

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y
AGROPECUARIAS
DIVISION DE CIENCIAS VETERINARIAS



**“ NIVEL DE CONTAMINACION DE FUMONISINAS EN
MASA Y TORTILLAS EN LA ZONA METROPOLITANA
DE GUADALAJARA ”**

TESIS PROFESIONAL QUE PARA OBTENER
EL TITULO DE MEDICO VETERINARIO Y
ZOOTECNISTA PRESENTAN:

P.M.V.Z. CLAUDIA GRACIELA UDAVE FONSECA
P.M.V.Z. JUAN ANTONIO RUELAS MENDOZA

DIRECTOR:

M.C. WALDINA PATRICIA REYES VELAZQUEZ.

Las Agujas Nextipac, Zapopan, Jal., Febrero de 1999

CONTENIDO

	Página
RESUMEN	x
INTRODUCCION	1
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	11
JUSTIFICACION	12
HIPOTESIS	13
OBJETIVOS	14
MATERIAL Y METODO	15
RESULTADOS	17
DISCUSION	22
CONCLUSIONES	25
BIBLIOGRAFIA	26

RESUMEN

Las fumonisinas son micotoxinas que fueron caracterizadas en 1988, causantes de la pudrición de la mazorca y germinación prematura del maíz. Son producidas principalmente por *Fusarium moniliforme*, el cual es de presentación mundial, detectándose niveles de fumonisinas en el grano durante su cultivo y almacenamiento, así como en productos derivados del maíz. Estudios han demostrado su potencial carcinogénico en ratas, además de ser responsables de la leucoencefalomalacia equina y del edema pulmonar porcino. En algunas regiones de Sudáfrica y China se encuentran relacionadas estrechamente con la alta incidencia del cáncer esofágico humano. Debido a que el maíz es uno de los alimentos básicos de humanos y animales, y es la tortilla un producto de gran consumo nacional, el objetivo del presente estudio fue valorar el nivel de contaminación de fumonisinas presente tanto en la masa como en la tortilla que se expenden en la zona metropolitana de Guadalajara a fin de valorar el riesgo tóxico de la población. El desarrollo de la investigación se realizó mediante un muestreo aleatorio de 40 expendios de masa y tortilla distribuidos en la anterior división de la zona metropolitana (sectores), recolectando 500 g de masa y tortilla por expendio, los cuales se desecaron y pulverizaron para ser analizados mediante la Técnica de ELISA (kits de Fumonisin, Veratox). Los resultados se analizaron mediante el ANOVA y contrastes ortogonales. Se detectaron fumonisinas en el 100% de las muestras, encontrándose en la masa y tortilla los siguientes niveles promedio: Sector Libertad 2.013 y 1.277 ppm; Sector Hidalgo 1.506 y 0.883 ppm; Sector Juárez 1.24 y 1 ppm y Sector Reforma 1.77 y 1.396 ppm respectivamente. Los niveles mayores de fumonisinas se detectaron en los sectores Libertad y Reforma, lo cual puede ser debido por el origen del maíz que abastece a dichos molinos y expendios, sin embargo no fue posible disponer de la información. Se observó una reducción significativa (Aprox. 30%) de los niveles de fumonisinas en las tortillas respecto a los niveles encontrados en masa, lo cual pudo ser debido al efecto del proceso térmico de elaboración de la tortilla, estudio que debe ampliarse a fin de determinar la eficiencia detoxificante del proceso y la influencia de la nixtamalización. Se concluye que los niveles encontrados no son considerados de alto riesgo a la salud, sin embargo deben ser considerados conjuntamente con estudios que valoren la posible producción de hidrolizados de fumonisinas durante procesamientos alcalinos como lo es la nixtamalización, los cuales pudieran incrementar el efecto tóxico del producto (tortilla).

INTRODUCCION.

