



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**“IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE
ASPERGILLUS SECCIÓN NIGRI POTENCIALMENTE
OCRATOXÍGENOS EN UVA PASA (*Vitis vinifera*)”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERO EN ALIMENTOS

P R E S E N T A:

JOSÉ LUIS GRANADOS BECERRIL

ASESOR: DR. JOSÉ FRANCISCO MONTIEL SOSA

COASESORA: DRA. MARTHA YOLANDA QUEZADA VIAY

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2016



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: M. EN A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO
Jefe del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Identificación morfológica y molecular de *Aspergillus* sección *Nigri* potencialmente ocratoxígenos en uva pasa (*Vitis vinifera*).

Que presenta el pasante: **José Luis Granados Becerril**
Con número de cuenta: 305329712 para obtener el Título de la carrera: Ingeniería en Alimentos

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 04 de Marzo de 2016.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. José Francisco Montiel Sosa	
VOCAL	Dra. Clara Inés Álvarez Manrique	
SECRETARIO	I.A. Miriam Álvarez Velasco	
1er. SUPLENTE	Dra. María Andrea Trejo Márquez	
2do. SUPLENTE	M. En C. Alma Adela Lira Vargas	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

IHM/cga

Dedicatoria

Dedico este trabajo a mi mamá y a mi papá por su apoyo incondicional en todo momento, son el mejor ejemplo de perseverancia. Gracias por su cariño, sin ustedes no lo hubiese logrado.

A mi hermano César, a Diego y Majo. Este trabajo es también para ustedes, los quiero.

A mi abuelita Cristi, por su cariño y aliento para conseguir mis objetivos.

A Rebe, solamente tu sabes lo que me ha costado, gracias por aguantarme y estar conmigo en los momentos más difíciles de mi vida. Te amo mi amor

A mi tía Vero, mi abuelita Alicia y Sr. Carlos, que en paz descansen. Gracias por su cariño.

Mis agradecimientos al Dr. Francisco Montiel por recibirme en su laboratorio y animarme a realizar mi tesis. Ha sido un placer conocerle y aprender de usted.

A la Dra. Martha por confiar en mi trabajo, por su paciencia, empatía y generosidad. Gracias por compartir conmigo sus valiosos conocimientos.

A la Maestra Jose, por su solidaridad e incondicional apoyo para realizar los ensayos de Biología Molecular.

Un especial agradecimiento a Vero y Laurita, su ayuda no tiene precio.

No puedo olvidar en mis agradecimientos a mis maestros de carrera, son los mejores, gracias por todas las experiencias vividas.

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	
2. ANTECEDENTES.....	1
2.1 Generalidades.....	1
2.1.1 Uso de la uva en México.....	1
2.1.2 Producción nacional de uva pasa.....	2
2.1.2.1 Principales regiones productoras en México.....	3
2.1.3 Definición de la uva pasa.....	5
2.1.4 Morfología de la uva.....	5
2.1.5 Composición química.....	7
2.1.6 Valor nutricional de la uva pasa.....	7
2.1.7 El Codex para las uvas pasas.....	8
2.1.8 Principales variedades de uva utilizadas para pasificación.....	10
2.1.9 Proceso de elaboración de uva pasa.....	11
2.1.9.1 Lejiado.....	11
2.1.9.2 Sulfuración.....	13
2.1.9.3 Secado natural.....	14
2.1.9.4 Secado artificial.....	14
2.1.10 Prevención y control de la contaminación fúngica.....	17
2.2 El género <i>Aspergillus</i>	17
2.2.1 Sección Nigri.....	18
2.2.1.1 <i>Aspergillus niger/Aspergillus</i> <i>tubingensis</i>	19
2.2.1.2 <i>Aspergillus japonicus/Aspergillus</i> <i>aculeatus</i>	20
2.3 Principales hongos productores de Ocratoxina A.....	20
2.4 Ocratoxina A (OTA).....	22
2.4.1 Toxicidad.....	23
2.4.2 Estructura química.....	24
2.4.3 Biosíntesis de la Ocratoxina A.....	24

2.4.4 Factores relacionados con la producción de Ocratoxina A.....	26
2.5 Principales alimentos contaminados con Ocratoxina A.....	26
2.6 Legislación.....	27
2.7 Métodos de identificación molecular para hongos.....	29
2.7.1 Especies uniseriadas.....	29
2.7.1.1 <i>Aspergillus japonicus</i> / <i>Aspergillus aculeatus</i>	29
2.7.2 Especies biseriadas.....	30
2.7.2.1 <i>Aspergillus carbonarius</i>	30
2.7.2.2 <i>Aspergillus niger</i>	31
2.8 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	34
2.8.1 Fundamento.....	35
2.8.2 Ventajas de la PCR.....	37
2.8.3 Desventajas de la PCR.....	38
2.8.4 Aplicaciones de la PCR en trazabilidad alimentaria.....	39
3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	
3.1 Cuadro metodológico.....	41
3.2 Objetivos.....	42
3.3 Materiales y métodos.....	42
3.3.1 Material biológico.....	42
3.3.2 Obtención de cultivos monospóricos de los aislamientos.....	43
3.3.3 Evaluación de la producción de Ocratoxina A de los aislamientos.....	44
3.3.4 Identificación morfológica de especies de <i>Aspergillus</i> sección Nigri ocratoxígenas.....	45
3.3.5 Pruebas de Ehrlich.....	46
3.3.6 Selección de primers específicos para la identificación molecular de especies ocratoxígenas.....	46
3.3.7 Extracción de ADN (Wizard Magnetic DNA Purification System for Food).....	47
3.3.8 Ensayos de PCR.....	48
3.3.9 Electroforesis.....	51

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
4.1 Frecuencia de <i>Aspergillus</i> sección Nigri en muestras comerciales de uva pasa.....	54
4.2 Producción de Ocratoxina	
A.....	57
4.3 Identificación morfológica.....	58
4.3.1 Características microscópicas de <i>Aspergillus niger</i>	58
4.3.2 Características macroscópicas de <i>Aspergillus niger</i>	58
4.3.3 Características microscópicas de <i>Aspergillus japonicus</i>	60
4.3.4 Características macroscópicas de <i>Aspergillus japonicus</i>	60
4.4 Pruebas de Ehrlich.....	62
4.5 Ensayos de PCR específicos para <i>Aspergillus</i> toxígenos.....	64
4.5.1 Especificidad de los primers ITS1/NIG para <i>Aspergillus niger</i>	64
4.5.2 Ensayos de PCR específico para <i>Aspergillus niger</i>	65
4.5.3 Especificidad de los primers ITS1/JAP para <i>Aspergillus japonicus</i>	67
4.5.4 Ensayos de PCR específico para <i>Aspergillus japonicus</i>	68
5. CONCLUSIONES.....	70
6. PERSPECTIVAS.....	71
7. RECOMENDACIONES.....	72
8. REFERENCIAS.....	73

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Principales usos de la uva en México.....	2
Figura 2. Producción de uva pasa 2005-201.....	4
Figura 3. Rendimiento de uva pasa 2005-2013.....	4
Figura 4. Diagrama de la baya.....	5
Figura 5. Conidióforos a) uniseriado y b) biseriado.....	19
Figura 6. Estructura química de la Ocratoxina A.....	24
Figura 7. Alimentos contaminados con Ocratoxina A.....	27
Figura 8. Etapas de la PCR.....	36
Figura 9. Programa de amplificación para <i>A. niger</i>	49
Figura 10. Programa de amplificación para <i>A. japonicus</i>	49
Figura 11. Incidencia de <i>Aspergillus</i> y <i>Penicillium</i> en 10 muestras comerciales de uva pasa.....	54
Figura 12. Presencia de <i>Aspergillus</i> y <i>Penicillium spp.</i> en 10 muestras comerciales de uva pasa en medio MEA.....	56
Figura 13. <i>Aspergillus niger</i> observado al microscopio 40X.....	58
Figura 14. Morfología de <i>Aspergillus niger</i>	59
Figura 15. <i>Aspergillus japonicus</i> observado al microscopio 40X.....	60
Figura 16. Morfología de <i>Aspergillus japonicus</i>	61
Figura 17. Pruebas de especificidad con fragmento de 420 pb para la especie <i>A. niger</i>	64
Figura 18. Amplificados de PCR con fragmentos de 420 pb utilizando el par de primers ITS1/NIG, carriles 1-6.....	65
Figura 19. Amplificados de PCR con fragmentos de 420 pb utilizando el	

par de primers ITS1/NIG, carriles 7-12.....	66
Figura 20. Pruebas de especificidad con fragmento de 520 pb para la especie <i>A. japonicus</i>	67
Figura 21. Amplificados de PCR con fragmentos de 520 pb utilizando el par de primers ITS1/JAP, carriles 1-7.....	68

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición química de la uva.....	7
Tabla 2. Información nutrimental de la uva pasa.....	7
Tabla 3. Tolerancia para los defectos en uva pasa.....	9
Tabla 4. Características microscópicas de <i>A. niger</i>	19
Tabla 5. Características microscópicas de <i>A. japonicus</i>	20
Tabla 6. Especies productoras de Ocratoxina A (OTA).....	21
Tabla 7. Factores bióticos, abióticos e intrínsecos relacionados en la producción de OTA.....	26
Tabla 8. Niveles de OTA admitidos en países de Europa y América Latina.....	29
Tabla 9. Pares de primers ITS1 frontal, NIG y JAP reversos.....	47
Tabla 10. Componentes para PCR.....	50
Tabla 11. Concentración de agarosa recomendada para separar moléculas de ADN lineales.....	52
Tabla 12. Componentes de electroforesis.....	53
Tabla 13. Capacidad de producción de Ocratoxina A de las cepas de la sección Nigri.....	57

Tabla 14. Características microscópicas de <i>Aspergillus niger</i>.....	58
Tabla 15. Características macroscópicas de <i>Aspergillus niger</i> desarrolladas en diferentes medios de cultivo.....	59
Tabla 16. Características microscópicas de <i>Aspergillus japonicus</i>.....	60
Tabla 17. Características macroscópicas de <i>Aspergillus japonicus</i> desarrolladas en diferentes medios de cultivo.....	61
Tabla 18. Resultados de la reacción de Ehrlich en CYA después de 7 días de incubación a 25 °C de las cepas de la sección Nigri.....	62

RESUMEN

Para minimizar la entrada de OTA y otras micotoxinas en la cadena alimentaria, se ha hecho necesaria la utilización de herramientas de diagnóstico rápido, para poder monitorear los puntos de control críticos de forma efectiva. Sin embargo, el reconocimiento de las numerosas especies del género *Aspergillus* es difícil y requiere expertos en taxonomía, ya que tradicionalmente se han empleado métodos basados en características morfológicas. Por esta razón, el objetivo del presente trabajo fue desarrollar una estrategia basada en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la detección y diferenciación de especies de *Aspergillus* con capacidad toxígena (*A. niger* y *A. japonicus*) aisladas de muestras comerciales de uva pasa producida en la región noroeste de México. Así, se han desarrollado dos ensayos, basados en la técnica de PCR, para la detección de las especies *A. niger* y *A. japonicus* con capacidad para producir OTA. Los ensayos de PCR fueron rápidos, sensibles y específicos, y representaron una buena herramienta para la detección de especies cercanas de *Aspergillus* sección Nigri en muestras de pasas.

Se confirmó la presencia de especies toxígenas en las pasas con producción de 0.9 a 5.7 ppb y se comprobó que *Aspergillus japonicus* también presenta capacidad para producir Ocratoxina A en el 80% de los aislados.

Se concluye que ninguna de las especies aisladas representan un peligro para la salud humana debido a las bajas concentraciones de OTA que producen.

INTRODUCCIÓN

Las pasas, también conocidas como uvas pasas son los frutos secos más populares y antiguos del mundo, en cualquier cultura gastronómica hay recetas donde son parte importante y diferencial de muchos platillos, como guisos de carne, rellenos, pasteles, pudines, panes, salsas, helados y bebidas o dulces artesanales, además de ser una golosina natural. Como la mayoría de los frutos deshidratados, la uva pasa es susceptible a la contaminación fúngica, la cual puede ocurrir durante el ciclo del cultivo, el secado o el almacenamiento. La contaminación de la uva pasa es ocasionada por especies del género *Aspergillus* pertenecientes a la sección Nigri, principalmente *Aspergillus niger* y *Aspergillus carbonarius* aunque algunos estudios recientes han reportado también a la especie *A. japonicus* y algunas especies del género *Penicillium* (73). La principal toxina presente en la uva pasa es la Ocratoxina A (OTA), la cual está recibiendo mayor atención debido a sus efectos tóxicos y a la presencia que tiene en un amplio rango de alimentos. La ingestión crónica de OTA a través del consumo de uvas y sus derivados puede ocasionar la aparición de un efecto tóxico en el riñón, el sistema inmune y el sistema nervioso (53,49). Las técnicas de identificación convencionales de hongos toxígenos utilizan pruebas taxonómicas basadas en la observación de características morfológicas como forma y tamaño de los conidios, color, longitud de estipe, etc. No solamente toman mucho tiempo en llevarse a cabo, también se necesita de un experto en taxonomía y no aseguran resultados precisos en la identificación porque siempre existe subjetividad en ellas (48). Sin embargo avances recientes basados en la Biología Molecular han permitido la identificación rápida y precisa de hongos toxígenos y en particular de *Aspergillus* sección Nigri. Los métodos basados en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) son una buena alternativa para el diagnóstico, por su alta especificidad y sensibilidad para la identificación de cada especie. La falta de información en México sobre la presencia de *Aspergillus* sección Nigri productores de Ocratoxina A en uva pasa, y la importancia de establecer límites regulatorios para esta toxina en la uva y sus derivados son la principal razón para llevar a cabo este trabajo; sin embargo también se evalúa la capacidad de producción de Ocratoxina A de los aislados para finalmente ensayar una metodología basada en la PCR,

con primers específicos reportados en la literatura científica reciente, para conseguir la identificación rápida y confiable de las especies productoras de OTA en uva pasa.

2. ANTECEDENTES

2.1 Generalidades

2.1.1 Uso de la uva en México

Los tipos de subproductos derivados de la uva mexicana no han mostrado variaciones anuales importantes en los porcentajes de participación relativa (ver figura 1). A partir de 2008 la producción de uva pasa empezó a aumentar tanto en términos absolutos como en participación relativa, estos cambios estuvieron acompañados por una menor producción de uva para uso industrial.

En cuanto a la producción por destino del cultivo 2005-2013 se observa que a partir de 2012 la uva fruta ha sido hegemónica con alrededor del 75% del total. Este patrón no ha variado significativamente principalmente porque es el destino que mayor oferta tiene, tanto a nivel nacional como internacional, en donde Estados Unidos ha sido el principal destino de las exportaciones. A partir de 2007 la uva industrial ha tenido un retroceso en su producción hasta alcanzar un promedio de participación relativa menor a 25%, mientras que la uva pasa promedia una participación relativa del 4%.

Desde finales de la última década, la uva pasa ha comenzado a tener un incremento sostenido en su producción del 10% con respecto al año inmediato anterior en términos absolutos con excepción del año 2013. En sólo 8 años, el aumento en la producción de la uva pasa fue de casi 50% con respecto a la producción de 2005 (1).

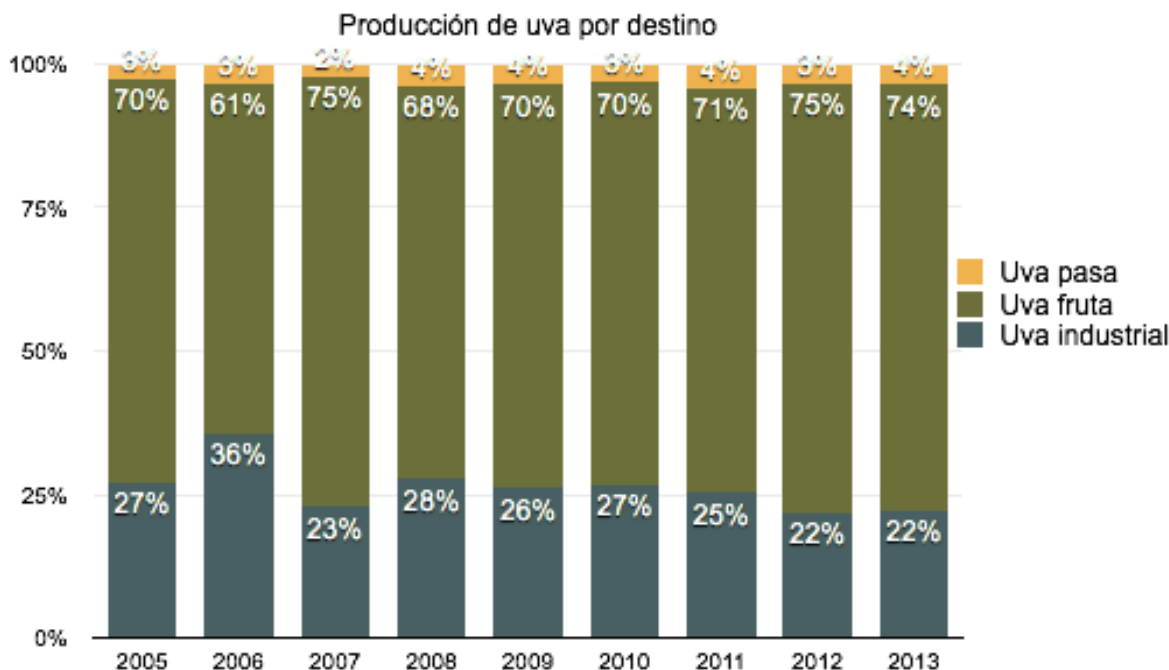


Figura 1. Principales usos de la uva en México

2.1.2 Producción nacional de uva pasa

En el país, 70% de la producción de uva de mesa está representada por los productores del estado de Sonora a través de la Asociación Agrícola Local de Productores de Uva de Mesa (AALPUM). Esta asociación representa 88% del total de las exportaciones de uva fruta y uva pasa en el país. La zona vitícola mexicana está ubicada entre los 22° y 23° latitud norte, en el centro-norte del país donde los suelos son muy arcillosos, de mediana a poca profundidad en su mayoría, con gran capacidad de retención de humedad lo que constituye un aspecto altamente favorable para el desarrollo de las viñas (1).

Para el año 2014, 12 estados cosecharon uva. Tradicionalmente los estados que producen uva son: Aguascalientes, Baja California, Baja California Sur, Chihuahua, Coahuila, Durango, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, Estado de México, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Sonora y Zacatecas. Sin embargo, de estos solo cinco concentran el noventa y cinco por ciento de la superficie cosechada: Sonora, Zacatecas, Baja California, Aguascalientes y Coahuila. De los cuales sólo Sonora y Baja California destacan por ser productores de uva pasa (1).

La producción de uva en México ha presentado cambios drásticos en los últimos 20 años. Actualmente, la superficie sembrada sólo representa el 40% del área alcanzada en la década de los años 80. De 1980 a 2012, esta caída promedio 3.48% anual, aunque ha habido años con crecimientos marginales de un periodo a otro (1)

Entre 2005 y 2013, la producción nacional de uva pasa promedió 10 mil 320 toneladas anuales. Sin embargo, esta cifra no refleja el comportamiento a lo

largo de los últimos 9 años, ya que entre 2005 y 2007, el promedio de producción fue de 8 mil 400 toneladas frente a una media igual a 11 mil 300 toneladas a partir del año 2008. Pese a que la cantidad de hectáreas sembradas para la producción de uva pasa ha sido constante (entre 3,600 y 3,950), la producción de uva pasa en México experimentó una mejora notable en la relación cosecha-siembra. Por dar unos datos, esta relación pasó de 0.68 en 1980 a 0.98 en 2007. De esta forma, el día de hoy se cosecha el 98% de cada unidad sembrada. Durante el periodo de 2005 a 2013 la razón ha estado en torno a 1 entre la superficie cosechada y la superficie sembrada en uva pasa (72).

2.1.2.1 Principales regiones productoras en México

De la producción de uva para pasa en el país, 98% se presenta prácticamente en dos entidades de la República Mexicana. Éstas son Sonora y Baja California. Durante el periodo 2007-2012, la superficie destinada para este fin fue por el orden de las 3,530 hectáreas, de las que Sonora significa 94.7% y Baja California, 4.3% (1,72).

Datos del SIAP muestran que la producción nacional de uva pasa en el 2012 fue del orden de las 13,130 toneladas (ver figura 2 y 3), con un rendimiento promedio por hectárea de 3.57 toneladas y un valor de producción de 127.44 millones de pesos (72).

Se observa que en Sonora (ver figura 3), los rendimientos son más altos que en Baja California. Por dar un dato, mientras en Sonora se cosechan en promedio 2.9 toneladas por hectárea de uva pasa en Baja California se obtienen 2.3 toneladas por hectárea con excepción del 2010 donde el rendimiento fue de 3.85 en Baja California mientras que en Sonora fue de 3.15.



Figura 2. Producción de uva pasa 2005-2013 SIAP

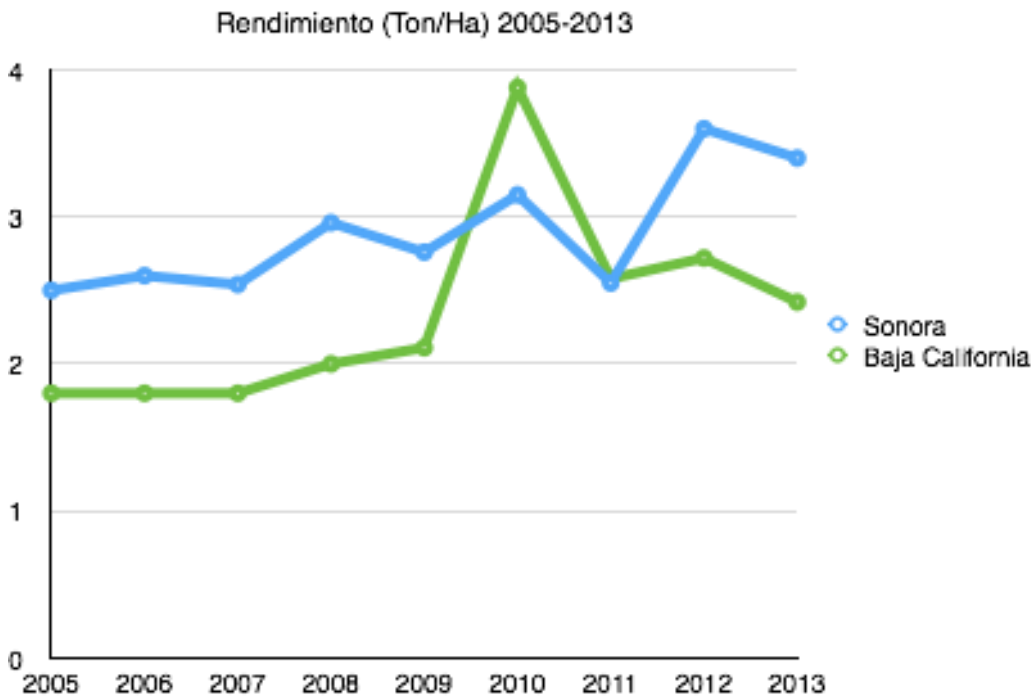


Figura 3. Rendimiento de uva pasa 2005-2013 SIAP

2.1.3 Definición de la uva pasa

De acuerdo al Codex Alimentarius, las uvas pasas son el producto preparado con uvas secas sanas de variedades que se ajustan a las características de *Vitis vinifera* L. (con exclusión de las pasas de Corinto) elaboradas en una forma apropiada para obtener uvas pasas comercializables, con o sin recubrimiento con ingredientes facultativos adecuados (19).

