biotechnology.* 2002; 18, 231-237.
- 37 Tortora G, Funke B, Case C. *Microbiology.* 4° ed. The Benjamin/Cummings Publishing Company. USA 1992: 296-306.
- 38 Ellis, M.B. and J.P. Ellis (1988) *Microfungi on Miscellaneous Substrates. An Identification Handbook.* Croom Helm, London.
- 39 Halsted B.D. Some fungous diseases of the sweet potato. The black rot. New Jersey U.S.A.: Agriculture Experiment Station Bulletin, 1890; 76, 7-14.
- 40 Saccardo P.A. *Sylloge fungorum.* 1892; 10, 215.
- 41 Elliott J.A. The ascigerous stage of the sweet potato black rot fungus. *Phytopathology,* 1923; 13, 56.
- 42 Melin E, Nannfeldt J.A. Reseraches into the blueing of ground wood pulp. *Svenska Skogswardsforen. Tidskr.,* 1934; 32, 397-616.
- 43 Davidson R. Fungi causing stain in logs and lumber in the southern states, including five new species. *Journal of Agricultural Research,* 1935; 50, 789-807.
- 44 Bakshi B. Fungi associated with ambrosia beetles in Great Britain. *British Mycological Society Transactions,* 1950; 33, 111-120.
- 45 Pontis R. A canker disease of the coffee tree in Colombia and Venezuela. *Phytopathology,* 1951; 41, 178-184.
- 46 Walter J, Rex E, Schreiber R. The rate of progress and destructiveness of canker stain of planetrees. *Phytopathology,* 1952; 42, 236-239.
- 47 Wingfield M, DeBeer C, Visser C, Wingfield D. A new *Ceratocystis* species defined using morphological and ribosomal DNA sequence comparisons. *Systematic and Applied Microbiology.* 1996; 19, 191-202.

- 48 Davidson R. Two American hardwood species of *Endoconidiophora* described as new. *Mycologia*, 1944; 36, 300-306.
- 49 Hunt J. Taxonomy of the Genus *Ceratocystis*. *Lloydia*, 1956; 19, 1-59.
- 50 Wellman F. Tropical American Plant Disease. Metuchen, NJ. Scarecrow Press, 1972.
- 51 Harrington T. Host specialization and speciation in the American wilt pathogen *Ceratocystis fimbriata*. *Fitopatologia Brasileira*, 2000; 25S, 262-263.
- 52 Mizukami T, 1951. Comparison of the pathogenicity of *Ceratostomella fimbriata* and *Endoconidiophora* sp. causal fungus of taro black-rot, on sweet potatoes and taroes. *Science Bulletin of the Faculty of Agriculture, Kyushu University*, 1984; 12, 5-9.
- 53 Kojima M, Uritani I. Possible involvement of furanoterpenoid phytoalexins in establishing host-parasite specificity between sweet potato and various strains of *Ceratocystis fimbriata*. *Physiological Plant Pathology*, 1976; 8, 97-111.
- 54 Baker C, Harrington T. Host-specialized *Ceratocystis fimbriata* on cacao, sweetpotato and sycamore (Abstr.) *Inoculum*, 2000; 51(3).
- 55 Malaguti G. Observaciones sobre la enfermedad necrosis del tronco de cacao por *Ceratostomella fimbriata* en Venezuela. In: Ministerio de Agricultura de Colombia, ed., Septima Conferencia Interamericana de Cacao, Palmira, Colombia, 13-19 de Julio de 1958; 80-85.
- 56 Siller L. La *Ceratostomella fimbriata* en el cacao en Centro America. In: Ministerio de Agricultura de Colombia, ed., Septima Conferencia Interamericana de Cacao, Palmira, Colombia, 13-19 de Julio de 1958, 1958; 95.
- 57 Hunt J. Taxonomy of the Genus *Ceratocystis*. *Lloydia*, 1956; 19, 1-59.
- 58 Grosclaude C, Olivier R, Pizzuto J, Romiti C. Le chancre colore du platane. *PHM Revue Horticole*, 1991; 317, 42-44.