Las fumonisinas son un grupo de micotoxinas producidas primariamente por *Fusarium moniliforme* y *Fusarium proliferatum*, los cuales se presentan mundialmente en el maíz destinado tanto a consumo humano como animal. Recientes investigaciones han demostrado que las fumonisinas son responsables de la leucoencefalomalacia equina y del edema pulmonar porcino. En algunas regiones de Sudáfrica y China han sido relacionadas con la alta incidencia de cáncer esofágico humano. El riesgo de toxicidad y el mecanismo de carcinogenicidad de las toxinas se encuentra bajo estudio. La detección de niveles de fumonisinas en maíz y en algunos productos derivados del mismo ha permitido determinar la importancia de la realización de estudios en alimentos a base de maíz así como la evaluación del efecto de los diversos procesamientos a los que se someten los granos. (4,5,7,8, 7,21,23,28,30,33,39,48)

Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos por hongos filamentosos que en pequeñas cantidades pueden ocasionar daño en plantas, animales y humanos, se considera han existido desde que inició la civilización, sin embargo, fue hasta 1960 con el brote en Gran Bretaña de la Enfermedad X de pavos donde la alta mortalidad tomó proporciones catastróficas cuando se le confirió la importancia que requería el estudio de las micotoxinas. Como resultado de la investigación en 1961 Sargeant estableció que los metabolitos secundarios de *Aspergillus flavus*, hongo presente en el alimento de los pavos, era el causante de la enfermedad. El compuesto y su constitución fueron determinados en 1963 por Asao y col., el cual fue identificado como aflatoxina. (13,29)

En la actualidad se conoce un gran número de micotoxinas de diferentes tipos y nivel de toxicidad, considerándose uno de los tópicos más estudiados en los últimos 15 años. (20)

La formación de micotoxinas en productos alimenticios, depende de la cepa específica del hongo y es influenciada por factores ambientales como la temperatura y humedad, por lo tanto la contaminación puede variar según las condiciones geográficas. Por lo general, las micotoxicosis en el campo son el resultado de la interacción de dos o más micotoxinas, sin embargo una sola puede ser la de mayor prevalencia e impacto. (12,24)

Mirocha y col. en 1980 listaron 96 especies de hongos pertenecientes a 27 géneros sospechosos de causar toxicidad en los animales domésticos, correspondiendo el 57% a los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*. (12,13)

Una de las especies de *Fusarium* de distribución mundial y de gran habilidad para crecer en un amplio rango de substratos es *Fusarium moniliforme*, el cual es de gran interés en las investigaciones actuales de micotoxinas, por ser considerado productor de toxinas potencialmente carcinogénicas, como lo son las fusarinas y fumonisinas. (4,22,48)

Taxonomía y Biología de *F. moniliforme*

El hongo pertenece a la sección *Liseola* y se presenta principalmente en cereales forrajeros en regiones calurosas. Puede existir en el maíz en forma endofítica y permanecer en la planta asintómicamente, ésta expresión esta relacionada con la naturaleza genética del hongo, cultivo del maíz y condiciones ambientales. (20,21)

Los principales aspectos de la enfermedad del maíz por *F. moniliforme* son podredumbre de la mazorca, tallo y raíz, pudiendo variar el grado de infección de acuerdo a la vía de entrada del hongo, lo cual puede ocurrir a través de los estilos de la mazorca o por esporas precedentes del viento, resultando en una infección temprana de los granos, otra posible vía de entrada es a través de orificios causados por gusanos o insectos en el pericarpio del grano. (3)

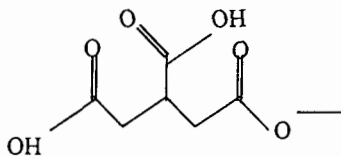
Además de la infección local, la planta de maíz puede llegar a ser infectada sistemáticamente a partir de las semillas contaminadas, por lo que la infección se presenta durante o inmediatamente después de la germinación de la semilla, entrando el hongo en la región de la placa cotiledonaria cuando el tallo brota (germinación), o cuando la plúmula emerge del coleóptilo el hongo crece en el parénquima del tallo y es durante la floración cuando el micelio del hongo se ramifica a toda la planta. Se ha encontrado también infección en las raíces primarias. (21)

Las infecciones de la mazorca y el grano pueden ocurrir a su vez por la infección sistémica de la planta o bien por una combinación de infección local y sistémica. (3)

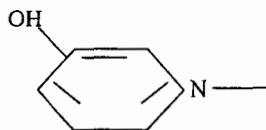
Producción de micotoxinas *F. moniliforme*.