2.1.4 Morfología de la uva

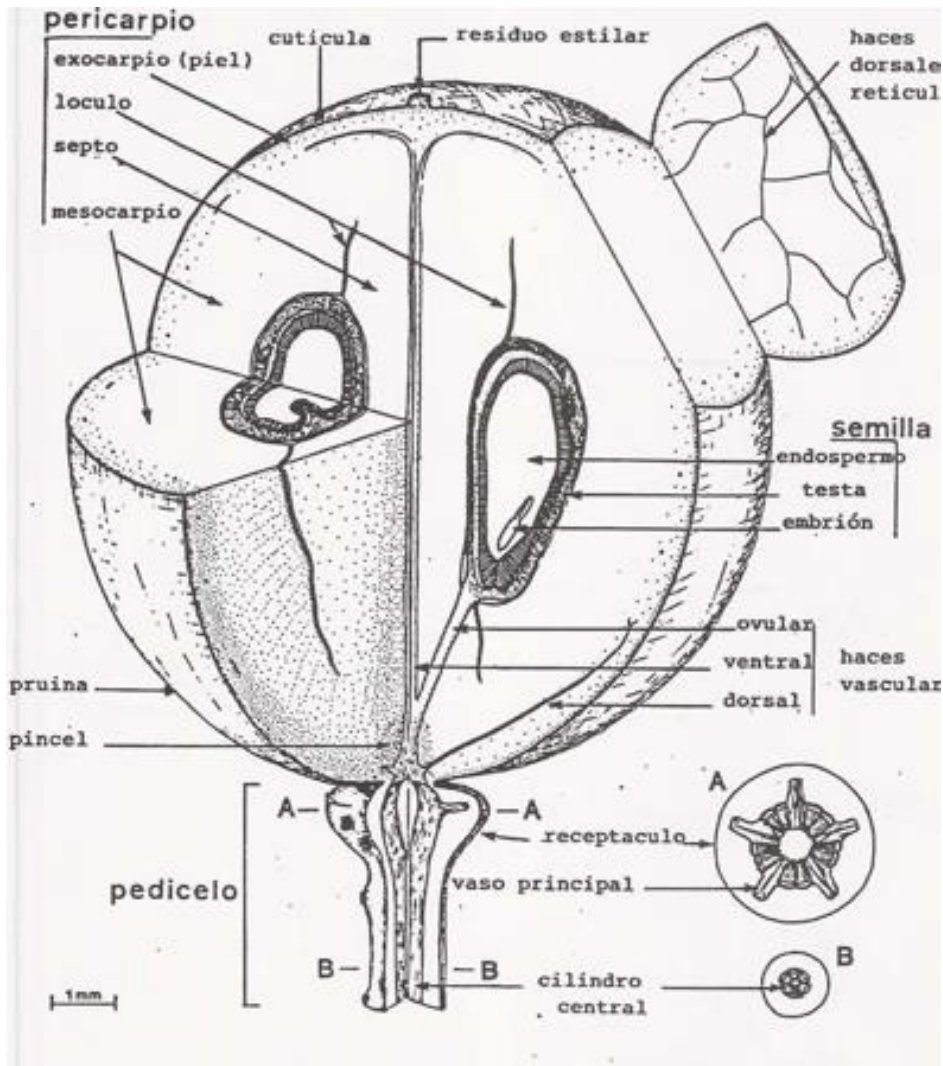


Figura 4. Diagrama de la baya

Como se muestra en la figura 4, la uva es una baya de forma y tamaño variables. Más o menos esférica u ovalada, Y por término medio de 12 a 18 mm de diámetro. Se distinguen tres partes:

Hollejo (epicarpio): Es la parte más externa, sirve de protección del fruto. Membranoso y con epidermis cutinizada, elástico. En su exterior aparece una capa serosa llamada pruina. La pruina se encarga de fijar las levaduras que fermentan el mosto y también actúa como capa protectora. El color del hollejo varía según el estado fenológico en el que se encuentra. En la fase herbácea es de color verde y a partir del envero es de color amarillo en variedades blancas, y rosado o violáceo, en variedades tintas. Es el responsable del color, pues es donde residen los polifenoles que dan color al mosto (antocianos y flavonoides). En las variedades tintoreras también se acumula materia colorante en la pulpa.

Pulpa (mesocarpio): Representa la mayor parte del fruto. La pulpa es translúcida a excepción de las variedades tintoreras (acumulan aquí sus materias colorantes) y muy rica en agua, azúcares, ácidos (málico y tartárico principalmente), aromas, etc. Se encuentra recorrida por una fina red de haces conductores, denominándose pincel a la prolongación de los haces del pedicelo.

Pepitas: Las pepitas son las semillas rodeadas por una fina capa (endocarpio) que las protege. Son ricas en aceites y taninos. Están presentes en número de 0 a 4 semillas por baya. A la baya sin semillas se le denomina baya apirena. Exteriormente se diferencian tres zonas: pico, vientre y dorso. En su interior nos encontramos el albúmen y el embrión (40).

2.1.5 Composición química

Componente	Pulpa	Pepitas	Hollejo
Agua	70-80%	25-45%	60-70%
Carbohidratos	15-25%	34-36%	20-25%
Ácidos grasos	-	1%	-
Ácidos orgánicos	0.5-1%	-	0.1-0.3%
Minerales	0.2-0.3%	2-4%	-
Proteínas	0.05-0.1%	4-6.5%	10-15%
Taninos y Procianidinas	-	4-6%	0.1-1%

Tabla 1. Composición química de la uva (22)

2.1.6 Valor nutricional de la uva pasa

Tabla 2. Información nutrimental por 100 gramos de porción comestible de uva pasa (Uva blanca - Uva negra)	
Calorías	63 - 67
Carbohidratos (g)	16.1 - 15.5
Fibra (g)	0.9 - 0.4
Potasio (mg)	820
Magnesio (mg)	10 - 4

Calcio (mg)	64
Vitamina B1 (mg)	0.087
Vitamina A (mg)	0.085
Acido Fólico (µg)	16 - 26
Vitamina B2 (mg)	0.1
Sodio (mg)	133
Hierro (mg)	2
Fosforo (mg)	132
Cloro (mg)	82
Azufre (mg)	51

Tabla 2. Información nutrimental de la uva pasa (39)

2.1.7 El Codex para las uvas pasas

Algunos factores esenciales de composición y calidad considerados en esta norma

Requisitos mínimos de calidad

Las uvas pasas habrán sido preparadas con tales materias y con arreglo a tales prácticas que el producto terminado posea las características normales de color, sabor y madurez del tipo respectivo, y cumplirán además los siguientes requisitos:

a) Contenido de humedad

Tipo Moscatel Málaga 31% máximo

Forma de presentación sin pepitas 19% máximo

Todas las demás formas de presentación y tipos 18% máximo

b) Impurezas minerales. No deben estar presentes en cantidades tales que afecten a la comestibilidad o el empleo del producto

c) Otros defectos. Las pasas deben estar prácticamente exentas de pedúnculos, materias vegetales extrañas y daños

Tolerancias para los defectos

Tabla 3. Tolerancia para los defectos en uva pasa		
Defecto	Tipos sin pepitas	Tipos con pepitas
	Máximo	
Trozos de pedúnculo (en las formas “sin pedúnculos”)	2 por Kg	2 por Kg
Pedicelos (excepto en el tipo de Moscatel Málaga “con pedicelo”)	50 por 500 g	25 por 500 g
No maduras o subdesarrolladas	6% en peso	4% en peso
Dañadas	5% en peso	5% en peso
Azucaradas	15% en peso	15% en peso
Pepitas (en las formas de presentación “sin pepitas”)	-	20 por 500 g

Higiene

Se recomienda que el producto a que se refieren las disposiciones de esta norma se prepare y manipule de conformidad con las secciones correspondientes del Código Internacional Recomendado de Prácticas. -Principios Generales de Higiene de los Alimentos (CAC/RCP 1-1969)-, y con los demás Códigos de Prácticas recomendados por la Comisión del Codex Alimentarius que sean aplicables para este producto.

En la medida compatible con las buenas prácticas de fabricación, el producto estará exento de materias objetables.





Analizado con métodos adecuados de muestreo y examen, el producto:

- Deberá estar exento de microorganismos en cantidades que puedan constituir un peligro para la salud;
- Deberá estar exento de parásitos que puedan representar un peligro para la salud; y

- No deberá contener, en cantidades que puedan representar un peligro para la salud, ninguna sustancia originada por microorganismos (19).

2.1.8 Principales variedades de uva utilizadas para pasificación

Las variedades de uvas que se destinan para pasas son las uvas sin semillas, entre las que se encuentran las variedades Thompson, Flame, Superior, Perlette, Fiesta y Ruby seedless; siendo la variedad Thompson la de mayor preferencia entre los consumidores.

	<p>Flame Seedless Origen: Fresno, California, 1973. Racimo de tamaño medio-grande, cónico, compacidad mediana y forma cónica alada, relativamente sueltos y de un peso promedio, preparado para exportación que fluctúa aproximadamente entre 550 y 750 gramos. Las bayas son sin semilla, de color rojo suave a rojo brillante, de forma esférica ligeramente aplastada (1,22).</p>
	<p>Sugraone (Superior) Origen: Madera, California, 1971. El racimo es grande, alargado y relativamente suelto, uniforme y abundante. El peso promedio, una vez preparado para exportación fluctúa entre 550 y 700 gramos. Las bayas son grandes, sin semilla, alargadas, ovales, a ligeramente ovoides, la piel es de color verde claro a amarillento y de un diámetro ecuatorial que fluctúa entre 18 y 19 mm (1,22).</p>
	<p>Perlette Origen: Davis, California, 1946. Las bayas son blancas o amarillo pálido, esféricas, pequeñas, de sabor neutro y pulpa crujiente. La piel es media, resistente y poco pruinosa, el racimo es medio a grande, cilíndrico, cónico, alado, con dos alas y compacto (1,22).</p>
	<p>Thompson Origen: Oriente Medio, introducida a América en el siglo XIX. Racimos grandes, cónicos y muy alargados, de compacidad media, con pedúnculo largo y elevada lignificación, las bayas son pequeñas, de forma ovoide o elíptico corta, de sección circular y color verde amarillento claro en maduración. El hollejo fino, con poca pruina y con lenticelas y cicatriz estilar poco marcadas (1,22).</p>



Ruby Seedless

Origen: Universidad de California, 1968.

La baya es de color rojo y sus principales usos son como uva de mesa o para pasificación. Ruby Seedless es conocida por su capacidad para madurar las cosechas hasta tamaños extremadamente grandes. Los racimos están bien llenos para compactar, lo que es propenso a la pudrición (1,22).

2.1.9 Proceso de elaboración de uva pasa

La pasificación de las uvas puede conducirse de diversas maneras según la desecación sea natural al sol o a la sombra, artificial en secaderos o mixta de ambos sistemas. También puede diferir en la existencia o no de tratamientos previos, lejiado y sulfurado, conducentes a acelerar el secado o a conservar el color de las pasas (39,40).

2.1.9.1 Lejiado

El lejiado de la uva consiste en tratarlas con soluciones alcalinas que disuelven la pruina y atacan más o menos enérgicamente el hollejo, al mismo tiempo que la pulpa, dilatada por el calor, cuando el tratamiento es en caliente, tiende a fisurar la piel, con lo que se consigue una mayor rapidez en el secado. Secundariamente la lejía facilita la conservación de las pasas, haciendo más difícil el enmohecimiento de las mismas.

El lejiado puede realizarse en frío o en caliente, variando en cada uno de ellos la clase de lejía.

El tratamiento del frío con lejía de cenizas de laurel rosa, sarmientos, etcétera, se empleaba antiguamente. La solución se preparaba añadiendo un poco de aceite de oliva al agua de ceniza, con densidad 5 a 7° Baumé. Las uvas se secaban al sol después de haber sido sumergidas en la lejía unas 10 a 12 veces.

Por este sistema se obtenían pasas de buena calidad, con color claro. Actualmente se sustituyeron las lejías de cenizas por carbonato potásico y sódico.

El tratamiento en frío con lejía de carbonato potásico preparada a la densidad 4 a 9° Baumé. Con esta solución es posible obtener pasas de buena calidad.

Se emplea también el tratamiento del frío con carbonato potásico y secado a la sombra. La lejía se prepara con un 5% de carbonato, en la que se emulsiona un 0.4% de aceite de oliva.

Las uvas se sumergen en la lejía a 35 a 38°C durante uno a cuatro minutos, hasta que aproximadamente pierden tres cuartas partes de su lozanía.

Después de la inmersión se secan en estanterías a la sombra, pulverizándolas ligeramente al día siguiente de puestas, y semanalmente

hasta secas, con la misma lejía de la inmersión. Prácticamente secas, se les lava rápidamente en una solución al 0.5% de carbonato potásico conteniendo el 0.4% de aceite de oliva emulsionado, para separar los depósitos posados de carbonato formados por la inmersión inicial y las pulverizaciones. Finalmente, con el fin de secarlas del último lavado y cambiarles el color verdusco en amarillo o ligeramente marrón, se les expone al sol durante uno o dos días (39,40).

En el tratamiento en caliente con lejía de cenizas, la lejía se prepara casi siempre a base de cenizas de cáscara de almendra mezcladas con cal viva con la siguiente técnica: Por cada 180 litros de cenizas se agregan 19 kilogramos de cal viva; la mezcla se lleva a pequeños depósitos de fábrica, en cuyo fondo se pone una capa de paja que sirve como filtro y se añade agua para apagar la cal y formar una pasta. Por un agujero en la parte baja del depósito sale la lejía clara y concentrada, que luego, y a medida del uso se diluye para el escaldado.

Como término medio, la concentración de lejía diluida corresponde ah unos 25 a 30 kg de ceniza por cada hectolitro de agua. A la lejía se agregan muchas veces hierbas aromáticas. Durante los escaldados se añade de cuando en cuando un poco de lejía concentrada para conservar constante su “fuerza”.

Circunstancialmente, cuando ésta no es suficiente, se le refuerza con un poco de sosa cáustica.

En la lejía hirviendo se sumergen cazos de tela metálica y llenos de racimos (unos 8 Kg). Durante uno o dos segundos para que la lejía moje bien todas las uvas, e inmediatamente se sacan y se extienden uniformemente para su secado al sol. La pasificación por este sistema dura de seis a 10 días (39,40).

2.1.9.2 Sulfuración

La sulfuración tiene por objeto conservar el color natural de las uvas, prolongar su conservación, retardar la pérdida de vitaminas y contrarrestar el desarrollo de microorganismos.

El mejor sistema de sulfuración consiste en exponer las uvas a los vapores de azufre en combustión en el interior de una caja o cámara cerrada, que las suele contener en bandejas, dejándolas el tiempo mínimo necesario para que el gas alcance y penetre en la pulpa del fruto. La operación se realiza, generalmente, después del lejiado con sosa, facilitándole así la absorción del ácido sulfuroso.

La cantidad de azufre que se emplea varía con el tiempo de exposición y con la temperatura, así como la variedad, calidad, tamaño y grado de madurez de la uva. Normalmente se utilizan concentraciones de ácido sulfuroso comprendida entre 1,5 a 2% en volumen, lo que se suele lograr quemando de uno a dos gramos de azufre por cada kg de uva. El tratamiento dura de dos a cuatro horas, terminando el cual, en las mismas bandejas son expuestas al sol, dándoles vueltas todos los días (39,40).

Mucha de la uva que se sulfura es secada artificialmente en secaderos, en los que se mantiene veinticuatro horas a la temperatura de 65 a 71°C. Las pasas toman un color amarillo claro. La sulfuración también puede realizarse mediante el empleo de soluciones tituladas de sales sulfurosas, generalmente metabisulfito; pero lo cierto es que los mejores resultados se obtienen por contacto directo con el gas (39,40).

2.1.9.3 Secado natural

El secado natural al sol se practica en aquellas regiones en que la insolación natural así lo permite, con otoños soleados, cálidos, secos y casi sin lluvias. Las uvas, se extienden sobre hojas de papel, telas, tableros o paseros enarenados, en la propia viña o en lugares inmediatos, en capas delgadas, y se les deja secar, envolviéndolas cuando es necesario.

El tiempo preciso para la pasificación depende de la variedad de uva, grado de madurez y, sobre todo, de las condiciones climatológicas, desde algunos días hasta cuatro o cinco semanas.

Las pasas obtenidas con el secado natural al sol presentan una mejor calidad ya que por no estar lejiadas conservan la pruina. Las negras toman un color negro brillante, y las blancas, con relativamente menos pruina, alcanzan un tinte violáceo próximo al negro (39,40).

2.1.9.4 Secado artificial

En las regiones vitivinícolas en que las condiciones atmosféricas no son tan generosas que permitan el secado natural o en las que se quiera hacer un secado más rápido, se recurre a estufas de desecación y secaderos.

Las estufas de desecación son los más simples elementos de desecación artificial, realizándose ésta por efecto del calor radiante del foco calorífico.

Existen infinidad de modelos, cada vez más perfeccionados, que posteriormente cedieron su puesto a los secaderos, más perfectos.

Se pueden agrupar en dos tipos, según que las uvas se dispongan en bateas fijas, que se meten o sacan a mano, o bien que las bateas se coloquen previamente en carretillos introducidos en la estufa, permitiendo que mientras unas se meten cargadas, otras se saquen, después de un período de permanencia, efectuándose así un trabajo, en cierto modo continuo (143).

Las estufas pueden complicarse respecto al tipo descrito, pero en esencia su funcionamiento es el mismo, salvo la carga y descarga; en todas, desde una cámara inferior, el aire calentado por radiación mediante estufas y tuberías de humo, atraviesa los orificios del piso y envuelve a las uvas, produciéndose la evaporación del agua. El aire, impregnado de humedad, sale por orificios o chimeneas practicados en el techo (39,40).

Los secaderos realizan la deshidratación por corriente de aire caliente (entre 65 y 75°C) en vez de calor radiante como las estufas, caracterizándose por aprovechar al máximo el calor, reduciendo al mínimo las pérdidas por

radiación, evitar que el aire se sature de humedad y facilitar la carga y descarga.

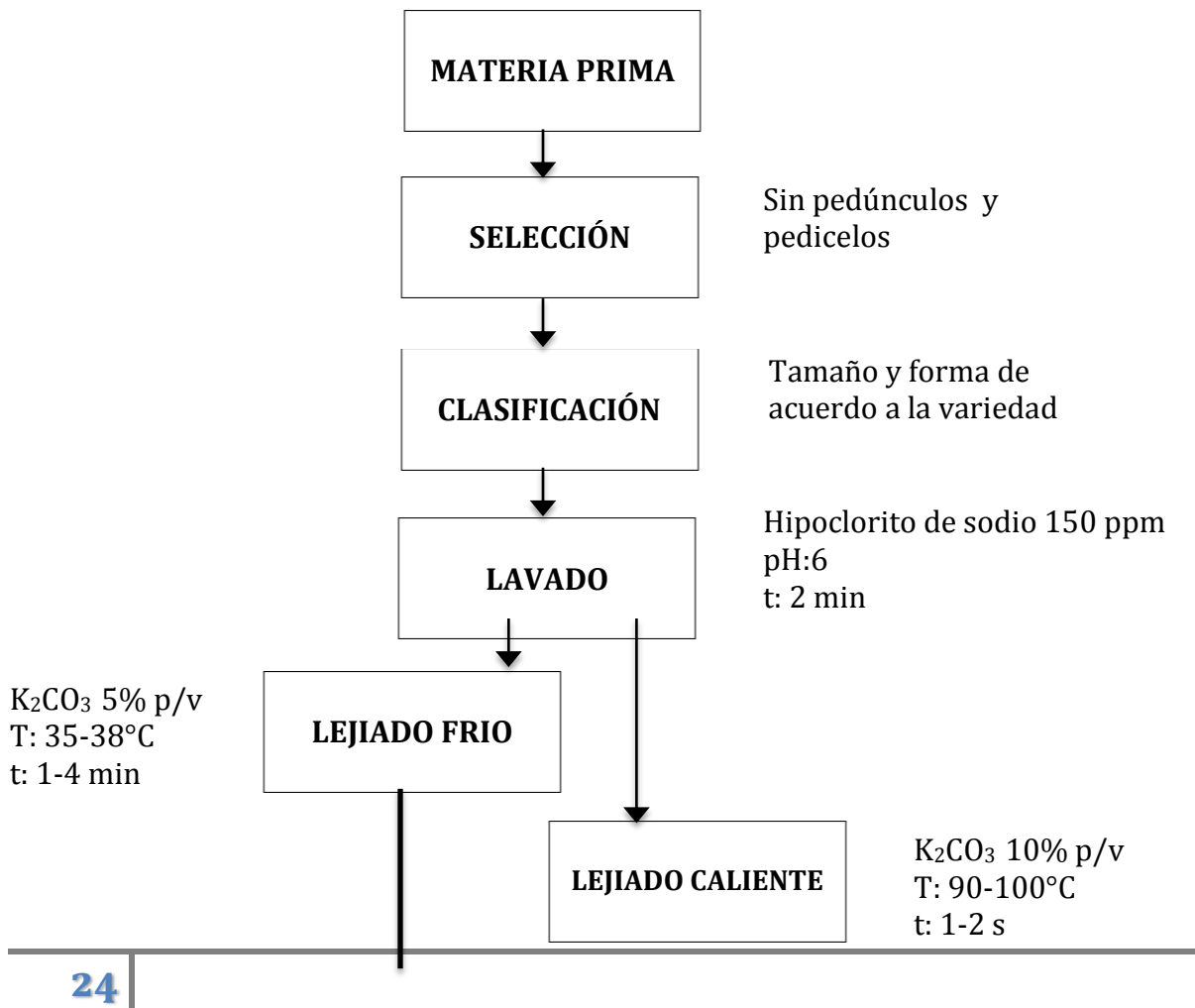
El aire para la desecación se calienta en una cámara situada junto al túnel, impulsándolo un ventilador de baja presión a través de las bandejas que lo llenan. Una parte del aire, cuando está demasiado cargado de humedad, es eliminado, pero el resto puede ser recirculado.