- 59 Accordi S. Sopravvivenza nel terreno di *Ceratocystis fimbriata* f. sp. platani. *Informatore Fitopatologico*, 1989; 5, 57-62.
- 60 Spence J. Preliminary observations on a wilt condition of cocoa. *Caribbean Comm. Publ. Exchange Service Cocoa* 1958, 1958; 76.
- 61 Malaguti G. *Ceratostomella fimbriata* en el cacao de Venezuela. *Acta Cientifica de Venezuela*, , 1952; 3, 94-97.
- 62 Hu F, Ke Q, Tu R, Huang Y. Causes of black-rot and bitter-root of sweetpotato in Liancheng, Fujian. *Journal of the Fujian Agricultural University*, 1999; 28, 441-444.
- 63 Idrobo S. El complejo *Xyleborus-Ceratostomella* en Colombia. In: Ministerio de Agricultura de Colombia, ed., Septima Conferencia Interamericana de Cacao, Palmira, Colombia, 13-19 de Julio de 1958, 1958; 73-79.

- 64 Matasci M, Gessler C. Ein pilz bedroht die existenz der platane. Acta Veterinaria Hungarica, 1997; 45, 69-75.
- 65 Somasekhara Y. New record of *Ceratocystis fimbriata* causing wilt of pomegranate in India. Plant Disease, 1999; 83, 406.
- 66 Ribeiro I, Rossetto C, Donadio L, Sabino J, Martins A, Gallo P. Mango wilt. XIV Selection of mango (*Mangifera indica* L.) rootstocks resistant to the mango wilt fungus *Ceratocystis fimbriata* Ell. & Halst. Acta Horticulturae, 1995; 370, 159-161.
- 67 Rossetto C, Ribeiro I, Gallo P, Soares N, Sabino J, Martins A, Bortoletto N, Paulo E. Mango breeding for resistance to diseases and pests. Acta Horticulturae, 1997; 455, 299-304.
- 68 Desrosiers R. Diferenciación entre variedades de cacao con base a su susceptibilidad a la infección con *Ceratostomella fimbriata* (E. and H.) Elliot, en El Ecuador. Turrialba, 1956; 6, 48-52.
- 69 Delgado J, Echandi E. Evaluación de la resistencia de especies y clones de cacao al mal del machete provocado por *Ceratocystis fimbriata*. Turrialba, 1965; 15, 286-289.
- 70 Gardella D, Enriquez G, Saunders J. Inheritance of clonal resistance to *Ceratocystis fimbriata* in cacao hybrids. In: Proceedings of the 8th International Cocoa Research Conference, Cartagena, Colombia, 18-23 Oct. 1981. Cocoa Producers Alliance, 1982; 695-702.
- 71 Ocampo R, Mafla B, Victora K. Mejoramiento genético para resistencia a *Ceratocystis fimbriata* en cacao (*Theobroma cacao* L.) In: Proceedings of the 8th International Cocoa Research Conference, Cartagena, Colombia, 18-23 Oct. 1981, Cocoa Producers' Alliance, 1982; 725-730.
- 72 Simmonds N. Horizontal resistance to cocoa diseases. Cocoa Growers' Bulletin, 1994; 47, 42-52.
- 73 Martin W. Evaluation of fungicides for effectiveness against the sweetpotato black rot fungus, *Ceratocystis fimbriata*. Plant Disease Reporter, 1971; 55, 523-526.
- 74 Ribeiro I, Miranda M, Almeida L, Lovadini L, Sugimori M, Filho O. Melhoramento da crotalaria I--Autocompatibilidade e resistencia a murcha de *Ceratocystis fimbriata*. Bragantia, 1977; 36, 291-295
- 75 Baugh P. Gas chromatography a practic approach. The practical approach series, New York, U.S.A., 1993; 1-20.
- 76 Miller J. Cromatography concepts and contrast. John Wiley & Sons, U.S.A., 1988; 111-130.