El hongo produce diversos metabolitos, entre ellos se encuentran el ac, giberélico, regulador del crecimiento de la planta del maíz; moniliformina, potencialmente tóxico y de alta mortalidad; ac. fusárico, fusarin C ambas potencialmente mutagénicas (fusarinas) y las fumonisinas. (6,29,41)

ESTRUCTURA QUIMICA DE LAS FUMONISINAS



Acido Tricarboxílico (TCA)



3-Hidroxipiridina (3HP)

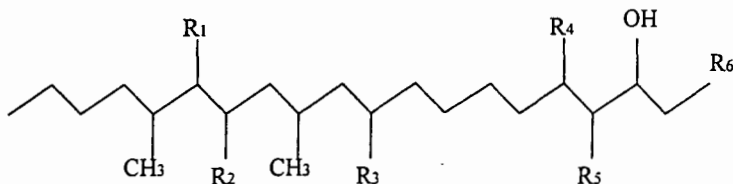


Tabla 1. Tipos de Fumonisin

	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	P.M
FA₁	TCA	TCA	OH	OH	NHCOCH ₃	CH ₃	763
FA₂	TCA	TCA	H	OH	NHCOCH ₃	CH ₃	747
FA₃	TCA	TCA	OH	H	NHCOCH ₃	CH ₃	747
FAK₁	=O	TCA	OH	OH	NHCOCH ₃	CH ₃	603
FB₁	TCA	TCA	OH	OH	NH ₂	CH ₃	721
FB₂	TCA	TCA	H	OH	NH ₂	CH ₃	705
FB₃	TCA	TCA	OH	H	NH ₂	CH ₃	705
FC₁	TCA	TCA	OH	OH	NH ₂	H	707
FP₁	TCA	TCA	OH	OH	3HP	CH ₃	800
FP₂	TCA	TCA	H	OH	3HP	CH ₃	784
FP₃	TCA	TCA	OH	H	3HP	CH ₃	784
PH_{1a}	TCA	OH	OH	OH	NH ₂	CH ₃	563
PH_{1B}	OH	TCA	OH	OH	NH ₂	CH ₃	653

Las fumonisinas fueron caracterizadas en 1988 como diésteres de ácido tricarbóxico y amino-alcoholes de 22 carbonos (peso molecular = 721). Actualmente las fumonisinas FB₁, FB₂ y FB₃ se consideran las de mayor interés por su toxicidad y frecuente presentación. En el maíz contaminado naturalmente la relación de FB₁: FB₂ es de aproximadamente 3:1 y de FB₁: FB₃ es de 12:1. (5,25,35)

Mecanismo de Acción de las Fumonisin

Recientemente se ha demostrado que la FB₁ interfiere con la biosíntesis de esfingolípidos, inhibiendo a la enzima esfingonina N-aciltransferasa (enzima que normalmente produce dihidroceramide a partir de esfingonina en la vía metabólica de esfingosina a ceramide), lo cual causa acumulación de esfingosina y esfingonina a nivel intracelular. Probablemente la inhibición de la enzima se debe a la estructura similar de la esfingonina y fumonisina. (27,33)

Células y animales expuestos a las fumonisinas tienden a incrementar las bases esfingoides libres (esfingonina y esfingosina) en suero, tejidos y orina, lo cual es considerado como un signo primario diagnóstico. (26,45)

Las fumonisinas B₁, B₂ y el hidrolizado de FB₁ han demostrado ser los primeros inidores específicos de presentación natural de la biosíntesis del novo de esfingolípidos. En hepatocitos de rata a consecuencia de la inhibición de la esfingonina N-aciltransferasa se disminuyó la biosíntesis de ceramida y por lo tanto la biosíntesis de novo de esfingosina, además de la rápida acumulación de esfingonina (precursor inmediato en la vía biosintética de la dihidroceramida), ocasionando alteración en la relación esfingosina : esfingonina y depleción del complejo esfingolípido. (33)

En cultivo de neuronas cerebrales, la FB₁ inhibió la biosíntesis de novo de esfingomielina más que la de glicolípidos. El hecho de que la acumulación de la esfingonina es mayor que la de esfingosina sugiere que la vía de novo es el blanco primario de inhibición. Si bien existe la hipótesis de que la alteración en el metabolismo de esfingolípidos es el evento molecular primario en la presentación y progresión del daño celular y de la asociación con las enfermedades causadas por las fumonisinas, el mecanismo responsable exacto, no será fácilmente revelado debido a que el papel de los esfingolípidos en la regulación celular es bastante complejo y no se comprende en su totalidad. (26,33)