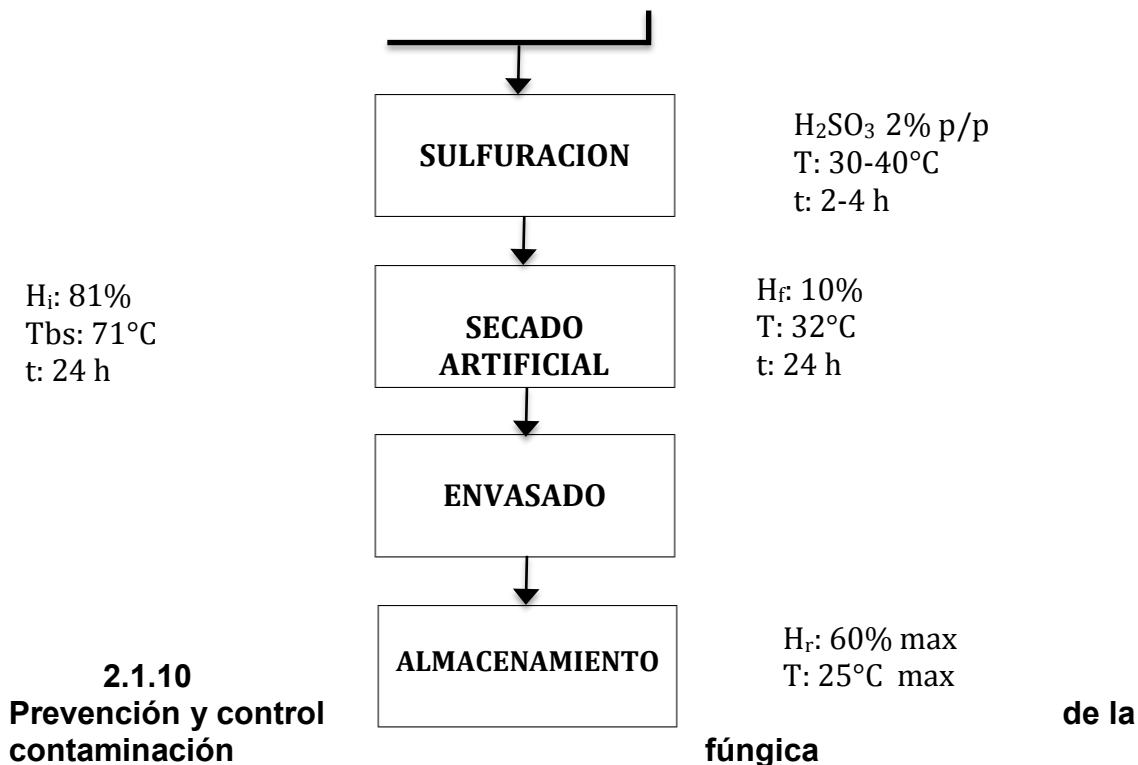
Los secaderos de este tipo son los más utilizados para la deshidratación de la uva, ya que son de fácil manejo y funcionan a satisfacción.

La duración del secado, procesos colegiados previo y 81% de humedad de la uva, viene a durar 24 horas.

Con temperaturas algo más elevadas, en el mismo tiempo de secadero, inferior a los 60°C grados al principio y de 80 a 90°C al final, se han obtenido desecaciones rapidísimas de seis horas para uva Sultanina previamente lejiada (39,40).

Diagrama de bloques para la producción de uva pasa





Se realiza un seguimiento y estimación del riesgo para el cultivo observando podredumbres en racimos para determinar agente causal y conocer incidencia sobre la cosecha.

Se recomienda no manipular los racimos con podredumbre para no facilitar su transmisión a otros sanos. El deshojado, destallado y descolgado de racimos tras la floración y cuajado, favorecen la aireación de estos y disminuyen el riesgo de contaminación de la podredumbre (44).

En la actualidad no hay tratamientos específicos autorizados por lo que no hay un umbral definido para intervenir, sin embargo en variedades tardías, la colocación de cobertura plástica ayuda a reducir los riesgos (30,18).

Se suelen emplear métodos químicos indirectos con aplicaciones paliativas con formulados a base de talcos resecantes, coincidiendo con los periodos de máxima actividad de las podredumbres, para resecar las heridas de las bayas y dificultar el avance de las podredumbres (18).

2.2 El género *Aspergillus*

Aspergillus es un género de hongos anamórficos que se reproducen por producción de fialosporas (conidios nacidos en fiálides). Es un género grande con más de 180 especies reconocidas. Muchas de estas especies son bastante raras. Otros están entre los hongos más comunes distribuidos sobre la tierra. *Aspergillus* se caracteriza por sus conidióforos distintivos. La base de los conidióforos generalmente forman una "T" o una "L" que se conectan con las hifas vegetativas. Esto es comúnmente conocido como

“célula pie” aún cuando no es una célula independiente. La estipe se extiende desde la célula pie y puede ser muy corta (50 μm o menos) hasta muchos milímetros de longitud. El ápice de la estipe se expande dentro de la vesícula. Las vesículas pueden tener diferentes formas (48). En algunas especies, las fiálides productoras de conidios surgen directamente de la vesícula. Esta forma es conocida como uniseriada. En otras especies, hay una segunda capa de células entre la vesícula y las fiálides. Estas células son llamadas métulas y *Aspergillus* con métulas se refiere a especies biseriadas. Una característica importante que distingue *Aspergillus* de otros géneros estrechamente relacionados es que las fiálides/métulas surgen simultáneamente en la vesícula (67).

Algunas especies que producen *Aspergillus* anamórfos también producen un estado sexual. Por definición, *Aspergillus* es un género asexual (anamórfico). Los estados sexuales corresponden a ocho o más géneros teleomórficos. Algunos autores podrían argumentar que, una vez que un estado teleomórfico es encontrado, el nombre anamórfico ya no debería ser utilizado. Así que, actualmente aquellas especies con estados teleomórficos tienen dos nombres legales, y el nombre *Aspergillus* deberá utilizarse solamente cuando se refiera al estado asexual, el estado anamórfico. En *Aspergillus* el estado teleomórfico es encontrado muy rara vez (79,66).

2.2.1 Sección Nigri

Las especies de *Aspergillus* de color negro, incluidas dentro de la sección Nigri, han sido ampliamente estudiadas durante los últimos setenta años, sobre todo mediante la utilización de criterios morfológicos. A pesar de ser intenso objeto de estudio y de que en los últimos años también se han utilizado criterios bioquímicos y moleculares para su clasificación, ésta aún sigue siendo controvertida y problemática (8).

Las diferencias en el número de especies reconocidas por diferentes autores demuestran las dificultades en el establecimiento de criterios claros para la identificación de especies incluidas en esta sección.

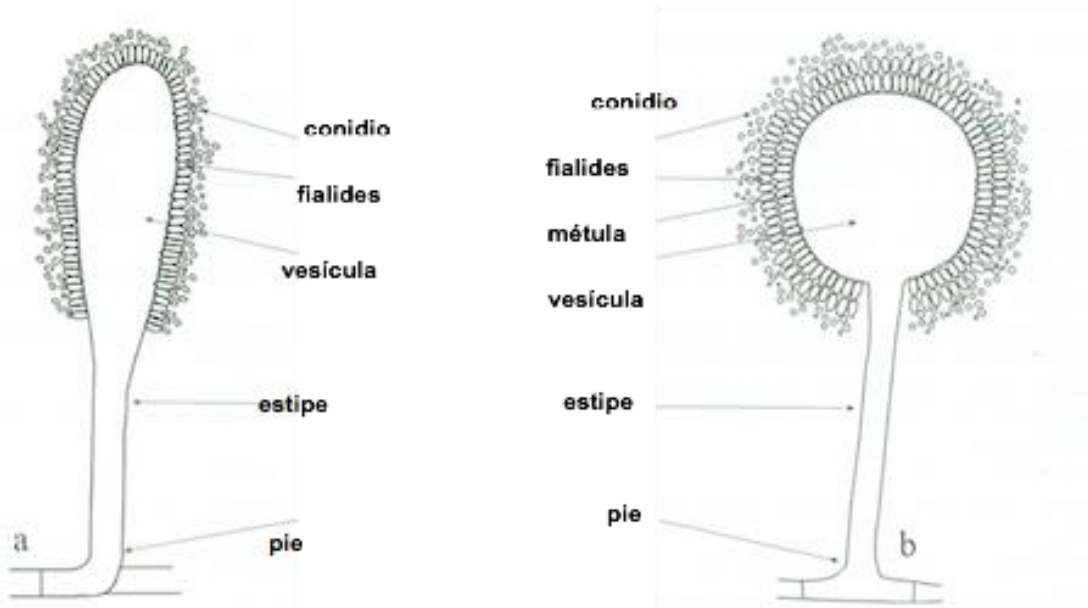


Figura 5. Conidióforos a) uniseriado y b) biseriado

2.2.1.1 *Aspergillus niger*/*Aspergillus tubingensis*

Tabla 4. Características microscópicas de *A. niger*

	CYA25	MEA	CY20S	CYA37	CZ
Díámetro (mm)	55-70	50-70	68-70	50-70	40-62
Color y textura	café oscuro a negras	negras	café oscuro	negras	negras
Características microscópicas	Los conidios son globosos y muy rugosos con crestas irregulares, segmentos basales con paredes gruesas o suaves y son cristalinos, amarillentos o café opaco cerca de los ápices, vesículas casi esféricas, son biseriados y las métulas cubren casi por completo la vesícula.				
Características que los distinguen	Esta especie es muy común y se caracteriza por sus colonias café oscuro a negras, las cabezas conidiales son biseriadas con vesículas largas, métulas bastante largas y conidios irregularmente rugosos				

2.2.1.2 *Aspergillus japonicus*/*Aspergillus aculeatus*

Tabla 5. Características microscópicas de *A.japonicus*

	CYA25	MEA	CY20S	CYA37	CZ
Diámetro (mm)	60-70	60-70	70	20-50	30-70
Color y textura	café oscuro-morado-negro	café oscuro-negros	café oscuro sin exudado	café-negro surcados	café oscuro-morado-negro
Características microscópicas	Los conidios sobresalen, el segmento basal tiene paredes suaves incoloras, las vesículas son globosas o elongadas, es uniseriado, las fialides cubren al menos la mitad de la parte más alta de la vesícula. Los conidios son globosos, subglobosos o elipsoidales, con espinas uniformemente espaciadas.				
Características que los distinguen	Son uniseriados y producen conidios negros.				

2.3 Principales hongos productores de Ocratoxina A

En 1965 la Ocratoxina A fue aislada por primera vez en Sudáfrica a partir de un cultivo de *Aspergillus*. Desde entonces la producción de esta micotoxina se ha asociado a distintas especies entre las más importantes están la sección *Circumdati* y *Nigri* (31).

La sección *Nigri* ha sido la más importante como productora desde la primera producción de esta toxina por *A. niger*, *A. carbonarius* y *A. tubingensis*. Sin embargo existen diferencias en las capacidades de producción entre cada especie, siendo la especie *A. carbonarius* en donde cerca del 100% de las cepas son productoras de esta toxina, en *A. niger* varía entre un 0.6 y 50%. Algunos autores han identificado cepas de *A. japonicus* y *A. aculeatus* como productoras de OTA (5). Esporádicamente, también se ha descrito la producción de OTA por especies de *Aspergillus* no pertenecientes a las secciones *Circumdati* o *Nigri*, como *A. albertensis*, *A. fumigatus* o *A. terreus* (13). Dentro del género *Penicillium*, la producción de OTA se detectó inicialmente en *Penicillium viridicatum* y posteriormente en otras especies, si bien en algunos casos se trataba de cepas erróneamente identificadas. La revisión de la identificación de cepas ocratoxígenas de *P. viridicatum* permitió detectar que, en realidad, se trataba de cepas de *P. verrucosum*. Actualmente, *P. verrucosum* se ha dividido en dos especies ocratoxígenas: *P. verrucosum* y *P. nordicum* (37).

Tabla 6. Especies productoras de Ocratoxina A (OTA).

Género	Subgénero	Sección	Especies	Referencia
	ro			

		Circumd ati	<i>A.melleus</i>	Clieger,1972
		Circumd ati	<i>A.muricatis</i>	Frisvad and Samson,2000
		Circumd ati	<i>A.ochraceus</i>	Van der Merwe et al.,1965
		Circumd ati	<i>A.ostianus</i>	Clieger,1972
		Circumd ati	<i>A.petrakii</i>	Clieger,1972
		Circumd ati	<i>A.sclerotioru m</i>	Clieger,1972
		Circumd ati	<i>A.sulphureus</i>	Clieger,1972
Aspergill us	Circumd ati	Circumd ati	<i>A.persii</i>	Zotti and Corte,2002
		Circumd ati	<i>A.westerdijki ae</i>	Frisvad et al.,2004a
		Circumd ati	<i>A.steynii</i>	Frisvad et al.,2004a
		Circumd ati	<i>A.cretensis</i>	Frisvad et al.,2004a
		Circumd ati	<i>A.flocculosu s</i>	Frisvad et al.,2004a
		Circumd ati	<i>A.pseudoele gans</i>	Frisvad et al.,2004a
		Circumd ati	<i>A.roseoglobu losus</i>	Frisvad et al.,2004a
		Flavi	<i>A.alliaceus</i>	Clieger,1972
		Flavi	<i>A.albertensis</i>	Varga et al.,1996
		Nigri	<i>A.carbonariu s</i>	Horie,1995;Wickl ow et al.,1996;Ter en et al.,1996
		Nigri	<i>A.niger</i>	Abarca et al.,1994
		Nigri	<i>A.lacticoffeat us</i>	Samson et al.,2004
		Nigri	<i>A.sclerotioni ger</i>	Samson et al.,2004
Penicilliu m	Penicilliu m	Penicilliu m	<i>P.verrucosu m</i>	Pitt,1987
		Penicilliu m	<i>P.nordicum</i>	Larsen et al.,2001;Castella et al.,2002

2.4 Ocratoxina A (OTA)

La Ocratoxina A (OTA) se descubrió hace cerca de treinta años por un grupo de investigadores sudafricanos en una investigación sistemática de las micotoxinas. Pertenece a la familia de los policetoácidos y específicamente al grupo de las ocratoxinas. Este grupo tiene la estructura general que puede variar en función del grupo R, además de las diversas estructuras de análogos de OTA. El grupo isocumarina en la molécula es un esqueleto pentaquétido formado a partir de malonato de etilo a través del metabolismo de policetonas. La porción heterocíclica está estructuralmente relacionada con la melanina: un metabolito fúngico generalizado. El átomo de cloro se incorpora en la pentacetona por la acción de una cloropeptidasa L-fenilalanina a partir del metabolismo de ácido shikímico y relacionado con la estructura general a través del grupo carboxilo (9).

La Ocratoxina A es la toxina más común y más estudiada entre las ocratoxinas. La Unión Internacional de Química Pura y Aplicada ha estudiado las características fisicoquímicas de la OTA y permitido especificar varias propiedades de los que aquí están algunos:

- OTA es una masa molar de un sólido blanco con peso molecular de 403,8 g / mol, que tiene un punto de fusión de 90°C cuando se cristaliza a partir de benceno y 169°C cuando se cristaliza a partir de xileno;
- Tienen un máximo de absorción a 333 nm con un coeficiente de extinción molar de 5500 / mol x cm en metanol;
- Tiene un máximo de emisión de fluorescencia a 467 nm en etanol 96% y 428 nm en etanol absoluto.
- OTA es inestable a la luz y el aire, que desaparece o se deteriora después de una breve exposición a la luz, pero principalmente por la humedad. En una solución de etanol puede permanecer estable durante un año en condiciones de refrigeración y oscuridad. Cuando se calienta hasta la descomposición, la molécula emite cloro y óxidos de nitrógeno ahumados tóxicos (30,37).

En comparación con la patulina o ácido penicílico, OTA parece más estable en los alimentos, aunque probablemente es menor en comparación con la aflatoxina.

Una vez formado en la comida, esta molécula puede soportar en cierto grado las diferentes etapas de la elaboración de alimentos (cocción, torrefacción, fermentación). Sin embargo, su resistencia a temperaturas tan altas como 250°C ha demostrado una degradación parcial (30,9,37).

2.4.1 Toxicidad

Se ha relacionado con efectos nefrotóxicos, teratogénicos e inmunosupresores y también ocupa el Grupo 2B carcinógeno (puede causar

cáncer). Se ha involucrado en varios problemas de salud humana como la nefropatía endémica de los Balcanes y el desarrollo de tumores de las vías urinarias y riñones en Túnez y Egipto. OTA también se ha detectado en muestras de sangre humana de individuos sanos de varios países (Suecia, Noruega, Canadá, Alemania, el ex Yugoslavia, Japón e Italia, Francia), donde 22-25% de la población está afectada con niveles de OTA entre 0,1 y 130 ng / ml lo que confirma la amplia exposición a la molécula. En los animales, ciertas nefropatías porcinas y ciertos defectos craneofaciales en aves de corral también se han atribuido a la OTA (49).

Se ha deducido que la presencia en orden descendente del carboxilo (fenilalanina), cloro (C5) e hidroxilo (C8) promueve la toxicidad *in vitro* de la OTA y esto es esencial para su manifestación. También se asume que el grupo fenilalanina permite a la OTA ser guiada a la célula diana (lo que explica la falta de toxicidad de Ota α , que es un precursor de la ocratoxina A). Sólo el grupo isocumarina sería responsable de la toxicidad a través de la formación de una forma abierta OTA (OP-OTA) como resultado de la hidrólisis de la lactona en ciertas condiciones fisiológicas (37,49). Esta forma ha mostrado más toxicidad que la OTA. Además, se ha encontrado que OTA se une a macromoléculas biológicas por enlace éster covalente que implican el grupo carbonilo de la lactona y se ha concluido que esta unión es responsable de la toxicidad y genotoxicidad de OTA al unirse respectivamente a los ácidos nucleicos y las proteínas enzimáticas (49).

2.4.2 Estructura química

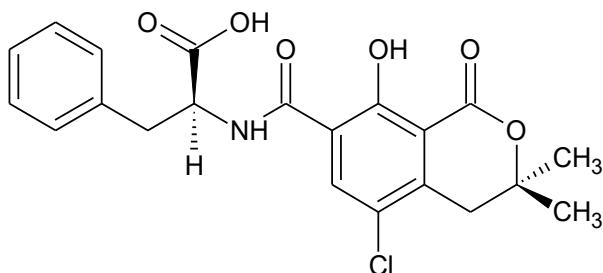


Figura 6. Estructura química de la Ocratoxina A

La Ocratoxina A tiene dos grupos que pueden o no pueden existir en forma ionizable en condiciones fisiológicas y que son: el grupo carboxilo de la fenilalanina que tiene un pKa de 4,4 y el grupo hidroxilo en el carbono 8 que tiene un pKa entre 7,05 y 7,1 (37).

La molécula tiene un carácter "ácido débil" y puede reaccionar por su grupo fenólico y grupos carboxílicos. Por su grupo fenol OTA podría adsorber a las superficies a través de enlaces de hidrógeno o a través de un complejo de transferencia de carga cargado negativamente. También puede adsorber compuestos hidrófobos como resultado de la interacción con dos orbitales electrónicos (9).

2.4.3 Biosíntesis de la Ocratoxina A

La ruta biosintética de OTA propuesta por Huff y Hamilton en 1979, basada en algunos artículos publicados previamente, postula tres distintas etapas en la biosíntesis de OTA. La primera corresponde a la síntesis de un residuo poliquétido de Ocratoxina α a partir de acetilCoA y malonato. En un primer paso, una enzima poliquétido sintasa inicia la síntesis del residuo poliquétido a través de la vía del acetato-malonato, dando lugar a meleina como intermediario. A continuación, la meleina es metilada y oxidada, dando lugar a Ocratoxina β , y una molécula de cloro es incorporada directamente para dar lugar a Ocratoxina α . En la segunda etapa se sintetiza el otro precursor, la fenilalanina, a partir de ácido shikímico, que se une a su vez a la Ocratoxina α . Por último, en la tercera etapa, una enzima sintetasa genera Ocratoxina C, y una esterasa conduce finalmente a la formación de OTA (49,9).

En la actualidad, se sabe que los genes involucrados en la biosíntesis de micotoxinas y otros metabolitos secundarios están frecuentemente organizados formando agrupaciones de genes o clusters. Este es el caso de los genes de biosíntesis de aflatoxinas, esterigmatocistina, tricotecenos y fumonisinas, en los que se incluyen genes responsables de la propia síntesis, de la regulación de la ruta, del transporte del producto sintetizado y de la autoprotección del hongo frente al propio metabolito. La ruta de biosíntesis de OTA en especies de *Aspergillus* es muy poco conocida, y solamente se ha identificado un gen codificador de una proteína poliquétido sintasa PKS, implicado con seguridad en la biosíntesis de OTA en la especie *A. ochraceus* (57). Posteriormente, han sido descritos dos genes más, pertenecientes a la superfamilia de citocromos P450, con elevada similitud a genes P450 fúngicos implicados en la ruta de biosíntesis de otras micotoxinas, y cuyos niveles de expresión se correlacionaban positivamente con la producción de OTA, en particular en uno de ellos (p450-B03) (37,78). Sin embargo, su organización en un cluster no estaba confirmada. El conocimiento de los genes implicados en la biosíntesis de OTA en las diferentes especies productoras es importante, debido a que uno de los objetivos principales de las técnicas de detección de especies mediante PCR es la diferenciación entre cepas toxígenas y no toxígenas para su diagnóstico en productos alimentarios. Una completa identificación de los clusters responsables de la producción de OTA en las distintas especies mostrará si todos los aislamientos de las especies descritas como productoras realmente poseen los genes requeridos (16,78).

2.4.4 Factores relacionados con la producción de Ocratoxina A

Tabla 7. Factores bióticos, abióticos e intrínsecos relacionados en la producción de OTA

Factores intrínsecos		Factores bióticos		Factores abióticos	
Enzimas relacionadas con la biosíntesis de OTA	Péptido sintasa no ribosómica	Crecimiento conjunto con otras especies	Bacterias	Actividad de agua (Aw)	0.9 mínimo 0.99 máximo
	Halogenasa		Mohos	Temperatura	15 - 20°C
	Fenilalanina tRNA sintetasa		Levaduras	pH	5.5 - 6.0
	Metilasa		Insectos	Tiempo	7-10 días
	Fragmento homologo a genes ABC transportadores			Sustrato	Contenido en azúcares, minerales proteínas o aminoácidos
		Composición de la atmósfera	Concentración de CO ₂ menor a 30%, [O ₂]		

2.5 Principales alimentos contaminados con Ocratoxina A

Como se muestra en la figura 7 los principales contribuyentes al consumo de OTA son los cereales y sus productos derivados, llegando a constituir hasta un 70% de la OTA consumida en la dieta. En menor medida se encuentran el café, la cerveza, el vino, los productos cárnicos, las legumbres y las especias. Se muestra la contribución media de diferentes alimentos a la ingesta diaria de OTA, calculado a partir de estudios realizados en tres países de la Unión Europea: Francia, Italia y Suecia. Dicha contribución se estima tomando en cuenta tanto las concentraciones medias de OTA en cada categoría alimentaria, como el nivel de consumo medio de cada tipo de alimento (37).

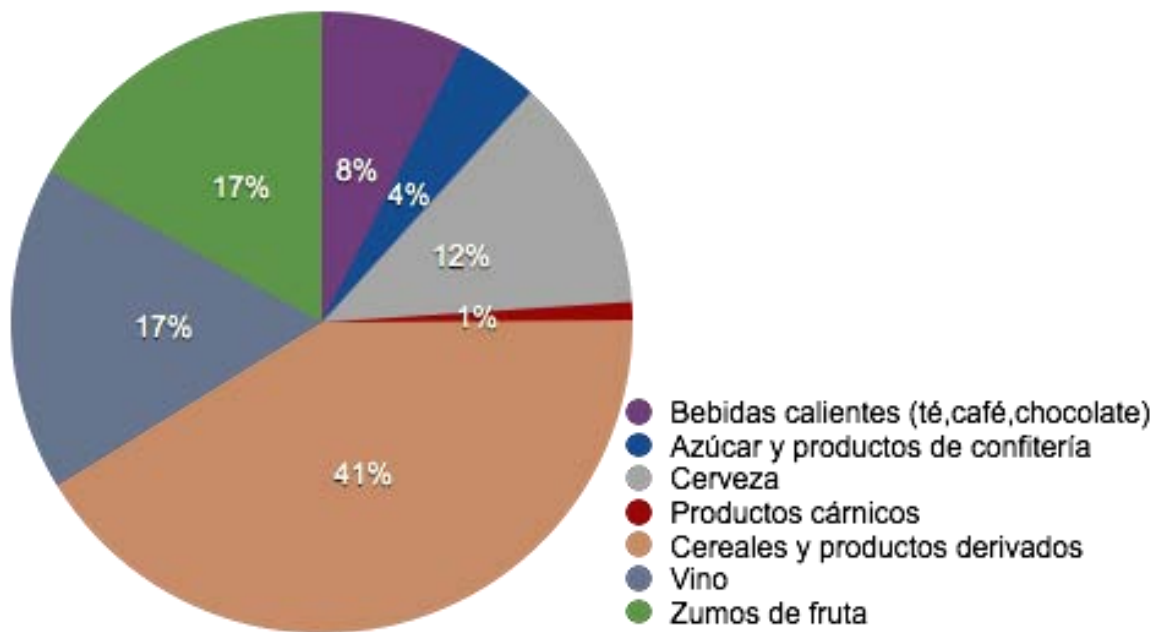


Figura 7. Alimentos contaminados con Ocratoxina A

2.6 Legislación

La información sobre el rango de niveles de contaminación encontrados en los géneros alimenticios es muy amplia y esta va a depender esencialmente del tipo de alimento, del área geográfica y de los datos publicados que están disponibles. Así, en cereales existen contaminaciones que van desde 10 a 2400 microgramos/Kg; en cafés tostados, de 0,2 a 1,7 microgramos/Kg; en granos de café crudo, de 0,4 a 23 microgramos/Kg; en vinos se reportan rangos de contaminación entre 1 a 7,63 microgramos/Kg, las mayores contaminaciones se encuentran en el vino tinto (65). Los análisis de OTA efectuados en riñón de cerdo y en fluidos biológicos de humanos dieron rangos de contaminación que fueron de 0,1 a 240 microgramos/Kg y de 0,05 a 14,4 microgramos/Kg, respectivamente. Los primeros problemas con OTA en humanos datan del año 1956 con la aparición de una grave nefropatía endémica en la región de los Balcanes (Bulgaria, Rumania, Yugoslavia) atribuida al consumo de carnes ahumadas que estaban contaminadas con OTA en concentraciones comprendidas entre 10 y 920 microgramos/Kg. El análisis de OTA en el suero de individuos afectados dio niveles comprendidos entre 1 a 40 microgramos/Kg. Estudios epidemiológicos revelan que aproximadamente la mitad de la población de Europa está expuesta a la OTA. Sin embargo la relación directa de las nefropatías con la exposición a la OTA no está aún suficientemente esclarecida ya que en Alemania, Francia, Italia, Dinamarca, Suecia, Checoslovaquia, Polonia y Canadá han sido encontrados niveles de OTA comprendidos entre 0,1 y 14,4 microgramos/L en sangre y leche materna de personas sanas. La presencia

de OTA en fluidos biológicos se considera más como una evaluación indirecta de la exposición a esta micotoxina. En algunos países de África, el 95% de los individuos que sufren de problemas de nefropatía son OTA positivos con concentraciones en sangre del orden de 90 microgramos/L y la prevalencia de ocratoxicosis se considera en un 55 a 80% superior a la de Europa. La incidencia de OTA se da frecuentemente en la dieta de los países de Europa, los estudios efectuados dan una media de ingestión de OTA de 6,42 ng/Kg p.c./día considerando un peso medio corporal de 60 Kg. Los cereales y el vino contribuyen, aproximadamente, en 3,57 y 1,43 ng OTA/Kg p.c./día (55 y 22%), respectivamente. Otros géneros alimenticios como el zumo de uva y el café contribuyen en 0,29 y 0,43 ng OTA/Kg p.c./día (4,51 y 6,7%), respectivamente y todo un conjunto de géneros alimenticios como los frutos secos, cerveza, té, leche, cacao, legumbres y otros contribuyen en menos de 0,14 ng OTA/Kg p.c./día (2,18%). El consumo de tejidos comestibles de cerdo contribuye en 0,21 ng OTA/Kg p.c./día (3,27%). En vista de esas contribuciones, el riesgo para los individuos que consumen grandes cantidades de cereales es mayor (30,81,37).

Tabla 8. Niveles de OTA admitidos en países de Europa y América Latina

Alimento	Unión Europea	Hungría	Rumanía	Argentina	Brasil	Grecia	Dinamarca
Cereales	5 µg/Kg	20 µg/Kg	5 µg/Kg	0.5 µg/Kg en niños y lactantes	50 µg/Kg máximo	-	-
Uvas pasas	10 µg/Kg			-	-	20 µg/Kg máximo	-
Café	-			-	-	20 µg/Kg máximo	-
Derivados cárnicos	-			-	-	-	-

2.7 Métodos de identificación molecular para hongos

Para contrarrestar las limitaciones que se presentan al utilizar los criterios morfológicos y bioquímicos, en el estudio de las especies de esta sección se han considerado también criterios basados en el análisis de ADN que pueden proporcionar una información más objetiva. Las técnicas moleculares empleadas en la sección Nigri se han dirigido principalmente a esclarecer tanto la taxonomía de las especies uniseriadas (*A. japonicus* y *A. aculeatus*), como a profundizar en el conocimiento de las especies biseriadas, especialmente las especies incluidas en el agregado *A. niger* (23).

2.7.1 Especies uniseriadas

2.7.1.1 *Aspergillus japonicus* / *Aspergillus aculeatus*

Las especies uniseriadas de esta sección son *A. japonicus* y *A. aculeatus*, aunque siguiendo ciertos criterios morfológicos se ha propuesto una sola especie (*A. japonicus*) y dos variedades (*A. japonicus* var. *japonicus* y *A. japonicus* var. *aculeatus*) (41,23). Es por ello que junto a estos criterios se han utilizado diversas técnicas moleculares para lograr clarificar su situación taxonómica. En otros estudios se analizaron los patrones de RFLP del ADN ribosomal (ADNr) obtenidos mediante digestión del ADN total con la enzima de restricción SmaI y se observó que *A. aculeatus* y *A. japonicus* aparecieron idénticos (83,23). Otros autores diferenciaron *A. japonicus* y *A. aculeatus* tras el análisis de los patrones de RFLP del ADNr obtenidos con las enzimas EcoRI y con PstI-SalI (79,23).

2.7.2 Especies biseriadas

2.7.2.1 *Aspergillus carbonarius*

Las características morfológicas de *A. carbonarius* hacen que sea una especie dentro de la sección Nigri claramente diferenciada del resto. De igual modo, el análisis de RFLP del ADNr y del ADNmt y de RAPD permite también esta diferenciación (45,60). Al analizar la variabilidad intraespecífica de diversas cepas de *A. carbonarius* mediante RFLP del ADNr y ADNmt y mediante RAPD se observaron patrones muy similares entre las diferentes cepas, aunque con ligeras variaciones (60,83,23). Sólo una cepa (IN7) presentó patrones de restricción de ADNr y ADNmt y de RAPD diferentes al resto, al igual que diversos caracteres morfológicos y fenotípicos distintivos (23). Los autores propusieron que este aislamiento representaría una nueva subespecie de *A. carbonarius* denominada *A. carbonarius* var. *indicusae* (23). Los mapas físicos del ADNmt de la cepa IN7 mostraron diferencias en el tamaño de este ADNmt en comparación con otras cepas de *A. carbonarius*, aunque el contenido genético era casi idéntico (23). El análisis filogenético

de la región ITS-5,8S de las especies de esta sección revela que *A. carbonarius* se diferenciaba claramente del resto de especies ensayadas (45,37). *Aspergillus carbonarius* formaba un grupo separado dentro de las especies biseriadas. Resultados similares se observaron al analizar las regiones D1 y D2 de la unidad 28S del ADNr (57,27). Recientemente, se detectaron cepas inicialmente identificadas como *A. carbonarius*, aisladas en la Península Ibérica, que no producían OTA y presentaban conidios de un diámetro inferior al característico de esta especie (80,16,23). Éstas además se diferenciaron del resto de cepas de *A. carbonarius* mediante RAPD y secuenciación de la región ITS-5,8S del ADNr. Estas diferencias se han confirmado mediante AFLP y secuenciación del gen de la calmodulina, por lo que se ha realizado la propuesta de una nueva especie dentro de la sección Nigri, denominada *A. ibericusae* (23).

2.7.2.2 *Aspergillus niger*

Se han utilizado diversas técnicas moleculares con el fin de clarificar la taxonomía de los miembros de este agregado ya que morfológicamente las especies que lo componen son indistinguibles.

Se han observado dos patrones de RFLP del ADNr al realizar la digestión con SmaI en cepas del agregado *A. niger* (ADNr's tipos I y II) (45,83,3). Como el cultivo neotipo de *A. niger* (CBS 554.65) pertenecía al grupo I y el cultivo tipo de *A. tubingensis* (CBS 134.48) al grupo II, propusieron denominar a las cepas del grupo I como *A. niger* y a las del grupo II como *A. tubingensis* (45,83). Estos dos grupos eran morfológicamente idénticos. Posteriormente, se confirmaron estos resultados mediante el análisis de RFLP del ADN total con SmaI, EcoRI y PstI en cepas de colección (54,23). En este trabajo obtuvieron cuatro patrones de restricción del ADNr que se podían agrupar en dos grupos principales que coincidían con los propuestos anteriormente (45). Los patrones de restricción del ADNr obtenidos con SmaI coincidieron con trabajos anteriores y, mediante RFLP del ADNmt con diferentes enzimas de restricción, se agruparon 47 cepas de colección en cinco patrones distintos. Estos patrones se podían agrupar en dos grupos principales que correspondían con los obtenidos en trabajos previos (23). En otro trabajo posterior, se detectaron hasta 12 patrones de restricción del ADNmt al utilizar la combinación HaeIII-BglIII en cepas aisladas de suelo (23). Estos patrones se agrupaban también en dos grupos principales que correspondían con los propuestos por otros autores (45) con la excepción de un tercer patrón. Este tercer patrón de RFLP se observa solamente en 6 cepas aisladas de suelo de Brasil que no se distinguían morfológicamente de las cepas agrupadas como *A. niger* o *A. tubingensis* (23). Otros autores (29) propusieron que las cepas pertenecientes a este tercer patrón representarían una subespecie de *A. niger* o una nueva especie del agregado *A. niger*, provisionalmente denominada *A. brasiliensis*. Se demostró que era posible transferir mitocondrias entre cepas del agregado *A. niger* que presentaban los diferentes patrones de RFLP del ADNmt detectados por

otros autores anteriormente (60). Tal transferencia no fue posible entre cepas del agregado y cepas de *A. carbonarius* o *A. japonicus* (41). La división del agregado *A. niger* en los grupos *A. niger* y *A. tubingensis* fue confirmado de nuevo mediante la utilización de diferentes enzimas de restricción y la hibridación con diferentes sondas (83,23). En un estudio con 23 cepas de colección del agregado *A. niger*, se describió un nuevo patrón de RFLP del ADN_r obtenido con PstI-SalI (15). Este patrón estaba representado por las cepas tipo de variedades de *A. foetidus*. Como consecuencia de ello propusieron la división del agregado en tres taxones morfológicamente idénticos: *A. niger*, *A. tubingensis* y *A. foetidus* (23). Las cepas representando el nuevo grupo no habían sido estudiadas previamente, pero se clasificarían como *A. tubingensis* al digerir el ADN con SmaI siguiendo el método descrito en 1991 por otros autores (45,23). En un trabajo posterior, se propuso la división del agregado en 4 especies morfológicamente idénticas: *A. niger*, *A. tubingensis*, *A. foetidus* y *A. brasiliensis* (23). Esta división se propuso tras considerar los patrones de restricción obtenidos con KpnI-XhoI y PstI-SalI. No obstante, al realizar la digestión del ADN con PstI-SalI y la hibridación con el gen 28S del ADN_r, que anteriormente había permitido separar cepas de *A. foetidus* del resto de especies del agregado *A. niger* y *A. brasiliensis* compartían el mismo patrón de ADN_r (23).

El análisis de las regiones ITS-5,8S del ADN_r de las cepas de la sección Nigri incluidas en otro estudio permitió determinar que las diferencias entre las 4 especies anteriormente comentadas (*A. niger*, *A. tubingensis*, *A. foetidus* y *A. brasiliensis*) eran mínimas. Las secuencias de *A. niger* y *A. tubingensis* se diferenciaban en sólo 3 nucleótidos y las de *A. foetidus* y *A. tubingensis* en 2 nucleótidos. Entre las secuencias de *A. niger* y *A. foetidus* habían 5 diferencias. Los árboles filogenéticos obtenidos del análisis de estas regiones del ADN realizados por diferentes autores muestran las cepas del agregado *A. niger* claramente diferenciadas del resto de cepas de la sección Nigri (23). En el agregado se agrupan conjuntamente los cuatro grupos propuestos: *A. niger*, *A. tubingensis*, *A. foetidus* y *A. brasiliensis*. No obstante, las cepas representativas de *Aspergillus tubingensis* y *Aspergillus foetidus* se agrupan juntas en un subgrupo y la secuencia de *A. brasiliensis* la más distinta dentro del agregado (23). Al realizar la secuenciación de las regiones D1 y D2 de la unidad 28S del ADN_r las especies pertenecientes al agregado se diferencian del resto de especies de la sección aunque dentro del agregado no se observa una variabilidad remarcable (23). Posteriormente se dividió el agregado *A. niger* en dos grupos representados por *A. niger* y *A. awamori* tras secuenciar un fragmento del gen mitocondrial del citocromo B, añadiendo así más confusión a la taxonomía de este grupo (23). En 1999 se secuenció la región ITS-5,8S de las cepas tipo de *A. niger* (CBS 554.65) y de *A. tubingensis* (CBS 134.48). Al comparar estas secuencias se localizó una diana para la enzima RsaI en la secuencia de *A. niger*. Tras realizar la digestión, se obtenían dos patrones de ADN_r dentro del agregado *A. niger*: el patrón denominado N (2 fragmentos, 519 y 76 pares de bases (pb)) y el

patrón T (un fragmento de 595 pb). Ambos grupos correspondían con los dos propuestos por otros autores (4,45,23,83). En ese estudio se ensayó una cepa de *A. brasiliensis* utilizando esta técnica y se clasificó como tipo N. La cepa tipo de *A. foetidus* var. *acidus* (CBS 564.65), incluida en el grupo *A. foetidus*, se clasificó como tipo T (23). La simplicidad de esta técnica permite fácilmente la detección de los patrones N y T, presentando menos variabilidad que otros patrones de RFLP descritos anteriormente por otros autores. En un estudio posterior, se puso de manifiesto que todas las cepas productoras de OTA estudiadas tienen un patrón de RFLP tipo N. Este hecho ha sido corroborado en estudios posteriores en los que se han estudiado los patrones de RFLP de alrededor de 200 cepas del agregado *A. niger* de diferentes orígenes, incluyendo también cepas de colecciones internacionales. No obstante, recientemente se ha descrito la producción de OTA por 3 cepas aisladas de uva que han presentado un patrón T (23,46).

2.8 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La PCR es un método rápido de amplificación *in vitro* de secuencias de ADN específicas dentro de una muestra. Habitualmente la reacción se diseña para permitir la amplificación selectiva de una o varias secuencias diana de ADN presente en una mezcla compleja de secuencias (por ejemplo ADN genómico total). Para que la amplificación sea posible es absolutamente necesario disponer de un mínimo de información sobre la secuencia a amplificar. Esta información permite la construcción de dos oligonucleótidos (oligos), habitualmente de 15 a 30 nucleótidos de longitud, complementarios de los extremos 3' de la secuencia diana, que actuarán como cebadores (iniciadores, en inglés primers) en la reacción.

Cuando se mezclan con ADN genómico desnaturalizado, los cebadores se unen específicamente a las secuencias complementarias de la región genómica que se quiere amplificar, quedando sus extremos 3' OH enfrentados. Los oligos están diseñados para que puedan iniciar la reacción de síntesis de ADN en presencia de una ADN polimerasa termoestable adecuada y de los precursores de ADN (los cuatro desoxinucleótidos trifosfato, dATP, dCTP, dGTP y dTTP). Cada oligo servirá para iniciar la síntesis de una hebra de ADN complementaria a una de las hebras del segmento de la diana, y las dos hebras de nueva síntesis serán complementarias entre sí.

La PCR es una reacción en cadena porque las hebras de ADN de nueva síntesis sirven a su vez de molde para reacciones de síntesis en ciclos posteriores. Tras unos 20 ciclos, la PCR habrá generado aproximadamente un millón de copias de la secuencia diana específica.

2.8.1 Fundamento

El proceso que tiene lugar durante la PCR se puede resumir de la siguiente forma: partiendo de un ADN molde, una enzima polimerasa incorpora nucleótidos complementarios a partir de la zona de doble cadena originada por la unión de los primers al ADN. El proceso se lleva a cabo en tres fases: desnaturalización, hibridación y elongación (figura 8).

En primer lugar es necesario que el ADN se desnaturalice, es decir, que las dos cadenas de ADN se separen. Esta primera fase se conoce como desnaturalización y se lleva a cabo elevando la temperatura a alrededor de 94°C.

El siguiente paso consiste en un descenso de la temperatura para permitir que los primers se unan por complementariedad al ADN molde. Esta segunda fase se conoce como hibridación. Temperaturas habituales en esta fase oscilan entre 35° y 60°C. Por último, en la fase de elongación o extensión, la enzima polimerasa incorpora nucleótidos complementarios a partir del extremo 3' libre de la región en que han hibridado los primers. La temperatura a la que se lleva a cabo esta fase depende de la enzima polimerasa empleada; si se utiliza Taq polimerasa la temperatura de elongación suele ser de 72°C.

Los elementos que conforman una PCR son los siguientes:

- ADN muestra
 - Primers (oligonucleótidos)
 - ADN Polimerasa
 - Desoxinucleótidos trifosfatos (dNTP's)
 - Solución tampón de reacción (pH, cationes divalentes y monovalentes)

Para calcular la temperatura de fusión o hibridación se utiliza la siguiente formula

$$T_m = 2 (A + T) + 4 (G + C)$$

Si se tiene en cuenta el hecho de que hacen falta algunos ciclos para que la mayor parte de los fragmentos estén limitados por los primers, podemos considerar que por cada ciclo que se completa se duplica la cantidad de fragmento a amplificar. Es decir, que al final del proceso se obtiene aproximadamente una cantidad de fragmento igual al producto de la cantidad inicial de ADN molde por 2^n , siendo n el número de ciclos. Como dato para apreciar la cantidad de copias que se generan, en el ciclo 20 se ha multiplicado por más de un millón la cantidad inicial de ADN molde.

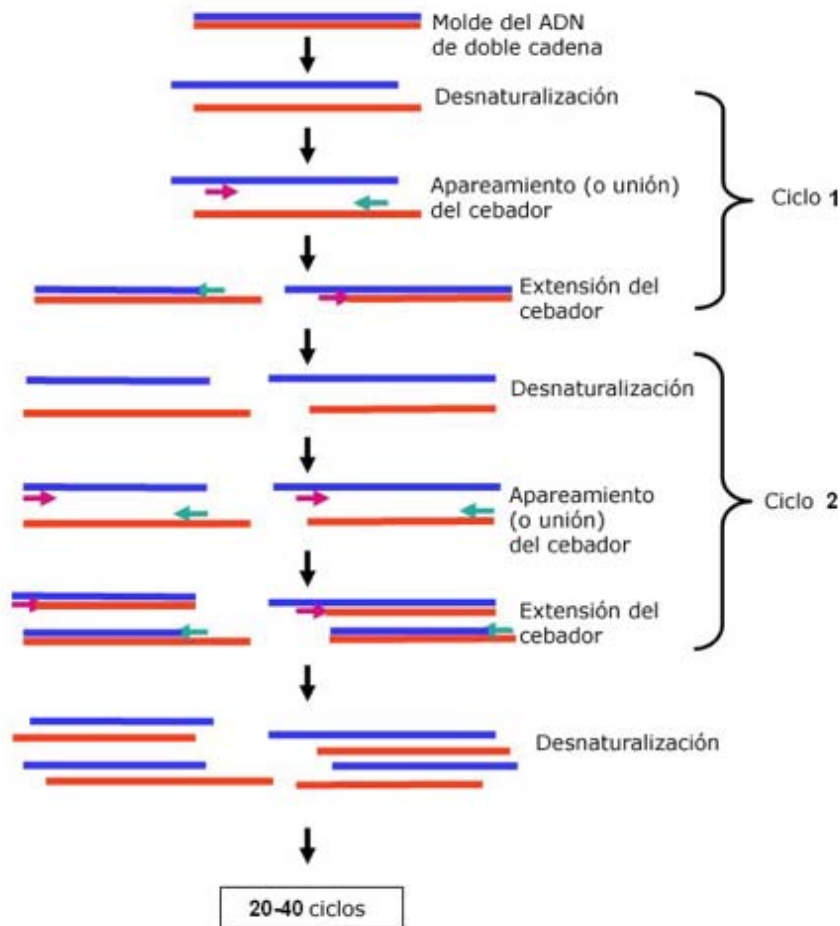


Figura 8. Etapas de la PCR

2.8.2 Ventajas de la PCR

Rápida y sencilla. La PCR permite clonar ADN en pocas horas, utilizando equipos relativamente poco sofisticados. Una reacción de PCR típica consiste en 30 ciclos de desnaturalización, hibridación y extensión. Cada ciclo dura típicamente de 3 a 5 minutos y se utiliza un termociclador que lleva un microprocesador para programar los cambios de temperaturas y el número de ciclos deseado. Esto supera ampliamente el tiempo requerido para la clonación en células, que suele ser de semanas, o incluso meses. Por supuesto, el diseño y síntesis de los oligonucleótidos cebadores también lleva tiempo, pero este proceso ha sido simplificado gracias a la aparición de programas informáticos para el diseño de los cebadores, y a la proliferación de casas comerciales especializadas en la síntesis de oligonucleótidos por encargo. Una vez que se pone a punto, la reacción puede ser repetida de forma sencilla.

Sensibilidad. La PCR puede amplificar secuencias a partir de cantidades ínfimas de ADN diana, incluso a partir de ADN contenido en una sola célula. Esta elevada sensibilidad ha permitido el desarrollo de nuevos métodos para

el estudio de la patogénesis molecular y la aparición de numerosas aplicaciones (ciencia forense, trazabilidad alimentaria, diagnóstico, estudios de paleontología molecular, etc) donde las muestras pueden contener muy pocas células. Sin embargo, el hecho de que el método tenga una sensibilidad tan elevada significa también que se deben extremar las precauciones para evitar la contaminación de la muestra con ADN extraño.

Robustez. La PCR permite la amplificación de secuencias específicas de material que contiene ADN muy degradado, o incluido en un medio que hace problemática su purificación convencional. Esto hace que el método resulte muy adecuado para estudios de antropología, paleontología molecular y autenticación de especies en la industria alimentaria; por ejemplo para el análisis de ADN recuperado de alimentos procesados a altas temperaturas y para intentar identificar ADN de muestras fósiles que contienen poquísimas células de criaturas extintas hace ya mucho tiempo. El método se ha empleado con éxito también para la amplificación de ADN de muestras de tejidos fijadas con formol, lo cual ha tenido importantes aplicaciones en patología molecular.