A pesar que la FB₁ no es genotóxica, se considera como un agente carcinogénico completo en ratas. Los estudios revelan que las fumonisinas inhiben la proliferación de hepatocitos en el hígado de ratas, por lo que se ha hipotetizado que la hepatotoxicidad y los efectos de proliferación en los hepatocitos son determinantes críticos para la iniciación y promoción de cáncer. (27)

Alternativamente, recientes investigaciones han encontrado, que la FB₁ tiene actividad mitogénica en cultivos de fibroblastos, por lo que es concebible que el potencial mitogénico, citostático y citotóxico de las fumonisinas puedan contribuir a las enfermedades en los animales incluyendo el cáncer en ratas. (27,47)

Incidencia de Fumonisinas en Maíz y Productos Derivados

Estudios realizados recientemente han permitido detectar que los niveles de fumonisinas en maíz molido es diez veces mayor que en el grano entero. Los niveles de FB₁ y FB₂ en cuatro años de cosecha en Estados Unidos (1988- 1991) estuvieron en un rango de 0 a 37.9 µg/g de FB₁, 0-12.3 µg/g de FB₂ y de 0 - 4.0 µg/g de FB₃. (5,16)

Los productos derivados del maíz que han sido analizados incluyen a la harina de maíz , cereal, salvados, tortillas, totopos, palomitas y pan de maíz, encontrándose una concentración de fumonisinas menor de 1.0 µg/g en el 70.8% de las muestras y el 5.7% con 2.5 µg/g. (37)

La FDA (Organismo que controla la Administración de Alimentos y Medicamentos) reporta en la investigación realizada con productos obtenidos de supermercados en el área metropolitana de Washington D.C. alto nivel de contaminación por fumonisinas en harina de maíz y en el maíz parcialmente molido y bajos niveles en el salvado, hojuelas, cereal de maíz inflado, tortilla, palomitas y totopos. (5) Resultados similares fueron encontrados en países como Suiza, Canadá, Egipto, Perú y Sudáfrica. Lo que indica que los consumidores de productos derivados de maíz, disponibles en Estados Unidos y Sudáfrica están expuestos a altos niveles de fumonisinas. (19,26,32)

Estudios epidemiológicos correlacionan altos niveles de fumonisinas en maíz con la mayor incidencia de cáncer esofágico de humanos, considerándose que la incidencia "normal" es de 5 casos por cada 100,000

habitantes, en Transkei, Sudáfrica, región donde el alimento básico de la población es el maíz, incluyendo una bebida fermentada no alcohólica, el rango de cáncer esofágico es de 50-200 casos y los niveles de fumonisinas se encuentran entre 10.2 $\mu\text{g/g}$ en maíz sano y 140.5 $\mu\text{g/g}$ en maíz mohoso. (8,39,48)

Se ha realizado el cálculo de la ingestión diaria de fumonisinas en humanos con base en las investigaciones realizadas en ratas y equinos, encontrándose un consumo de 0.014 $\mu\text{g/g}$ a partir de maíz sano y de 0.44 $\mu\text{g/g}$ de maíz mohoso, con base en la ingestión diaria de 460 g de maíz/ persona de 70 kg, lo que se considera de alto riesgo de exposición. (42)

Enfermedades Asociadas con *F. moniliforme* y Fumonisinas

Leucoencefalomalacia Equina (ELEM). Síndrome que se caracteriza por la presencia de lesiones necróticas licuefactivas en la materia blanca del cerebro. Fue reconocida desde el siglo XIX y se le denominaba "Contaminación del maíz mohoso". Wilson y Maronpot en 1971, reportaron el aislamiento de *F. moniliforme* como el agente causal de la ELEM y reprodujeron la enfermedad. (22) Posteriormente, Marasas y col. en 1988 después de la caracterización de las fumonisinas reprodujeron la enfermedad en equinos mediante la administración intravenosa de FB₁. (28,30,34)

Los investigaciones sugieren que dosis altas de fumonisinas inducen a hepatotoxicidad aguda con lesiones leves en cerebro, mientras que dosis menores causan lesiones severas en cerebro y hepatotoxicidad leve. (34,36)