2.8.3 Desventajas de la PCR

Necesidad de disponer de información sobre la secuencia del ADN diana. Para poder construir oligonucleótidos específicos que actúen como cebadores para la amplificación selectiva de una secuencia particular de ADN se necesita disponer de alguna información previa sobre la propia secuencia a amplificar. Esto implica, por regla general, que la región de interés ya haya sido parcialmente caracterizada, a menudo mediante la aplicación de métodos de clonación basados en sistemas celulares. Sin embargo, y para casos concretos, se han desarrollado varias técnicas que reducen o incluso hacen desaparecer esta necesidad de disponer de información previa sobre la secuencia del ADN diana.

Tamaño corto de los productos de la PCR. Una desventaja clara de la PCR como método de clonación de ADN ha sido el tamaño de las secuencias de ADN que permite clonar. A diferencia de la clonación de ADN en células, donde pueden clonarse secuencias de hasta 2 Mb, la información de que se dispone sobre la mayor parte de secuencias clonadas por PCR sitúa el tamaño de los fragmentos clonados entre 0 y 5 Kb, tendiendo hacia el extremo inferior. Los fragmentos pequeños se amplifican muy fácilmente, pero conforme aumenta su tamaño se hace más difícil obtener una amplificación eficiente. En la actualidad sin embargo ya es posible amplificar secuencias por PCR de tamaños entre 20 y 40 Kb.

Infidelidad en la replicación del ADN. La clonación del ADN en células pasa por la replicación del ADN *in vitro*, proceso asociado a una gran fidelidad de copiado debido a la existencia, en la célula, de mecanismos de lectura y corrección de errores. Sin embargo, cuando el ADN se replica *in vitro* la tasa de errores cometidos durante el copiado se dispara. Ya se ha comentado anteriormente que la Taq polimerasa utilizada en la reacción no tiene actividad exonucleásica.

Peligro de contaminación. La facilidad con que se amplifica el ADN exige evitar el peligro de contaminación inherente al poder multiplicador de la reacción. En un tubo en el que se ha realizado una reacción de PCR hay tal cantidad de ADN, que al salir caliente del termociclador y abrir este, el vapor alcanza el ambiente del laboratorio. "Si se pasa un papel de filtro por los pomos de las puertas, o la superficie del termociclador, se puede rescatar suficiente ADN como para obtener una señal".

2.8.4 Aplicaciones de la PCR en trazabilidad alimentaria

Después de su obtención y antes de su comercialización, muchos tipos de alimentos se someten a operaciones de evisceración, fileteado, picado, congelación, cocción, etc. Después de esta transformación resulta muy difícil identificar la especie de procedencia.

La gran diferencia de precios existente entre especies afines, lleva en muchas ocasiones a defraudar al consumidor sustituyendo aquellas especies de mayor valor comercial por las menos valoradas.

Uno de los problemas con los que se encuentra la industria alimentaria es en la identificación de las especies para su posterior procesamiento. La diferenciación de las especies es difícil ya que ni el tamaño, ni el color de la carne, ni el sabor, constituyen parámetros fiables de identificación. De este modo, es bastante frecuente la sustitución de filetes y /o cereales por otros de menor costo (17).

La reacción en cadena de la polimerasa constituye una técnica alternativa a los métodos tradicionales de identificación de especies, basados en el análisis de proteínas mediante técnicas electroforéticas o cromatográficas. La técnica de la PCR permite analizar muestras conservadas en condiciones deficientes o sometidas a tratamientos térmicos, incluso de esterilización, utilizando una mínima cantidad de muestra.

El punto crítico del ensayo de PCR es la selección de un marcador genético apropiado y el diseño de cebadores que permitan su amplificación. En la elección de marcadores genéticos es importante considerar varias premisas: i) Las regiones de ADN seleccionadas deben acumular mutaciones a una velocidad adecuada para que especies estrechamente relacionadas tengan secuencias de nucleótidos diferentes, sin que exista polimorfismo intraespecífico.

ii) La longitud del segmento amplificado ha de ser suficiente para detectar diferencias interespecíficas, permitiendo a su vez la secuenciación en un gel estándar.

iii) Es preferible utilizar regiones del ADN que codifiquen proteínas, ya que los errores en la amplificación o en la secuenciación pueden detectarse fácilmente.

iv) Es aconsejable trabajar con genes cuya secuencia se haya determinado previamente en diversos organismos, preferiblemente en otras especies. El genoma mitocondrial es el más utilizado en la diferenciación genética de especies. Presenta una serie de ventajas respecto el ADN nuclear que lo hacen más adecuado para este tipo de análisis. Se trata de un genoma haploide, no recombinante, no posee intrones, es mucho más pequeño que el ADN nuclear, cada célula presenta múltiples copias, y presenta una tasa de evolución mayor.

En el diseño de cebadores, se pueden utilizar las secuencias génicas de diversas especies conocidas para buscar regiones conservadas sobre las que diseñar cebadores universales, que permitan la amplificación de un mismo gen en una gran variedad de especies (17).

TÍTULO
Identificación morfológica y molecular de *Aspergillus* sección Nigri potencialmente ocratoxígenos en uva pasa (*Vitis vinifera*)

OBJETIVO GENERAL
Determinar la presencia de *Aspergillus* productores de Ocratoxina A mediante pruebas taxonómicas y técnicas de Biología Molecular para evaluar la inocuidad de la uva pasa (*Vitis vinifera*).

<p>Objetivo 1 Detectar la presencia de <i>Aspergillus</i> a partir de pruebas de microbiota en uva pasa (<i>Vitis vinifera</i>) para determinar la frecuencia de la sección Nigri en muestras comerciales.</p>	<p>Objetivo 2 Evaluar la capacidad de producción de Ocratoxina A de todos los aislamientos del género <i>Aspergillus</i> sección Nigri mediante técnicas de inmunofluorescencia para seleccionar a las cepas toxígenas.</p>	<p>Objetivo 3 Analizar las características morfológicas de <i>Aspergillus</i> sección Nigri mediante el uso de claves para la identificación taxonómica.</p>	<p>Objetivo 4 Realizar ensayos de PCR con cepas de <i>Aspergillus</i> sección Nigri micotoxígenas obtenidas en la microbiota para el desarrollo de una estrategia de identificación rápida, con alta sensibilidad y especificidad.</p>
<p>Desinfección de muestras con hipoclorito de sodio 0.1% por 30 seg.</p>	<p>Incubación de los aislamientos en matraces con medio YES+ (7 días, 28°C, agitación 100 rpm).</p>	<p>Incubación de los aislamientos monospóricos productores de Ocratoxina A en medios CYA37 (7 días, 37°C), CYA, MEA, CZ y MSA (7 días, 25°C)</p>	<p>Búsqueda bibliográfica para seleccionar primers específicos de las cepas toxígenas identificadas a partir de pruebas taxonómicas.</p>
<p>Siembra de pasas en PDA con estreptomycin (50 mg/L).</p>	<p>Cuantificación de Ocratoxina A por fluorimetría COUMATEST™</p>	<p>Observación y medición de estructuras con microscopio de disección y compuesto. Identificación de hongos por claves de Klich (2002)</p>	<p>Incubación en medio Wiskerman (4 días, 25°C).</p>
<p>Incubación 7 días a 25°C.</p>			<p>Extracción de ADN con kit de Promega (Wizard® Magnetic DNA Purification System for Food)</p>
<p>Reporte de la frecuencia de</p>			

3.2 Objetivos

Objetivo General. Determinar la presencia de *Aspergillus* productores de Ocratoxina A mediante pruebas taxonómicas y técnicas de Biología Molecular para evaluar la inocuidad de la uva pasa (*Vitis vinifera*).

Objetivo Particular 1. Detectar la presencia de *Aspergillus* a partir de pruebas de micobiota en uva pasa (*Vitis vinifera*) para determinar la frecuencia de la sección Nigri en muestras comerciales.

Objetivo Particular 2. Evaluar la capacidad de producción de Ocratoxina A de todos los aislamientos del género *Aspergillus* sección Nigri mediante técnicas de inmunoafinidad para seleccionar a las cepas toxígenas.

Objetivo Particular 3. Analizar las características morfológicas de *Aspergillus* sección Nigri mediante el uso de claves para la identificación taxonómica.

Objetivo Particular 4. Realizar ensayos de PCR con cepas de *Aspergillus* sección Nigri micotoxígenas obtenidas en la micobiota para el desarrollo de una estrategia de identificación rápida, con alta sensibilidad y especificidad.

3.3 Materiales y métodos

3.3.1 Material biológico

Determinación de la frecuencia de especies de *Aspergillus* sección Nigri de diez muestras comerciales

Se seleccionaron al azar, paquetes de uva pasa correspondientes a dos lotes diferentes de diez muestras comerciales obtenidas de supermercados ubicados en Cuautitlán Izcalli, Estado de México. Después se seleccionaron al azar 16 pasas de cada muestra y se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 0.1% durante 30 segundos, se enjuagaron con agua destilada estéril durante 10 segundos. Las pasas se incubaron por 7 días a 25°C en placas de Papa Dextrosa Agar (PDA) con estreptomina (50 mg/L). Al finalizar el tiempo de incubación las colonias se aislaron las colonias de aspecto oscuro o negro.

La frecuencia de *Aspergillus* sección Nigri se expresó en porcentaje con la siguiente relación:

$$\% \text{ Frecuencia} = (\# \text{ Pasas infectadas con } \textit{Aspergillus} \text{ sección Nigri} / \# \text{ Total de pasas}) \times 100$$

Duplicados de dos lotes de uva pasa de diez muestras comerciales

3.3.2 Obtención de cultivos monospóricos de los aislamientos

Una muestra de la colonia desarrollada en el sustrato (uva pasa) fue tomada y transferida a una placa de PDA para incubar durante 5 días a 25°C.

En un tubo Eppendorf de 2 ml se agregaron 500 µl de Tween 80 al 0.1% v/v y una muestra de esporas de la colonia previamente incubada, se agitó vigorosamente en vortex para separar las esporas y se tomaron 5 µl de la solución anterior para diluir nuevamente en 500 µl de Tween 80 al 0.1% v/v.

En otra placa con PDA se agregaron 5 µl de la solución diluida, se cubrió todo el medio utilizando un asa bacteriológica y se incubó durante 2 días a 25°C.

Al terminar el tiempo de incubación, se tomó cualquier colonia desarrollada en el medio y se sembró en una placa con PDA nueva.

3.3.3 Evaluación de la producción de Ocratoxina A de los aislamientos

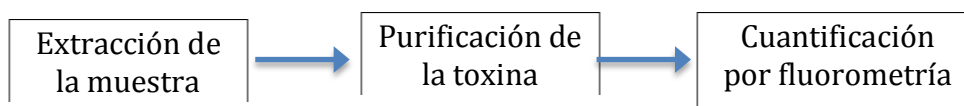
Todos los aislados fueron incubados en Agar Extracto de Malta (MEA) a pH = 4.7 y Aw = 0.95 a 25°C durante 5 días para la producción de Ocratoxina A. Al finalizar el tiempo de incubación se determinó la cantidad de toxina por fluorometría.

Fundamento de la Fluorometría

La fluorescencia es un proceso de emisión en el cual las moléculas son excitadas por la absorción de radiación electromagnética. Las especies excitadas se relajan al estado fundamental, liberando su exceso de energía en forma de fotones. una de las características más atractivas de los métodos de fluorescencia es su sensibilidad inherente, la cual es, con frecuencia, de uno a tres ordenes de magnitud mejor que las de la espectroscopía de absorción.

La fluorescencia más intensa y la más útil es la que presentan los compuestos que contienen grupos funcionales aromáticos (como es el caso de la Ocratoxina A) aunque también los compuestos que contienen estructuras alifáticas y alicíclicas de carbonilo o estructuras con dobles enlaces muy conjugados pueden presentar fluorescencia.

OCHRATEST FLUOROMETRIA PARA GROSELLAS, HIGOS Y PASAS



(Ver procedimiento completo en Anexo)

3.3.4 Identificación morfológica de especies de *Aspergillus* sección Nigri ocratoxígenas

Preparación de medios

Se prepararon medios MEA (extracto de malta 20 g, peptona 1 g, glucosa 20 g, agar 20 g), CZ (K_2HPO_4 1 g, concentrado Czapek 10 ml, sacarosa 30 g, agar 17.5 g), CYA25, CYA37 (K_2HPO_4 1 g, concentrado Czapek 10 ml, extracto de levadura 5 g, sacarosa 30 g, agar 15 g) y CY20S (K_2HPO_4 1 g, concentrado Czapek 10 ml, extracto de levadura 5 g, sacarosa 200 g, agar 15 g) para agrupar a las cepas en función de sus características macroscópicas. Todos los medios fueron preparados en un litro de agua destilada y esterilizados en un autoclave marca FAMSA a 121°C y 1.5 Kg/cm² durante 15 minutos.

Desarrollo de colonias

Todas las cajas de Petri con los medios fueron inoculadas en tres puntos equidistantes con 2 µl de una suspensión del cultivo monospórico en Tween 20 al 0.1%, se incubaron por 7 días a 25°C, excepto CYA, del que se obtuvieron repeticiones incubadas a 25°C (CYA25) y otras repeticiones se incubaron a 37°C (CYA37). Posteriormente se identificaron por su morfología utilizando claves taxonómicas (48).

Mediciones macro y micro morfológicas

Se utilizó un microscopio estereoscópico (Olympus SZ-60) para observar los detalles de textura y macromorfología de las colonias. Los diámetros de las colonias se midieron con Vernier. Las formas, diámetros, y longitudes de 30 estructuras microscópicas de cada especie se hicieron en microscopio compuesto con reglilla (Olympus BH2).

3.3.5 Pruebas de Ehrlich

El reactivo de Ehrlich consiste de 2 gramos de 4-dimetilaminobenzaldehído disueltos en 85 ml de etanol al 96% y 15 ml de HCl 10 N. Para llevar a cabo la prueba, se toman 4 mm de espesor de medio del centro de la colonia en CYA (incubado por 5-9 días a 25°C) y se depositan sobre una pieza de papel Whatman No 1 de un centímetro de diámetro con el micelio en contacto con el papel. Si después de 2-6 minutos aparece un anillo violeta significa que el cultivo contiene ácido ciclopiazónico o algún alcaloide relacionado. Si la reacción se da después de 7-10 minutos la reacción es débil (escaso contenido de ácido ciclopiazónico o algún otro derivado del indol). Después de 10 minutos el anillo violeta desaparecerá. Algunos hongos producen alcaloides que reaccionarán con el reactivo de Ehrlich para dar anillos color rosa, rojo o amarillo y todo depende del derivado del indol que esté presente (67).

3.3.6 Selección de primers específicos para la identificación molecular de especies ocratoxígenas

Se realizó una búsqueda bibliográfica en la literatura reciente sobre los genes directamente involucrados en la ruta biosintética de Ocratoxina A (OTA) en especies del género *Aspergillus* sección Nigri y su utilización en el diseño de primers específicos para la diferenciación entre cepas toxígenas y no toxígenas (69). En 2005 González Salgado diseñó diversos

pares de primers para la detección y diferenciación de especies de la sección Nigri entre ellas *A.niger* y *A. japonicus* (37). Las regiones ITS (espaciador transcrito interno) e IGS (espaciador intergénico) del ADN ribosomal han sido las más utilizadas para realizar estudios filogenéticos porque son altamente variables y con ellas es posible desarrollar ensayos específicos para la identificación de especies micotoxígenas (37).

Como se indica en la tabla 9 los pares de primers fueron diseñados basándose en la secuencia ITS, haciendo comparaciones con muchas especies del género *Aspergillus* y tomando en cuenta análisis taxonómicos y filogenéticos que habían sido reportados previamente (37).

Tabla 9. Pares de primers ITS1 frontal, NIG y JAP reversos			
Primer	Secuencia	T	Amplificado
ITS	5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG	6	-
NIG	5' CCGGAGAGAGGGGACG GC	6	420 pb
JAP	5' GAGAAGATTGGGGGTCGA 3'	6	520 pb

3.3.7 Extracción de ADN (Wizard Magnetic DNA Purification System for Food)

Incubación de los aislamientos en medio Wikerman

El medio Wikerman (40 g de glucosa, 5 g de peptona, 3 g de extracto de malta y 3 g de extracto de levadura en un litro de agua destilada) ha sido ampliamente utilizado para la obtención, en grandes cantidades, de micelio para la extracción de ADN genómico. El tiempo de incubación fue de 3 a 5 días, 25°C y agitación constante (100 rpm).

Condiciones de cultivo

Todos los aislamientos utilizados en este estudio, provinieron de diferentes marcas comerciales de pasas y fueron mantenidas en conservación en Papa Dextrosa Agar (PDA) para las diferentes pruebas a las que fueron sometidas.

Las cepas se incubaron en matraces Erlenmeyer de 100 ml con 25 ml de medio Wikerman a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ con agitación orbital (120 rpm) durante 4 días. El micelio fue recolectado por filtración utilizando papel Whatman No. 1.

Extracción de ADN

La extracción de ADN se llevó a cabo utilizando el Kit de Promega para purificación de ADN en alimentos (Wizard® Magnetic DNA Purification System for Food) siguiendo las instrucciones descritas en el protocolo. Las concentraciones de ADN fueron determinadas utilizando un espectrofotómetro NanoDrop® ND- 1000 (Nanodrop Technologies, Wilmington, USA).

El Kit de purificación de ADN para alimentos de Promega (Wizard® Magnetic DNA Purification System for Food) ha sido optimizado para la extracción y purificación de ADN de alimentos como soya y maíz. Los buffers de lisis, soluciones para precipitación y los volúmenes de elución deben ser optimizados para muestras diferentes, dependiendo de las características finales del alimento provocadas por tratamientos térmicos, mecánicos o aditivos (contenido de ADN, inhibidores, etc). Algunas muestras incluso, podrían requerir solamente un gramo para la extracción y purificación de ADN.

3.3.8 Ensayos de PCR

Condiciones de amplificación con PCR convencional

Todo el ADN genómico utilizado en este trabajo fue probado con primers específicos para diferenciar cada especie y así, complementar la información obtenida en la caracterización morfológica. Se utilizó el primer frontal ITS1 para todas las especies, el cual amplifica la región ITS en especies de *Aspergillus* sección Nigri. La reacción de PCR fue desarrollada en un termociclador marca Apollo modelo ATC 401 utilizando entre 10 y 20 ng de ADN genómico.

Como se observa en las figuras 9 y 10 los ensayos de PCR fueron llevados a cabo utilizando el primer ITS1 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') en todos los casos combinado con un primer específico para cada especie: NIG: (5'CCGGAGAGAGGGGACG GC 3') para *A. niger* y JAP: (5' GAGAAGATTGGGGGTCTGAGG 3') para *A. japonicus*.

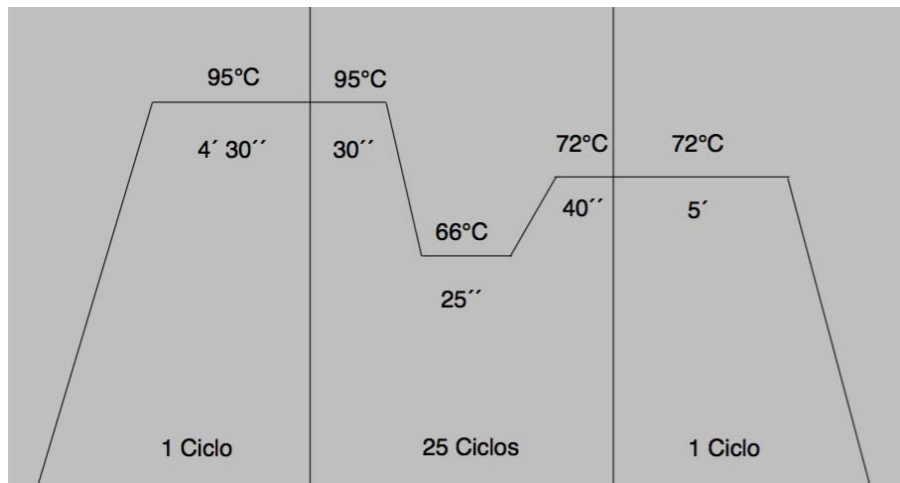


Figura 9. Programa de amplificación para *A. niger*: 1 ciclo de 4 minutos 30 segundos a 95°C, 25 ciclos de 30 segundos a 95°C, (desnaturalización), 25 segundos a 66°C (alineamiento), 40 segundos a 72°C (extensión) y finalmente 1 ciclo de 5 minutos a 72°C.

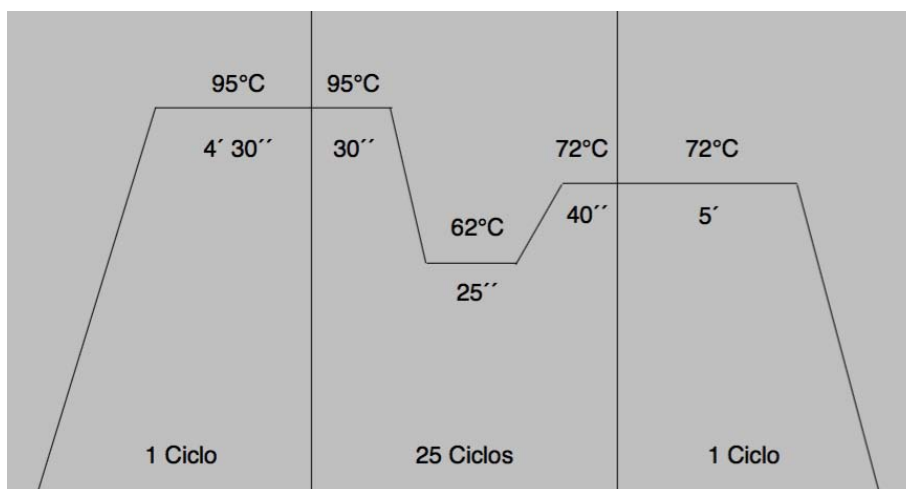


Figura 10. Programa de amplificación para *A. japonicus*: 1 ciclo de 4 minutos 30 segundos a 95°C, 25 ciclos de 30 segundos a 95°C (desnaturalización), 25 segundos a 62°C (alineamiento), 40 segundos a 72°C (extensión) y por último 1 ciclo de 5 minutos a 72°C.

Todas las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 25 μ l (ver tabla 10) conteniendo 1.5 μ l (10-20 ng) de ADN, 0.5 μ l de cada primer (25 μ M). PCR Master Mix, 2X: 0.05 U/ μ l de Taq ADN Polimerasa, 50 mM Tris-HCl (pH: 9.0), 50 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 200 μ M dATP, 200 μ M dGTP, 200 μ M dCTP, 200 μ M dTTP, suministrados por el fabricante (Promega, Madison, WI. USA). Los productos de PCR fueron separados en gel de agarosa al 0.7% con Bromuro de Etidio (BrEt) como marcador en buffer 1 X TAE (Tris-acetato 40 mM y EDTA 1.0 mM). Se utilizó marcador de peso molecular marca Promega (Madison. Wi, USA).

Tabla 10. Componentes para PCR	
Mastermix	12.5 μ l
Primer Frontal	0.5 μ l

Primer Revers	0.5 µl
ADN	1 µl
Agua libre nucleasas	10.5 µl

Procedimiento para concentrar los primers a utilizar en la PCR

Para calcular el volumen de agua necesario para obtener una solución 250 mM de primer se utiliza la siguiente fórmula:

$R1 = \text{concentración primer (en } \mu\text{M)} \div 1000$

$R1/250 = R2;$

$R2 \times 1E10^6 = \mu\text{l de agua a agregar}$

Pruebas de especificidad

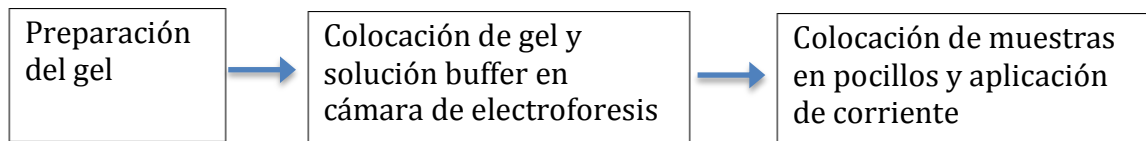
Para probar la especificidad del par de primers ITS1-JAP se utilizó una cepa de *Aspergillus japonicus* como control positivo y otra de *Aspergillus niger* como control negativo. El amplificado esperado fue de 520 pares de bases. Para *Aspergillus niger* se probó el par ITS1-NIG y se utilizaron dos cepas de *Aspergillus niger* como control positivo y una cepa de *Aspergillus japonicus* como control negativo. El amplificado esperado fue de 420 pares de bases.

3.3.9 Electroforesis

La electroforesis en gel es una técnica que se emplea para separar los ácidos nucleicos y las proteínas. La separación de las macromoléculas depende de dos variables: carga y masa. Cuando una muestra biológica, como por ejemplo el ADN, se mezcla en una solución tampón y se aplica a

un gel, esas dos variables actúan conjuntamente. La corriente eléctrica de un electrodo repele las moléculas, al tiempo que el otro electrodo las atrae. La fuerza de fricción del material de gel actúa como «tamiz molecular», separando las moléculas en función de su tamaño. Durante la electroforesis, las macromoléculas son empujadas a través de los poros, dependiendo su tasa de migración por el campo eléctrico de los siguientes factores:

- fuerza del campo
- tamaño y forma de las moléculas
- hidrofobicidad relativa de las muestras
- fuerza iónica y temperatura del tampón en que se desplazan las moléculas.



(Ver procedimiento completo en Anexo)

Los geles de agarosa permiten una electroforesis rápida, pero con una resolución limitada por cuanto las bandas que se forman en los geles tienen tendencia a ser difusas y a esparcirse. Ello obedece al tamaño de los poros y no puede controlarse. Los geles de agarosa se obtienen por suspensión de agarosa seca en polvo en un tampón acuoso, tras lo cual se hace hervir la mezcla hasta que la agarosa se funde y se convierte en una solución transparente. A continuación, se vierte esta solución en un molde para gel y se deja enfriar a temperatura ambiente hasta que se forma un gel rígido.

En la tabla 11 se describen los porcentajes de agarosa sugeridos para los fragmentos de ADN esperados.

Tabla 11. Concentración de agarosa recomendada para separar moléculas de ADN lineales	
% Agarosa	Gamas de tamaños ADN (pb)
0.75	10 000 - 15 000
1	500 - 10 000
1.25	300 - 5 000
1.5	200 - 4 000
2	100 - 2 500
2.5	50 - 1 000

Tampón de electroforesis

La movilidad electroforética del ADN se ve afectada por la composición y la fuerza iónica del tampón de electroforesis. En ausencia de iones, la conductividad eléctrica es mínima y el ADN migra lentamente o ni siquiera se desplaza. En un tampón de elevada fuerza iónica la conductividad eléctrica es muy elevada y se genera una importante cantidad de calor. En el peor de los casos, el gel se funde y el ADN se desnaturaliza.

Se dispone de varios tipos de tampones para la electroforesis de ADN nativo bicatenario. Contienen EDTA (pH 8,0) y tris-acetato (TAE), tris-borato (TBE) o tris- fosfato (TPE) a una concentración de aproximadamente 50 mM (pH 7,5 – 7,8). Los tampones de electroforesis suelen prepararse en forma de soluciones concentradas y se conservan a temperatura ambiente. El TAE se utilizaba inicialmente a una concentración de trabajo de 1x en el caso de la electroforesis en gel de agarosa. No obstante, una solución de

trabajo de 0,5x proporciona un poder más que suficiente y en la actualidad prácticamente todas las electroforesis en gel de agarosa se practican utilizando esta concentración (154). En la tabla 12 pueden se describen las cantidades de cada componente utilizado en una electroforesis para amplificadores de PCR

Tabla 12. Componentes de electroforesis	
Componente	Volúmen
Bromuro de Etidico	3 µl
Muestra	5 µl
Azul de Bromofenol	2 µl
Marcador de ADN (100 pb)	2 µl

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Frecuencia de *Aspergillus* sección Nigri en muestras comerciales de uva pasa

En la figura 11 se muestra la incidencia porcentual del género *Aspergillus* sección Nigri, sección Flavi y *Penicillium spp.* Se observa que la incidencia porcentual de *Aspergillus* sección Nigri tiene un promedio de 55%. En la muestra 4 no hay incidencia de la sección Nigri pero si de la sección Flavi y *Penicillium spp.* aunque no se puede asegurar que la presencia de éstas últimas sea un factor determinante para inhibir el desarrollo de colonias de la sección Nigri dado que en 3 muestras fueron encontradas juntas. Le sigue el género *Penicillium* con un promedio de 21% de incidencia y la

sección Flavi con 15%. Esto concuerda con lo reportado anteriormente sobre el género *Penicillium* y *Aspergillus* sección Nigri como los principales hongos responsables de la contaminación de uva y sus derivados con Ocratoxina A.

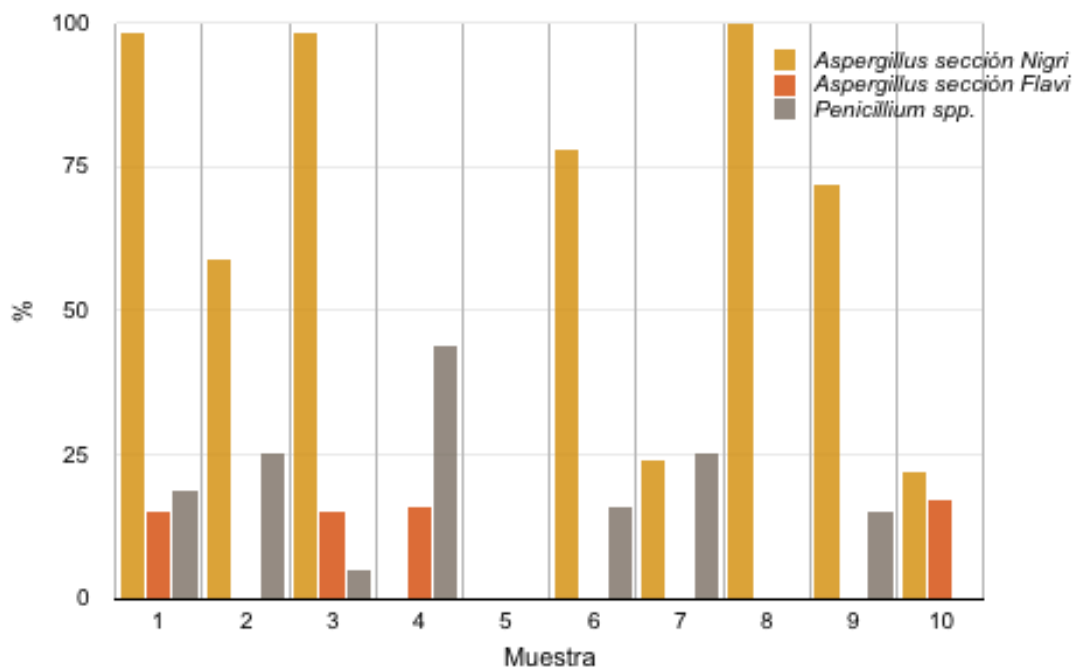


Figura 11. Incidencia de *Aspergillus* y *Penicillium* en 10 muestras comerciales de uva pasa

Se reportó la presencia del género *Aspergillus* en el 80% de las muestras analizadas y además la sección Nigri obtuvo la incidencia porcentual más alta con respecto a *Aspergillus flavus* y *Penicillium* spp, a excepción de la muestra 4. Sólo en 3 muestras la frecuencia porcentual fue cercana al 100% y en 6 muestras superior al 50% para *Aspergillus* sección Nigri. En la muestra 5 no se observó contaminación por hongos ni bacterias, lo cual indica que es un alimento seguro para su consumo donde se han aplicado eficazmente las Buenas Prácticas Agrícolas (BPA), un adecuado manejo post-cosecha y Buenas Prácticas de Fabricación (BPF).

En este trabajo se ha confirmado la presencia de dos de los principales géneros micotoxígenos (*Aspergillus* y *Penicillium* spp.) en la mayoría de las marcas comerciales y los resultados obtenidos muestran una alta

incidencia de *Aspergillus* sección Nigri como se observa en la figura 13. Esto concuerda con lo referido en la bibliografía existente (52,53,50,73), donde se cita que los integrantes de dicha sección son ubicuos y especialmente abundantes en climas mediterráneos, cálidos y secos y que poseen la capacidad de crecer en una gran variedad de sustratos como semillas, granos, forrajes, verduras y piensos, frutos deshidratados, entre otros. En estudios micológicos previos y en diversas formas comerciales de uva y en sustratos similares como el vino, se ha observado una gran incidencia de los géneros micotoxígenos *Aspergillus* y *Penicillium*, que han mostrado capacidad para biosintetizar Ocratoxina A (37,16).

Actualmente no se sabe con certeza si la variedad de uva utilizada para pasificación sea un factor importante para determinar la resistencia a la contaminación fúngica, sin embargo en trabajos recientes se ha documentado ampliamente la importancia de los factores bióticos y abióticos en la contaminación por *Aspergillus* sección Nigri en uvas y vino (24,25,26,27).

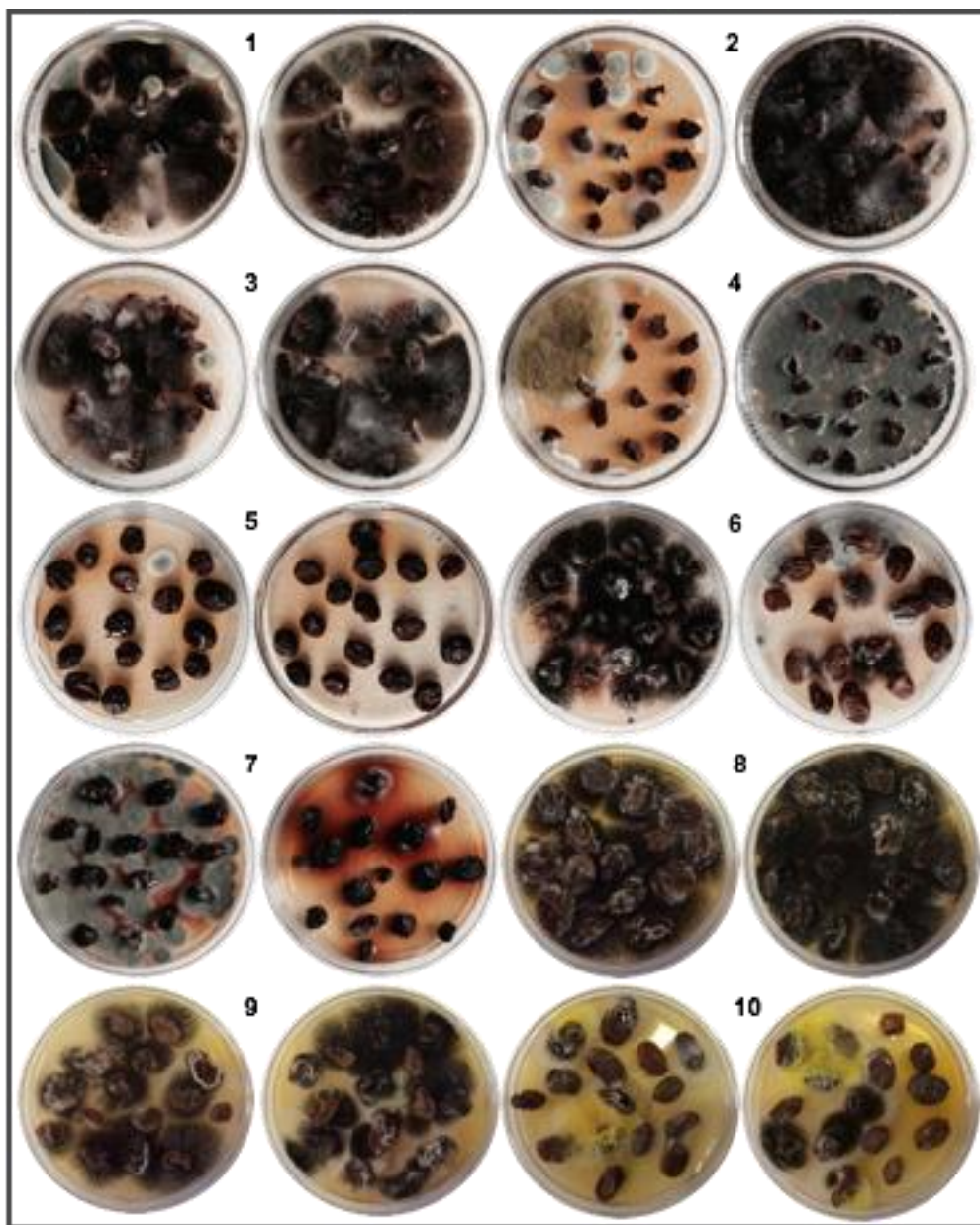


Figura 12. Presencia de *Aspergillus* y *Penicillium* spp. en 10 muestras comerciales de uva pasa en medio MEA.

4.2 Producción de Ocratoxina A

Tabla 13. Capacidad producción Ocratoxina A de cepas de la sección Nigri		
Nº de Cepas	Especie	Ocratoxina A (µg)
1	<i>A. niger</i>	0.5
2	<i>A. niger</i>	3.5
3	<i>A. niger</i>	2.5
4	<i>A. niger</i>	1.5
5	<i>A. niger</i>	1.5
6	<i>A. niger</i>	3.5
7	<i>A. niger</i>	3.5
8	<i>A. niger</i>	3.5
9	<i>A. niger</i>	3.5
10	<i>A. niger</i>	3.5
11	<i>A. niger</i>	2.5
12	<i>A. niger</i>	1.5
13	<i>A. japonicus</i>	5.5

La cuantificación de OTA se llevó a cabo por fluorometría y las colonias se desarrollaron en Agar Extracto de Malta (MEA) por ser un medio sintético similar a la uva en pH y aw (12). De la muestra 8 se aislaron todas las colonias desarrolladas por ser la única muestra que presentó una incidencia de 100% en *Aspergillus* sección Nigri sin detectar presencia de otras especies y se probó su capacidad para producir OTA con cultivos monospóricos. Como se indica en la tabla 13, de las 19 cepas pertenecientes a la sección Nigri, 18 mostraron capacidad para producir OTA en

14	A. <i>japoni</i>	4.
15	A. <i>japoni</i>	3.
16	A. <i>japoni</i>	5.
17	A. <i>japoni</i>	1.
18	A. <i>japoni</i>	0
19	A. <i>japoni</i>	5.

un rango de 0.9 a 5.7 ppb. Por lo tanto, la cantidad de toxina producida podría representar un riesgo en sustratos como uva pasa según las normas establecidas en Europa y América Latina (en la actualidad, se ha establecido una ingesta diaria tolerable de OTA de 10 ng/kg de peso corporal para adultos y 0.5 ng/kg para niños), al mismo tiempo se confirma su capacidad para producir OTA en medios sintéticos (37,10,13).

De las siete cepas de *Aspergillus japonicus* seis de ellas mostraron capacidad para producir OTA, incluso en concentraciones mayores que *Aspergillus niger* por lo tanto es posible considerarla como una especie ocratoxígena. Para algunas especies de la sección Nigri la expresión de los genes directamente involucrados en la síntesis de OTA depende del genotipo de cada individuo, por ello es imprescindible seleccionar primers o iniciadores específicos para identificar cepas potencialmente ocratoxígenas basándose en aquellos genes antes mencionados.

4.3 Identificación morfológica

4.3.1 Características microscópicas de *Aspergillus niger*

En la tabla 14 se presentan las medidas promedio de 30 estructuras de *Aspergillus niger* desarrolladas en MEA a 25°C. Dentro de las características más comunes de esta especie se encuentra el color de las colonias, que van del café oscuro al negro, es una especie biseriada con vesículas grandes y estipes largas en algunos casos. Los valores promedio de tamaño de vesícula y longitud de estipe concuerdan con lo reportado por diversos autores (48). Los conidios son medianos y la mayoría son rugosos, la métula cubre toda la vesícula y todas las estructuras son biseriadas.

Tabla 14. Características microscópicas de <i>Aspergillus niger</i>		
Vesícula	Diámetro	42 µm
	Forma	Globosa
	Seriación	Biseriado
Estipe	Longitud	1235 µm
	Ancho	15 µm
	Textura	Lisa
Conidio	Longitud	4 µm
	Forma	Globosa
	Textura	Finamente rugosa/Rugosa

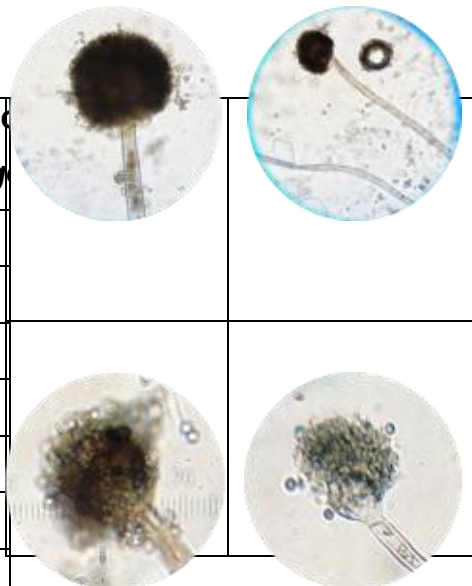


Figura 13. *Aspergillus niger* observado al microscopio 40X

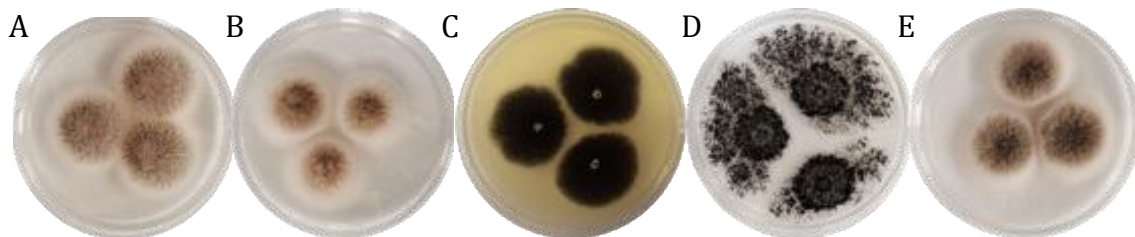
4.3.2 Características macroscópicas de *Aspergillus niger*

En la tabla 15 se muestran las características macroscópicas de las colonias de *Aspergillus niger* desarrolladas en CYA25, CYA37, MEA, CY20S

y CZ. Se encontraron diferencias respecto a lo reportado por otros autores (67) en los colores de las colonias y sus diámetros. Esta variación podría estar relacionada con las condiciones de incubación, la marca del medio de cultivo utilizado, el pH o la concentración de sales.

Tabla 15. Características macroscópicas de *Aspergillus niger* desarrolladas en diferentes medios de cultivo

	CYA25	MEA	CYA37	CY20S	CZ
Diámetro	73 mm	32-44 mm	52 mm	67 mm	46 mm
Colores	Café Oscuro/Verde	Negro	Café Claro/Café Oscuro	Café verdoso	Negro
Conidios	Verdosos	Negros	Café Oscuro	Verdoso	Negro
Micelio	Velutinoso plano, Radialmente sulcado abundante	Velutinoso plano, Forma anillo la periferia	Flocoso, Radialmente sulcado abundante	Flocoso estriado	Mediamente flocoso plano
Exudado	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Reverso	Beige	Crema	Café Oscuro	Amarillo Verdoso	Sin color
Pigmento soluble	Beige	Crema	Ausente	Caqui	Ausente
Esclerocorios	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente



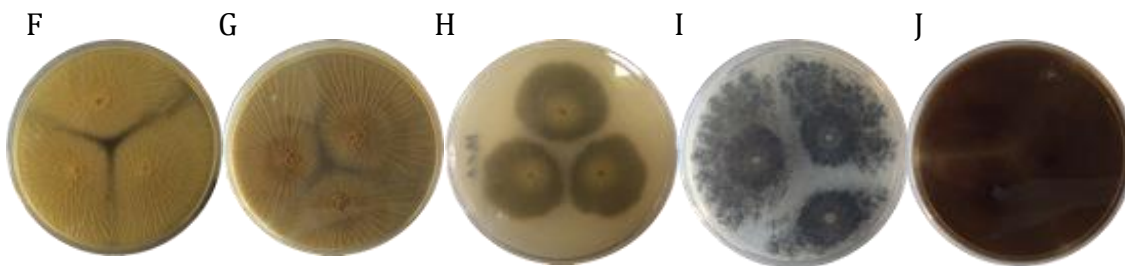


Figura 14. Morfología de *Aspergillus niger*. A-E: Anverso CY20S, CYA25, MEA, CZ, CYA37. F-J: Reverso CY20S, CYA25, MEA, CZ, CYA37.

En la figura 14 se presentan las imágenes de las colonias en anverso y reverso, se observa que ninguna colonia formó exudado ni esclerocio, los conidios presentaron un color verdoso a negro. En Czapek (CZ) no se observó color en el reverso, mientras que en MEA y CYA25 se observó pigmento soluble beige y crema respectivamente. Las diferencias más significativas se observaron en el micelio ya que en CYA25 y MEA fue velutinoso plano mientras que en CYA37, CY20S y CZ fue flocoso con algunas características que los diferenciaban.

4.3.3 Características microscópicas de *Aspergillus japonicus*

En la tabla 16 se presentan las medidas promedio de 30 estructuras de *Aspergillus japonicus* desarrolladas en MEA a 25°C. Al tratarse de una especie uniseriada de la sección Nigri, su identificación con microscopio resultó ser más sencilla, además de ser una de las especies de la sección Nigri más diferenciadas del resto porque presenta vesículas elipsoidales y globosas de diámetro pequeño comparadas con *Aspergillus niger*, conidios elípticos, piriformes y lisos principalmente. Las características microscópicas de esta especie son muy similares a las reportadas por

otros autores (48).

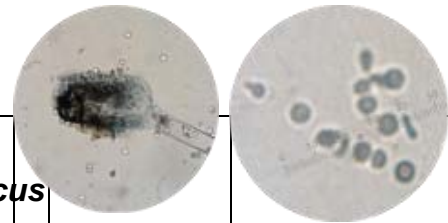


Tabla 16. Características microscópicas de <i>Aspergillus japonicus</i>		
Vesícula	Diámetro	28 µm
	Forma	Elipsoidal/Globosa
	Seriación	Uniseriado
Estipe	Longitud	523 µm
	Ancho	12 µm
	Textura	Lisa
Conidia	Longitud	4 µm
	Forma	Elipsoidal/ Piriforme/ Globosa
	Textura	Lisa/Picos espaciados

Figura 15. *Aspergillus japonicus* observado al microscopio 40X

4.3.4 Características macroscópicas de *Aspergillus japonicus*

En la tabla 17 se muestran las características macroscópicas de las colonias de *Aspergillus japonicus* desarrolladas en CYA25, CYA37, MEA, CY20S y CZ. Para esta especie no se encontraron diferencias significativas al contrastarlas con trabajos previos para *A.japonicus* (152). Una de las características macroscópicas más importantes de esta especie es el color

café que presenta en medio CYA25, MEA y CY20S y los surcos que se forman en dirección radial como se observa en la figura 16. Además de ser la única especie uniseriada de la sección Nigri.