Edema Pulmonar Porcino (PPE). En 1989-1990 Kriek y col. reportaron un brote de PPE en diversas regiones de Estados Unidos, encontrándose contaminación en el alimento predominantemente con *F. moniliforme*. (13,17,23)

Además de que la FB₁ purificada ha demostrado producir la enfermedad cuando se administra por vía intravenosa, el edema pulmonar (175 ppm, 14 días) y la hepatotoxicidad (> 23 ppm,14 días) se han producido con la ingestión de dietas contaminadas con fumonisinas en forma natural. (7)

Toxicidad en aves. Se ha encontrado inmunosupresión en pollos alimentados con alimentos contaminados por *F. moniliforme*. Recientes estudios han confirmado que *F. moniliforme*, *F. proliferatum*, FB₁ y moniliformina son tóxicos en aves de engorda y en embriones de pollo. Los niveles de fumonisinas en dichos estudios fueron relativamente altos (75-644 ppm). (18,46)

El Laboratorio de Diagnóstico del Comité de Micotoxinas de la Asociación Americana de Veterinarios recomienda evitar en el alimento niveles de fumonisinas mayores de 5 ppm, 10 ppm, 50 ppm y 50 ppm para equinos, cerdos, bovinos carne y pollos respectivamente. (34)

La siguiente tabla muestra los niveles de fumonisinas asociados con enfermedades de animales y en productos de maíz.

Enfermedad/Producto	Niveles de Fumonisinas
	µg/g
ELEM	< 1 – 126
PPE	< 1 – 330
Maíz dañado	553
Mazorca	138
Tallo	54
Maíz molido	125
Maíz entero sin daño	1 – 4

Fuente : Bullerman Ll.B. 1994.

Efecto del Procesamiento sobre los niveles de Fumonisinas.

Aunque se han realizado algunos estudios del efecto del procesamiento en la estabilidad de las fumonisinas, existe una cantidad limitada de información disponible. Actualmente la FB₁ ha sido considerada como un componente termoestable; los reportes indican una recuperación de 40% de FB₁ y FB₂ después de someterse a una temperatura de 190 °C durante 60 minutos. (1,10)

Los estudios sobre la estabilidad de las fumonisinas son complicados debido a la escasez de métodos analíticos apropiados. Se ha determinado que los niveles de fumonisinas pueden reducirse en un 50% o más durante el calentamiento, sin embargo, el substrato permanece tóxico, debido probablemente a que la toxina permanece atada a la matriz del alimento y no llega a ser recuperada mediante los métodos de extracción química usuales, por lo tanto es muy importante distinguir entre la descomposición química y la asociación de la toxina a la matriz del alimento en los estudios de estabilidad y procesamientos. (6)

Los métodos deben ser también capaces de detectar productos hidrolizados de fumonisinas que permanecen tóxicos, esto es debido a que durante el proceso de nixtamalización del maíz (proceso para la producción de tortilla), realizado con hidróxido de calcio se remueve la FB1, pero puede resultar la formación de hidrolizados que pueden permanecer tóxicos, lo cual no ha sido estudiado ampliamente. (14,16)

Metodología Analítica para la Detección de Fumonisinas.

En la actualidad se citan 2 métodos de extracción mediante solventes polares (metanol/agua o acetonitrilo/agua); seguido de limpieza mediante columna de intercambio iónico (SAX) o vía columna C18 de fase de reversa Sep-Pak (Waters associates, Milford) (26)

Para la detección de la toxina mediante cromatografía de líquidos o cromatografía de capa fina se requiere derivatización con agentes fluorescentes como Fluorescamina, OPA (o-phthaldehido) o el NAD (2,3 dicarboxialdehido naftaleno), mientras que para cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM) se requiere la hidrólisis de bases, a fin de remover los grupos de ácidos tricarbóxicos y la derivatización de grupo amino para aumentar la volatilización. La ventaja del método de CG-EM, es que combina la cuantificación de la fumonisina con la confirmación estructural, desafortunadamente se requiere de tiempo considerable para su análisis y de equipo costoso. (31,38,40)

El método más usual para la detección de fumonisinas en alimentos es mediante cromatografía de líquidos, el cual permite la separación de las fumonisinas FB1, FB2, y FB3 en 16 minutos mediante un sistema de solventes y permite un límite de detección de 50 ppb. (26,38)