Tabla 17. Características macroscópicas de *Aspergillus japonicus* desarrolladas en diferentes medios de cultivo

	CYA25	MEA	CYA37	CY20S	CZ
Diametro	70 mm	48 mm	15 mm	70 mm	64 mm
Colores	Café Oscuro	Café Oscuro Negro	Negro	Café Oscuro	Negro
Conidios	Café Oscuro a Negro	Café oscuro	Negro	Café Oscuro	Negro
Micelios	Velutinos Radialmente sulcado poco	Velutinos plano	Velutinos plano	Velutinos plano	Velutinos anillado
Exudados	Ambar, Escaso el centro	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Reverso	Café Oscuro	Crema	Café Claro/ Café Oscuro	Crema	Blanco
Pigmento soluble	Café Claro	Crema	Café Oscuro	Ausente	Ausente
Esclerocorios	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente

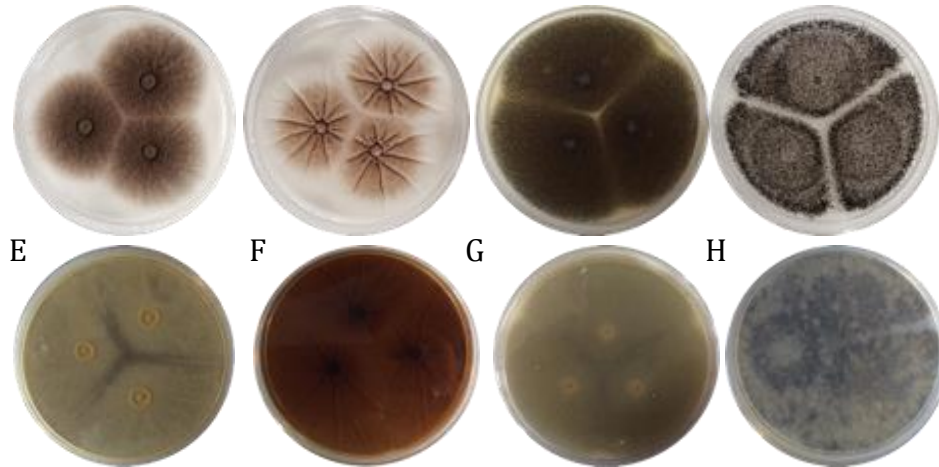


Figura 16. Morfología de *Aspergillus japonicus*. A-D: Anverso CY20S, CYA25, MEA, CZ.

E-H: Reverso CY20S, CYA25, MEA, CZ.

Como se observa en la tabla 18, solamente en CYA25 hubo escasa formación de exudado ámbar, en MEA y CY20S el reverso fue color crema, mientras que en CYA37 y CYA25 fue café oscuro. Los conidios van del café oscuro al negro y el micelio fue en todos los medios velutinoso y radialmente sulcado en CYA25. Los valores de diámetro de colonias se ajustan a los reportados en trabajos previos para esta especie (48,67) a excepción de CYA37.

4.4 Pruebas de Ehrlich

Tabla 18. Resultados de la reacción de Ehrlich en CYA después de 7 días incubación a 25 °C de las cepas de la sección Nigri								
Ce	Espec	C	Nota	Ce	Especie	C	Notas	
1	<i>A. nig</i>	+	B	11	<i>A. niger</i>	+	B	
2	<i>A. nig</i>	+	C	12	<i>A. niger</i>	+	C	
3	<i>A. nig</i>	+	C	13	<i>A.</i>	-	A	

					<i>japonic</i>		
4	<i>A. nig</i>	+	C	14	<i>A. japonic</i>	-	A
5	<i>A. nig</i>	+	B	15	<i>A. japonic</i>	-	A
6	<i>A. nig</i>	+	C	16	<i>A. japonic</i>	-	A
7	<i>A. nig</i>	+	C	17	<i>A. japonic</i>	-	A
8	<i>A. nig</i>	+	D	18	<i>A. japonic</i>	-	A
9	<i>A. nig</i>	+	C	19	<i>A. japonic</i>	-	A
10	<i>A. nig</i>	+	B				



A: sin color



C: amarillo



B: amarillo d



D: amarillo intenso

La muestra 18 se presenta con un resultado de la prueba de Ehrlich para las

colonias aisladas de la muestra 5. Esta prueba fue llevada a cabo con el fin de complementar la información obtenida en las pruebas taxonómicas y así asegurar con mayor certidumbre la identificación de cada especie.

En 2007, Samson y sus colaboradores probaron esta técnica para diferenciar especies pertenecientes a la sección Nigri y la reacción arrojó resultados satisfactorios pues se obtuvieron diversos compuestos coloreados en donde cada color indica la presencia de una especie en

particular (67).

4.5 Ensayos de PCR específicos para *Aspergillus* toxígenos

4.5.1 Especificidad de los primers ITS1/NIG para *Aspergillus niger*

En la figura 17 se muestra el amplificado de 420 pares de bases (pb) correspondiente a ADN de *Aspergillus niger* como control positivo utilizando la pareja de primers ITS1/NIG (carriles 2 y 3). En el carril 1 se

observa que para una muestra control de *Aspergillus japonicus* no se obtiene amplificado por lo que se puede asegurar la especificidad de esta pareja de primers para especies pertenecientes a *Aspergillus niger*. El amplificado fue evaluado en gel de agarosa al 0.7% para la electroforesis.

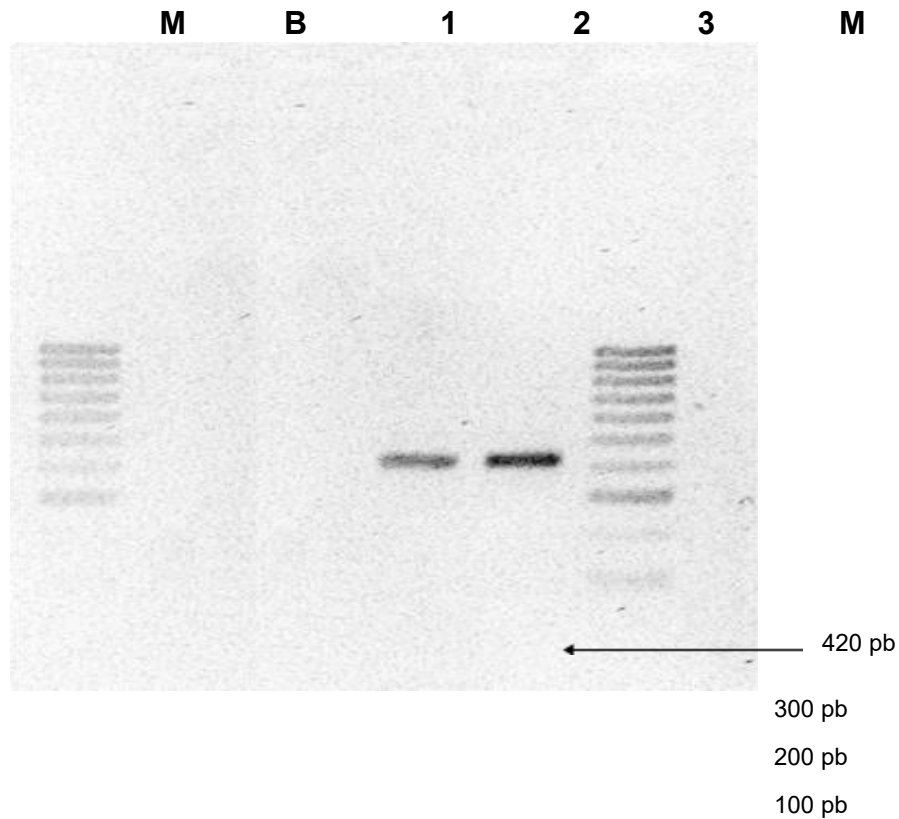


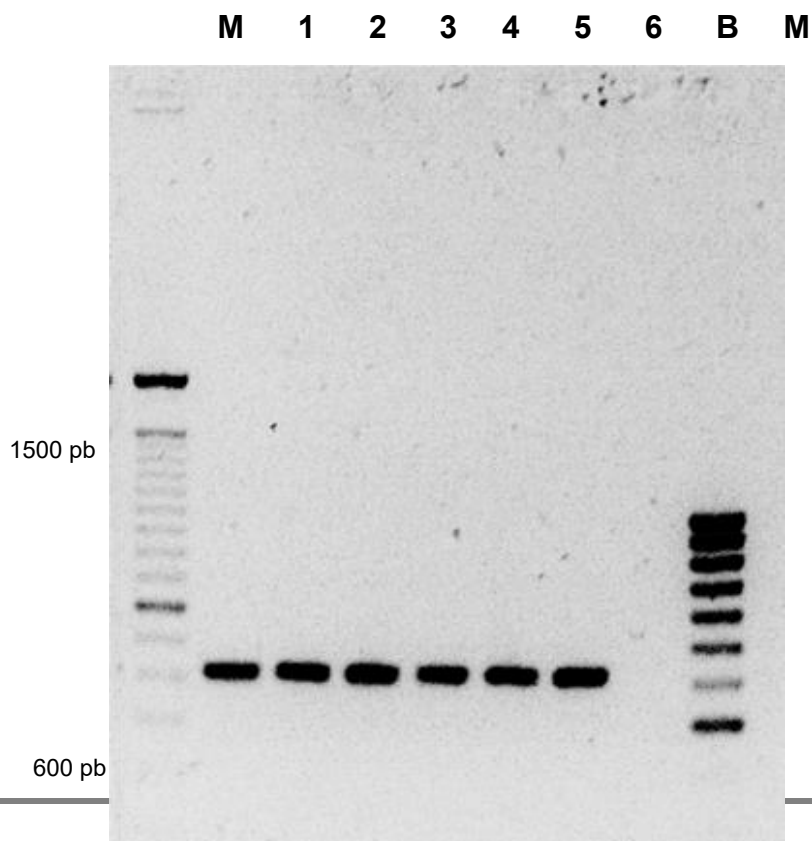
Figura 17. Pruebas de especificidad con fragmento de 420 pb para la especie *A. niger*, B: Blanco, carril 1: ADN de *A. japonicus*, carriles 2-3: ADN de *A. niger* como control positivo, M: Marcador molecular.

4.5.2 Ensayos de PCR específico para *Aspergillus niger*

En la figura 18 y 19 se muestran los amplificados de 420 pb que corresponden a las doce cepas de *Aspergillus niger* aisladas de la muestra 5 y que previamente habían sido caracterizadas morfológicamente, por lo tanto los ensayos de PCR permitieron confirmar los resultados de las pruebas taxonómicas.

Una de las regiones más utilizadas para la búsqueda de primers específicos ha sido la región espaciadora del ADN ribosomal ITS, ya que presenta la variabilidad necesaria para la diferenciación de especies muy cercanas.

Se utilizó el par de primers ITS1/NIG propuesto por Gonzalez Salgado por emplear secuencias multicopia para aumentar la sensibilidad de la detección, esta característica en particular ha sido la razón principal para haberlos elegido en este trabajo (37).



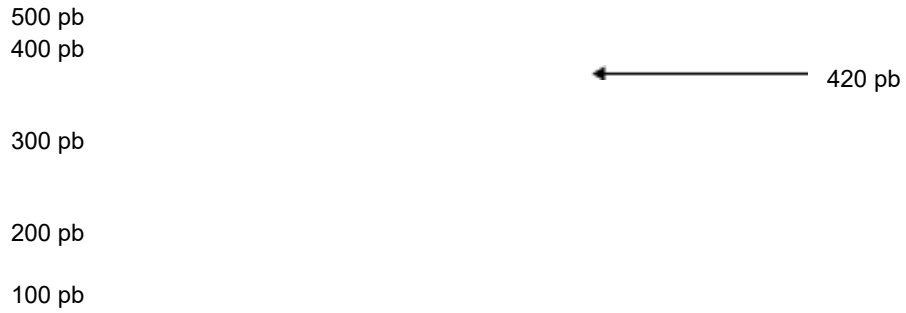


Figura 18. Amplificados de PCR con fragmentos de 420 pb utilizando el par de primers ITS1/NIG, carriles 1-6: ADN de *A. niger* aislados de la muestra 5, B: Blanco, M: Marcador molecular

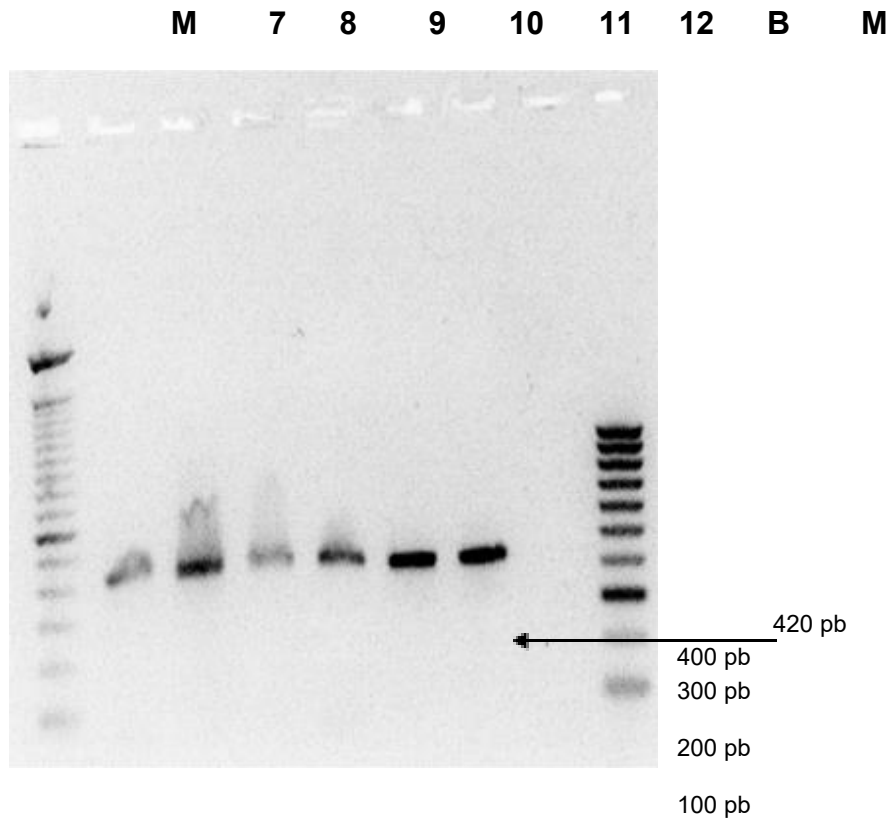


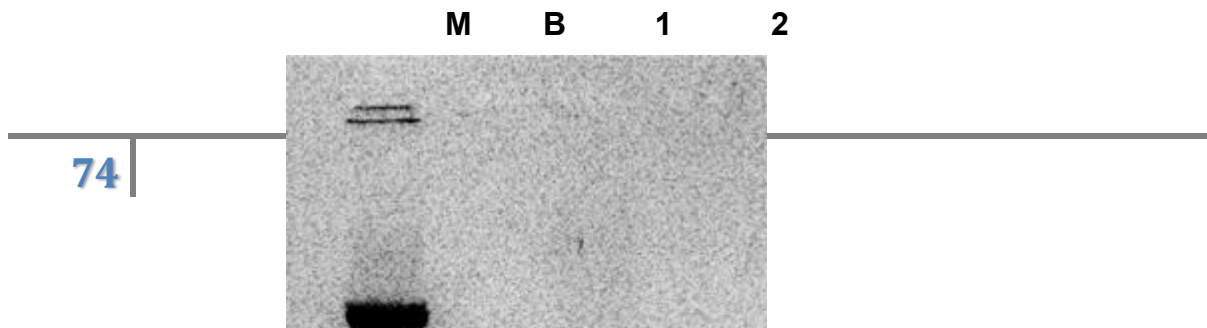
Figura 19. Amplificados de PCR con fragmentos de 420 pb utilizando el par de primers ITS1/NIG, carriles 7-12: ADN de *A. niger* aislados de la muestra

5, B: Blanco, M: Marcador molecular

El ensayo de PCR fue probado en doce cepas de *Aspergillus niger* y en todas las muestras se obtuvo una sola banda de 420 pb, lo que indica la alta especificidad de los primers para la identificación de cepas toxígenas. Con estos resultados es posible concluir que los ensayos de PCR llevados a cabo tienen una alta especificidad y sensibilidad para identificar cepas toxígenas de *Aspergillus niger* que podrían permitir el desarrollo de estrategias de prevención que limiten la contaminación en uva para pasificación.

4.5.3 Especificidad de los primers ITS1/JAP para *Aspergillus japonicus*

En la figura 20 se muestra el amplificado de 520 pares de bases (pb) correspondiente a ADN de *Aspergillus japonicus* como control positivo utilizando el par de primers ITS1/JAP (carril 1). Se observa que para una muestra control de *Aspergillus niger* no se obtiene amplificado por lo que se puede asegurar la especificidad de esta pareja de primers para especies pertenecientes a *Aspergillus japonicus*. Se utilizó gel de agarosa al 0.7% para la electroforesis.



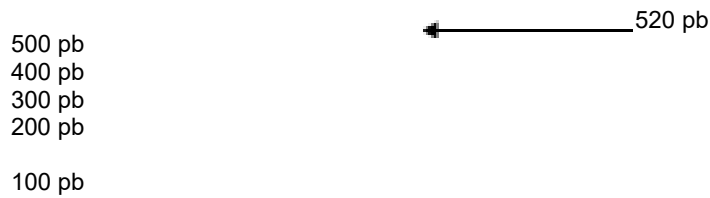


Figura 20. Pruebas de especificidad con fragmento de 520 pb para la especie *A. japonicus*, B: Blanco, carril 1: ADN de *A.japonicus* como control positivo, carril 2: ADN de *A.niger*, M: Marcador molecular.

4.5.4 Ensayos de PCR específico para *Aspergillus japonicus*

En la figura 21 se muestran los amplificados de 520 pb que corresponden a las siete cepas de *Aspergillus japonicus* identificadas por sus características morfológicas (carriles 1-7). El amplificado de 520 pb fue el esperado y concuerda con los resultados obtenidos por Gonzalez Salgado (37). Se utilizó gel de agarosa al 0.7% para realizar la electroforesis y poder visualizar los fragmentos amplificados por PCR.



Figura 21. Amplificados de PCR con fragmentos de 520 pb utilizando el par de primers ITS1/JAP, carriles 1 -7: B: Blanco, carriles 1-7: ADN de *A.japonicus* aislados de la muestra 5, M: Marcador molecular.

La otra especie productora de OTA presente en la muestra 5 fue identificada como *Aspergillus japonicus*, para la cual se han reportado 3 trabajos previos donde se ha confirmado su capacidad para producir OTA (37). Algunos autores han considerado dos variedades para esta especie (*A. japonicus* var.*japonicus* y *A. japonicus* var. *aculeatus*) en donde la principal diferencia radicaba en el tamaño de sus vesículas (66,58). Al contrastar los resultados de las pruebas taxonómicas con la identificación por PCR se pudo confirmar que la especie aislada fue *Aspergillus japonicus* porque el amplificado esperado fue 520 pb, reportado por Gonzalez Salgado en 2009. Por lo tanto se puede concluir que la especie *A. japonicus* podría

ser responsable de la contaminación con Ocratoxina A en uvas para pasificación y que el uso de la pareja de primers ITS1/JAP es válido para identificar cepas ocratoxígenas de *Aspergillus japonicus*.

5. CONCLUSIONES

Durante el transcurso de ésta tesis se desarrollaron tres técnicas para

conseguir una identificación confiable de especies micotoxígenas pertenecientes a la sección Nigri. Dicha identificación combinó tres elementos (las características morfológicas de cada especie, la producción de metabolitos secundarios y por último, el genotipo para lograr una identificación correcta de las especies aisladas. Estas técnicas son complementarias entre sí debido a la dificultad para identificar especies cercanas.

1. En 8 de cada 10 marcas comerciales de uva pasa fue posible encontrar especies de *Aspergillus* sección Nigri con capacidad para producir OTA.
2. Ha sido confirmada la presencia del género *Aspergillus niger* y *Aspergillus japonicus* como productores de OTA.
3. La especie *Aspergillus japonicus* demostró capacidad para producir Ocratoxina A en el 85% de las cepas evaluadas.
4. Han sido identificadas cepas potencialmente ocratoxígenas mediante una estrategia basada en la PCR utilizando primers específicos diseñados en la región ITS, la cual ofrece una amplia variabilidad genética en especies cercanas.
5. La aplicación de la estrategia basada en la PCR ha permitido detectar la contaminación de uva pasa con agregados de *Aspergillus niger* y *Aspergillus japonicus* y así, confirmar que estas especies tienen una presencia importante en la región norte de México en uva para pasificación.
6. El protocolo de detección desarrollado en este trabajo reveló la presencia de las especies *A. flavus*, *Aspergillus niger* y *Penicillium*

spp. lo que indica un posible riesgo de contaminación de aflatoxinas además de la Ocratoxina A en uva pasa. La presencia de estas especies en post-cosecha sugiere que el origen de la contaminación proviene del proceso de secado y el almacenamiento.

6. PERSPECTIVAS

- 1. Al desarrollar estrategias de PCR para la detección de hongos micotoxígenos se podrán disminuir considerablemente los tiempos para analizar una gran cantidad de alimentos donde exista riesgo de contaminación con Ocratoxina A como jugos, vino, frutos deshidratados, café, cacao, etc.**
- 2. El presente estudio está enfocado en la identificación de hongos toxígenos, sin embargo se sabe que los mohos no solamente producen metabolitos dañinos para el ser humano, también son capaces de producir enzimas, vitaminas, moléculas que funcionan como antioxidantes ó antibióticos que son de especial importancia en la industria alimentaria y farmacéutica por lo que también se pueden diseñar estrategias enfocadas a la identificación de cepas que generen productos con alto valor agregado.**
- 3. Es importante establecer normas que limiten la ingesta de Ocratoxina A en los alimentos a fin de evitar enfermedades crónicas como cáncer o insuficiencia renal.**

7. RECOMENDACIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo se hacen las siguientes recomendaciones:

- Aplicar en la medida de lo posible las Buenas Practicas Agrícolas a fin de asegurar la calidad sanitaria de los alimentos que se comercializan en el país y en el extranjero y con ello disminuir riesgos de enfermedades en la población, en especial cáncer.
- Llevar a cabo un adecuado manejo post-cosecha siguiendo las recomendaciones establecidas por la FAO y mantenerse informado y actualizado en lo concerniente a enfermedades ocasionadas por la ingesta de micotoxinas.
- Aplicar las Buenas Practicas de Fabricación siguiendo las normas establecidas en México o en acuerdos internacionales firmados por nuestro país.
- Se recomienda el uso de la estrategia diseñada en este trabajo para la identificación de especies de *Aspergillus* sección Nigri productores de OTA por ser una técnica rápida, específica y confiable.

REFERENCIAS

1. **Asociación Agrícola Local de Productores de Uva. (2009). Estudio de la demanda de uva de mesa mexicana en tres países miembros de la unión europea, y de exploración del mercado de Nueva Zelanda. México. SAGARPA.**
2. **Abarca M.L., Accensi F., Bragulat M.R., Castella G., Cabañes, F.J. (2003). *Aspergillus carbonarius* as the main source of Ochratoxin A contamination in dried vine fruits from the Spanish market. Journal Of Food Protection.**
3. **Al Musallam A. (1980) Revision of the black *Aspergillus* species. Universidad de Utrech, Utrech, Holanda. Tesis doctoral.**
4. **Accensi F., Cano J., Figuera L., Abarca M.L., Cabañes F.J. (1999). New PCR method to differentiate species in the *Aspergillus niger* aggregate. FEMS Microbiology Letters.**
5. **Accensi F., Abarca M.L., Cano J., Figuera L., Cabañes F.J. (2001). Distribution of ochratoxin A producing strains in the *A. niger* aggregate. Antonie van Leeuwenhoek.**
6. **Abarca M.L. (2000). Taxonomía e Identificación de especies implicadas en la aspergilosis nosocomial. Revista Iberoamericana de Micología.**
7. **Abarca M.L., Accensi F., Bragulat M.R., Cabañes F.J. (2001). Current importance of ochratoxin A producing *Aspergillus* spp. Journal Of Food Protection.**
8. **Abarca M.L., Accensi F., Cano J., Cabañes, F.J. (2004). Taxonomy and significance of black *Aspergilli*. Antonie van Leeuwenhoek.**

9. **Bejaoui H. (2005). Champignons ochratoxinogènes et ochratoxine A (OTA) dans des vignobles Français et procédés biologiques de décontamination de l'OTA dans les moûts de raisin. Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Toulouse, France. Tesis doctoral.**
10. **Bellí N., Marín S., Sanchis V., Ramos A.J. (2004). Influence of water activity and temperature on growth of isolates of *Aspergillus section Nigri* obtained from grapes. *International Journal Of Food Microbiology*.**
11. **Bellí N., Ramos A.J., Sanchis V., Marín S. (2004). Incubation time and water activity effects on ochratoxin A production by *Aspergillus section Nigri* strains isolated from grapes. *Letters Of Applied Microbiology*.**
12. **Bellí N., Ramos A.J., Coronas I., Sanchis V., Marín S. (2005). *Aspergillus carbonarius* growth and ochratoxin A production on a synthetic grape medium in relation to environmental factors. *Journal Of Applied Microbiology*.**
13. **Bragulat M.R., Abarca M.L., Cabañes F.J. (2001). An easy screening method for fungi producing ochratoxin A in pure culture. *International Journal Of Food Microbiology*.**
14. **Battilani P., Giorni P., Pietri A., (2003). Epidemiology of toxin-producing fungi and ochratoxin A occurrence in grape. *European Journal of Plant Pathology*.**
15. **Bau M., Castellá G., Bragulat M.R., Cabañes F.J. (2006) RFLP characterization of *Aspergillus niger* aggregate species from grapes from Europe and Israel. *International Journal of Food Microbiology*.**

16. Bau M., Castellá G., Bragulat M.R., Cabañes F.J. (2005). DNA-based characterization of ochratoxin A-producing and non-producing *Aspergillus carbonarius* strains from grapes. *Research in Microbiology*.
17. Céspedes A. (2000). Identificación de Pescados Planos Fileteados mediante PCR. España: Ibérica. Actualidad tecnológica.
18. CODEX Alimentarius. (2012). Prevención y Reducción de la Contaminación de los Alimentos y Piensos. Italia. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. 1ª Ed
19. CODEX STAN 67-1981. (1981). Norma del Codex para las Uvas Pasas. Italia. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.
20. Cabañes F.J., Accensi F., Bragulat M.R., Abarca M.L., Castellá G., Mínguez S., Pons A. (2002). What is the source of ochratoxin A in wine? *International Journal of Food Microbiology*.
21. Carrillo L. (2003). Hongos de los alimentos y forrajes. Salta, Argentina. Universidad Nacional de Salta.
22. Dellacasa E. (2010). Composición de uvas y vino. Componentes químicos del vino tinto Tannat. Montevideo, Uruguay. Facultad de Química, Universidad de la República.
23. Esteban-Franco E. (2005). Estudio fisiológico y molecular de especies ocratoxígenas. Barcelona, España. Tesis doctoral.
24. Esteban A., Abarca M.L., Bragulat M.R., Cabañes F.J. (2004). Effects of temperature and incubation time on production of ochratoxin A by black

Aspergilli. Research in Microbiology.

- 25. Esteban A., Abarca M.L., Bragulat M.R., Cabañes F.J. (2006). Effect of water activity on ochratoxin A production by *Aspergillus niger* aggregate species. International Journal of Food Microbiology.**
- 26. Esteban A., Abarca M.L., Bragulat M.R., Cabañes F.J. (2006). Study of the effect of water activity and temperature on ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius*. International Journal of Food Microbiology.**
- 27. Esteban A., Abarca M.L., Bragulat M.R., Cabañes F.J. (2006). Effect of pH on ochratoxin A production by *A.niger* aggregate species. Food Additives and Contaminants.**
- 28. Esteban A., Abarca M.L., Bragulat M.R., Cabañes F.J. (2005). Influence of pH and incubation time on ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* in culture media. Journal of Food Protection.**
- 29. Esteban A., Abarca M.L., Bragulat M.R., Cabañes F.J. (2005). Isolation and characterization of six polymorphic microsatellite loci in *Aspergillus niger*. Molecular Ecology Notes.**
- 30. EFSA. European Food Safety Authority. (2006). Opinion of the Scientific Panel on contaminants in the Food Chain of the EFSA on a request from the Commission related to ochratoxin A in food. EFSA Journal.**
- 31. Ferreira N.P. (1968). The effect of amino acids on the production of ochratoxin A in chemically defined media. Antonie van Leeuwenhoek.**
- 32. Flanzy C. (2000). Enología. Fundamentos científicos y tecnológicos. España. Mundi Prensa Libros.**

33. **FAO. (2004). Reglamentos a nivel mundial para las micotoxinas en los alimentos y en las raciones en el año 2003. Roma, Italia. Departamento de Agricultura.**
34. **Font-Payan I., Gudiño-Perez P., Sánchez-Martínez A. (2009). La industria vinícola mexicana y las políticas agroindustriales: Panorama general.**
35. **Gimeno A., Ligia-Martins M. (2011). Micotoxinas y micotoxicosis en animales y humanos. Estados Unidos. Special Nutrients, Inc.**
36. **González-Salgado A., Patiño B., Covadonga-Vázquez M.T., González-Jaén. (2005). Discrimination of *Aspergillus niger* and other *Aspergillus* species belonging to section *Nigri* by PCR assays. *FEMS Microbiology Letters*.**
37. **Gonzalez-Salgado A. (2010). Diagnóstico y control de especies de *Aspergillus* productoras de ocratoxina A. Madrid. Universidad Complutense de Madrid. Tesis doctoral.**
38. **Greuter W., Barrie F.R., Burdet H.M., Chaloner W.G., Demoulin V., Hawksworth D.L., Jorgensen P.M., Nicolson D.H., Silva P.C., Trehane P., McNeill J., (1994). International Code of Botanical Nomenclature (Tokyo Code) Adopted by the Fifteenth International Botanical Congress, Yokohama, August-September 1993. *Regnum Vegetabile* 131. Koeltz Scientific Books.**
39. **Hidalgo-Togores J. (2003). Tratado de enología. Vol.1. España. Mundi Prensa Libros.**
40. **Hidalgo-Togores J., Fernandez-Cano L.H. (2011). Tratado de viticultura.**

41. Hamari Z., Kevei F., Kovács É., Varga J., Kozakiewicz Z., Croft J. H. (1997). Molecular and phenotypic characterization of *Aspergillus japonicus* and *Aspergillus aculeatus* strains with special regard to their mitochondrial DNA polymorphisms. *Antonie van Leeuwenhoek*.
42. Hamari Z., Yuhasz A., Gacser A., Kucsera J., Pfeiffer I., Kevei F. (2001). Intron mobility results in rearrangement in mitochondrial DNAs of heterokaryon incompatible *Aspergillus japonicus* strains after protoplast fusion. *Fungal Genetic Biology*.
43. Häggblom P.E., Ghosh J. (1985). Postharvest production of ochratoxin A by *Aspergillus ochraceus* and *Penicillium viridicatum* in barley with different protein levels. *Applied Environmental Microbiology*.
44. INCAVI. Institut Catalá de la Vinya i el Vi. (2006). Guía de buenas prácticas vitícolas para minimizar la presencia de ocratoxina A en los productos vitivinícolas. *Quaderns tècnics de L`incavi 1*.
45. Kusters van Someren M., Samson R.A., Visser J. (1991). The use of RFLP analysis in classification of the black *Aspergilli*: Reinterpretation of the *Aspergillus niger* aggregate. *Current Genetics*.
46. Kusters-van Someren M.A., Samson R.A., Visser J. (1990) Modern concepts in *Penicillium* and *Aspergillus* classification In: NATO ASI Series (Samson, R.A. and Pitt, J.I., Eds.),Vol. 185. Plenum Press, New York.
47. Kozakiewicz Z. (1989). *Aspergillus* species on stored products. *Mycological Papers*.

48. Klich M.A. (2002). Identification of common *Aspergillus* species. Centraalbureau voor Schimmelcultures.
49. López de Cerain., Jiménez A.M., Ezpeleta O., Bello J. (2000). Efectos tóxicos de la ocratoxina A. *Revista de Toxicología*.
50. Lai M., Semeniuk G., Hesseltine W. (1970). Conditions for production of ochratoxin A by *Aspergillus* species in a synthetic medium. *Applied Microbiology*.
51. Lee H.B., Magan N. (2000). Impact of environment and interspecific interaction between spoilage fungi and *Aspergillus ochraceus* on growth and ochratoxin production in maize grain. *International Journal Of Food Microbiology*.
52. Lillehoj E.B., Elling F. (1983). Environmental conditions that facilitate ochratoxin contamination of agricultural commodities. *Acta Agriculturae Scandinavica*.
53. Leong S.L., Hocking A.D., Pitt J.I. (2004). Occurrence of fruit rot fungi (*Aspergillus* section *Nigri*) on some drying varieties of irrigated grapes. *Australian Journal of Grape and Wine Research*.
54. Mégnégneau B., Debets F., Hoekstra. (1993). Genetic variability and relatedness in the complex group of black *Aspergilli* based on random amplification of polymorphic DNA. *Current Genetics*.
55. Mendez-Albores A., Moreno-Martínez E. (2009) Las micotoxinas. Contaminantes naturales de los alimentos. México. *Revista de la academia mexicana de las ciencias*.

56. Magan N., Aldred D. (2005). Conditions of formation of ochratoxin A in drying, transport and in different commodities. *Food Additives and Contaminants, Supplement 1*.
57. O'Callaghan J., Caddick M.X., Dobson A.D.W. (2003). A polyketide synthase gene required for ochratoxin A biosynthesis in *Aspergillus ochraceus*. *Microbiology*.
58. Parenicová L., Skouboe P., Samson R.A., Rossen L., Visser J. (2000). Molecular tools for the classification of black *Aspergilli*: Integration of modern taxonomic methods. Amsterdam, Holanda. Samson R.A., Pitt J.I. Harwood Academic Publishers.
59. Parenicová L., Skouboe P., Frisvad J., Samson R.A., Rossen L., Ten Hoor-Suykerbuyk N., Visser J. (2001). Combined molecular and biochemical approach identifies *Aspergillus japonicus* and *A. aculeatus* as two species. *Applied and Environmental Microbiology*.
60. Parenicová L., Benen J.A.E., Samson R.A., Visser J. (1997). Evaluation of RFLP analysis of the classification of selected black *Aspergilli*. *Mycological Research*.
61. Peterson S.T. (2000). Phylogenetic relationships in *Aspergillus* based on rDNA sequence analysis. In: Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification. Samson, R.A., Pitt, J.I. Harwood Academic Publishers.
62. Pitt J.I. (2000). Toxigenic fungi: which are important? *Medical Mycology*.
63. Pittet A. (1998). Natural occurrence of mycotoxins in foods and feeds-an

updated review. *Revue de Médecine Vétérinaire*.

64. Programa de Formación del Profesorado. (2000). Principios básicos de la manipulación genética. España:UNED. Ingeniería Genética.
65. Rosseau J. (2004). Ocratoxina A en los vinos. Estado de los conocimientos. Revista en Internet de Viticultura y Enología.
66. Raper K.B., Fennell D.I. (1965). *The Genus Aspergillus* (Baltimore: Williams & Wilkins).
67. Samson R.A., Noonim P., Meijer M., Houbraken J., Frisvad J.C., Varga J. (2007). Diagnostic tools to identify black *Aspergilli*. *Studies in Micology*.
68. Samson R.A., Houbraken J.A.M.P., Kuijpers A.F.A., Frank J.M., Frisvad J.C. (2004). New ochratoxin A or sclerotium producing species in *Aspergillus* section *Nigri*. *Studies in Mycology*.
69. Samson R.A., Houbraken J.A.M.P., Kuijpers A.F.A., Frank J.M., Frisvad J.C. (2004). New ochratoxin A or sclerotium producing species in *Aspergillus* section *Nigri*. *Studies in Mycology*.
70. Samson R., Houbraken J., Kuijpers A., Mick F., Frisvad J., (2004). New ochratoxin A or sclerotium producing species in *Aspergillus* section *Nigri*. *Studies in Micology*.
71. Serra R., Braga A., Venâncio A. (2005). Mycotoxin-producing and other fungi isolated from grapes for wine production, with particular emphasis on ochratoxin A. *Research in Microbiology*.
72. Servicio de Información agroalimentaria y Pesquera (2015). Producción

agropecuaria y pesquera. Recuperado de <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-producción-agrícola-por-cultivo/>

73. Spadaro D., Patharajan S., Loré A., Garibaldi A., Gullino M.L. (2012). Ochratoxigenic black species of Aspergilli in grape fruits of northern Italy identified by an improved PCR-RFLP Procedure. *Toxins*.
74. Somma M., Querci M. (2009). *Análisis de la Presencia de Organismos Genéticamente Modificados en Muestras de Alimentos*. Suiza: Institute for Health and Consumer Protection.
75. Soriano del Castillo J.M. (2007). *Micotoxinas en alimentos*. España. Ediciones Díaz de Santos
76. Steele J.A., Davis N.D., Diener U.L. (1973). Effect of zinc, copper, and iron on ochratoxin A production. *Applied Microbiology*.
77. Vazquez-Villanueva N. (2011). *Agricultura moderna mexicana en el siglo XXI*. México. Asociación Agrícola de Productores de uva de mesa.
78. Varga J., Rigó K., Lamper C., Téren J., Szabó G. (2002). Kinetics of ochratoxin A production in different *Aspergillus* species. *Acta Biológica Hungárica*.
79. Varga J., Samson R. (2008). *Aspergillus in the genomic era*. Hardcover.
80. Varga J., Rigó K., Tóth B., Téren J., Kozakiewicz Z. (2003). Evolutionary relationships among *Aspergillus* species producing economically important mycotoxins. *Food Technology and Biotechnology*.

81. Van Egmond H.P., Speijers G.J.A. (1994). Survey of data on the incidence and levels of ochratoxin A in food and animal feed world-wide. *Journal Of Natural Toxins*.
82. Visser J., Skuykerbuyk M., Kusters-van Someren M., Samson R., Schaap P. (1996) Classification of black Aspergilli by RFLP analysis. In: *Fungal identification techniques*. Rossen, L., Rubio, V., Dawson, Mt., Frisvad, J.C Ed.
83. Yokoyama K., Wang L., Miyaji M., Nishimura K. (2001). Identification, classification and phylogeny of the *Aspergillus* section *Nigri* inferred from mitochondrial cytochrome b gene. *FEMS Microbiology Letters*.
84. Zanzotto A., Burruano S., Marciano P. (2006). Digestion of DNA regions to discriminate ochratoxigenic and non-ochratoxigenic strains in the *Aspergillus niger* aggregate. *International Journal of Food Microbiology*.

ANEXO

OCHRATEST™ FLUOROMETRÍA PARA GROSELLAS, HIGOS Y PASAS

1. Extracción de la muestra

1.1 Se pesaron 50 g de muestra con 5 g de NaCl y se colocaron en un vaso para licuadora. La muestra fue licuada con agua para asegurar una mezcla homogénea.

1.2 Se agregaron al vaso 100 ml de metanol al 80% v/v.

1.3 Se licuó a alta velocidad durante 1 minuto.

1.4 El extracto se filtró con papel Whatman No. 1. El filtrado se recolectó en un vaso limpio.

2. Dilución del extracto

2.1 Se pipetearon 10 ml del filtrado y se colocaron en una probeta graduada.

2.2 Se diluyó el filtrado con 40 ml de solución PBS con Tween 0.1%. Se mezcló bien.

2.3 La solución diluida se filtró en un tubo graduado para medir 10 ml de filtrado utilizando microfibra de vidrio como medio filtrante.

3. Cromatografía en columna.

3.1 Se pasaron 10 ml del filtrado a través de la columna Ochratest™ a una velocidad de 1 a 2 gotas por segundo (10 ml equivale a 1.0 g de muestra)

3.2 Se pasaron 10 ml de solución PBS con Tween 0.1% a través de la columna Ochratest™ a una velocidad de 1 a 2 gotas por segundo.

3.3 Se pasaron 10 ml de PBS a través de la columna Ochratest™ a una velocidad de 1 a 2 gotas por segundo.

3.4 Se eluyó la columna Ochratest™ con 1.5 ml de solución para eluir Ochratest™ a una velocidad de 1 a 2 gotas por segundo, se colectó todo el eluido de la muestra (1.5 ml) en un tubo.

3.5 Se mezcló bien e inmediatamente se colocó dentro del fluorómetro. Se leyó la concentración de Ocratoxina después de 60 segundos.

Límite de detección: 0.54 ppb en uva y uva pasa.

PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN (WIZARD MAGNETIC DNA PURIFICATION SYSTEM FOR FOOD)

1.- Se pesaron 200 mg de muestra en peso seco y se transfirieron a un tubo Eppendorf de 2 ml.

2.- Con el tubo inclinado hacia un lado, se agregaron 500 µl de Buffer de lisis A y 5 µl de RNasa A a la muestra. Se cerró el tubo y se mezcló vigorosamente con ayuda de un vortex.

Nota: Dependiendo del volumen y las características de la muestra, el volumen del buffer de lisis deberá ser ajustado. Para un mejor manejo del material, se recomienda que la muestra permanezca del lado del tubo cuando se inclina para agregar los reactivos. Si la muestra se agrupa en el fondo del tubo aún después de usar el vortex, se puede utilizar una punta de micropipeta para re-suspender manualmente.

3.- Se agregaron 250 µl de Buffer de lisis B y se mezclaron con vortex durante 10-15 segundos.

4.- Se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente (22-25°C).

5.- Se agregaron 750 µl de solución para precipitar, después se mezcló vigorosamente.

6.- Se centrifugó durante 10 minutos en una microcentrifuga (13,000 * g).

7.- El sobrenadante (fase líquida) se transfirió a un tubo Eppendorf nuevo.

8.- Se mezcló vigorosamente el bote que contiene MagneSil® PMPs durante 15-30 segundos para asegurar que las partículas están completamente re-suspendidas. Se agregaron 50 µl de MagneSil® PMPs al sobrenadante. Se mezcló vigorosamente. El volumen del líquido se marcó en el tubo.

9.- Se agregó el 80% de isopropanol con respecto al total del volumen marcado en el tubo. El tubo se invirtió 10-15 veces para mezclar. Se incubó 5 minutos a

temperatura ambiente (22-25°C) con mezclados ocasionales, lavando las superficies internas del tubo para quitar partículas finas. Los tubos se insertaron en la gradilla magnética (MagneSphere® Technology Magnetic Separation Stand) y se dejaron ahí durante un minuto. Con los tubos en la gradilla, se removió la fase líquida por decantación o pipeteo.

10.- Se quitaron los tubos de la gradilla y se agregaron 250 µl de Buffer de lisis B a las partículas. El tubo se invirtió 2-3 veces para mezclar. Los tubos se pusieron nuevamente en la gradilla magnética y se dejó que las partículas se agruparan durante un minuto. Se removió el líquido como en el paso 9.

11.- Las partículas se resuspendieron en 1 ml de etanol al 70%, y se volvieron a poner los tubos en la gradilla magnética durante 1 minuto. El etanol se removió como en el paso 9.

12.- Se repitió el paso 11 dos veces más para un total de tres lavados. Utilizando una pipeta, se removió todo el líquido que fue posible en el último lavado.

13. Las partículas se secaron a temperatura ambiente durante 15-30 minutos (o a 65°C, 10 minutos).

14.- Se agregaron 100 µl de agua libre de nucleasas, se mezcló con vortex e incubó a 65°C por 5 minutos. Se insertó el tubo en la gradilla magnética durante un minuto. Se recolectó el ADN suspendido en el agua transfiriéndolo cuidadosamente a un tubo Eppendorf nuevo.

ELECTROFORESIS

- Se sellaron los bordes de un molde de plástico limpio y seco con cinta adhesiva. Se colocó el peine adecuado de modo que se formaran pocillos completos al añadir la solución de agarosa.

- Se diluyó tampón de TAE 10x y se preparó la cantidad adecuada de tampón de TAE 1x para llenar la cubeta de electroforesis y preparar el gel.

Se pesó la agarosa en polvo según lo indicado en la tabla 15 y se añadió a una cantidad apropiada de tampón de TAE 1x en un matraz de Erlenmeyer con tapa suelta (normalmente 150 ml de solución de gel para un molde de 15 x 15 cm y

100 ml de gel para un molde de 15 x 10 cm).

- La mezcla se calentó en un horno de microondas hasta que se dispersó la agarosa (se comprobó el volumen de la solución tras haberla calentado).
- La mezcla se enfrió a 50 - 60°C y se añadió bromuro de etidio (de una solución madre de 10 mg/ml) hasta lograr una concentración final de 0,2 µg/ml y se mezcló bien.
- Se vertió la solución en el molde y se dejó formar el gel. La cantidad de gel empleado debe corresponder a un grosor de aproximadamente 3 - 5 mm.
- Una vez completamente formado el gel, se retiró cuidadosamente el peine y la cinta adhesiva y se colocó el gel en la cubeta de electroforesis.
- Se añadió tampón de TAE 1x a la unidad de electroforesis de modo que el gel quedó cubierto por una capa de aproximadamente 2 - 5 mm.
- Se cargaron 10 µl de cada mezcla (ver tabla 10) en pocillos consecutivos y el ADN marcador adecuado en las calles primera y última.
- Se cerró la tapa de la cubeta del gel y se conectaron los cables eléctricos para que el ADN migre hacia el ánodo; se aplicó una tensión de 7 V/cm.
- La electroforesis se realizó hasta que el azul de bromofenol recorrió la distancia adecuada a través del gel (~ 40 - 60 minutos).
- Se desconectó la corriente y se retiraron los cables y la tapa de la cubeta. Se introdujo el gel en un transiluminador UV y se fotografió en un fotodocumentador.

El gel se tiró en el recipiente para residuos sólidos destinado al bromuro de etidio previsto para tal fin.