El método de cromatografía de capa fina tiende a separar e identificar eventualmente las fumonisinas, pero es de escasa sensibilidad, siendo el límite de detección de 50 ppm. (31)

Se ha desarrollado para la inspección de alimentos, la producción de anticuerpos monoclonales y policlonales a partir de fumonisinas, los cuales han sido utilizados mediante la técnica ELISA (Ensayo Inmunofluorescente de enzima ligada) y el método de Inmunocromatografía. (2)

Con el advenio de la tecnología de anticuerpos monoclonales y policlonales en aplicaciones analíticas, particularmente en el terreno de las micotoxinas, se hace posible chequeos rápidos y confiables de contaminación con métodos de bajo costo. Entre los métodos que utilizan anticuerpos se incluyen las técnicas inmunoenzimáticas (Agri-Screen y Veratox de Noegen), las cuales se basan en la técnica de ensayo inmunoabsorbente mediante enzima ligada (ELISA).

La técnica de ELISA consiste en poner en contacto el anticuerpo específico de la toxina presente en la superficie de la microcelda con la toxina extractada de la muestra, mezclar con la solución del conjugado (toxina marcada químicamente o conjugada con la enzima), donde compiten por los sitios de acoplamiento y después del período de incubación, la toxina y el conjugado libres son lavados para posteriormente agregar el substrato para obtener el cambio de color por efecto del conjugado. A mayor conjugado ligado a anticuerpos mayor coloración. (40)

El Maíz en México

Actualmente el cultivo de maíz en México ocupa una superficie de casi 8 millones de hectáreas con una producción aproximada de 14 millones de toneladas, de las cuales el 66% es destinado a consumo humano, el 14% para uso directo en animales de traspatio, 14% para elaboración de alimentos balanceados, 5% en la elaboración de diferentes productos por medio de la industria y el 1% a la producción de semilla. (12,29)

Entre los diferentes procesos a los que se somete el maíz para el consumo de la población, destaca la nixtamalización, procesamiento químico para la elaboración de la tortilla, siendo uno de los productos más usuales de la alimentación básica del mexicano (consumo per capita de 248 kilogramos

anuales). En la actualidad la industria del maíz y la tortilla está formada por molinos de nixtamal, molinos-tortillerías, tortillerías y fábricas de harina de maíz, llegando a sumar aproximadamente 42,000 establecimientos a nivel nacional, manejándose una quinta parte del mercado global con una producción de 11 millones de toneladas anuales y ventas de aproximadamente \$11,000 millones en 1995. (12,29)

Durante el proceso de nixtamalización, que consiste en someter al grano de maíz a un baño alcalino con hidróxido de calcio a una temperatura de ebullición para facilitar su molienda y la preparación de la masa, se desprende el pericarpio del grano (la parte más indigesta) y se mejora el valor nutritivo, el cual es pobre en proteína y calcio. Estudios recientes han reportado la producción de hidrolizados de fumonisinas por efecto del procesamiento de la nixtamalización. (14,16)

En relación al efecto tóxico de los hidrolizados se tiene el reporte de un estudio realizado en ratas, donde los niveles evaluados de fumonisinas e hidrolizados fueron de 45 mg/kg de p.v. y de 8-11 mg/kg de p.v. respectivamente, encontrándose síntomas y lesiones de similar severidad. (14)

Respecto al metabolismo de las micotoxinas en animales, se han encontrado altos niveles en las secreciones y en tejidos, como es el caso de la Aflatoxina M₁ presente en la leche, lo cual conlleva al riesgo en salud pública cuando continua la cadena alimenticia, sin que hasta la fecha se tengan estudios relacionados con las fumonisinas. (24)

Por lo que es importante llevar a cabo estudios que generen información sobre el grado de contaminación existente a nivel molinos y expendios de tortillas, a fin de prevenir el riesgo toxicológico de la población y evitar su incorporación en dietas de animales.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En México el cultivo de maíz representa el 40% de la superficie agrícola nacional, con una producción 14 millones de toneladas anuales, de las cuales el 66% se destina a consumo humano en sus diferentes productos, especialmente tortillas, pozole y tamales, entre otros.

Durante el cultivo de maíz es posible que se presenten condiciones estresantes en la planta que influyen en la colonización de diversos microorganismos que dañan a la planta, entre los que se encuentran los hongos micotoxigénicos, lo que puede dar lugar a la producción de metabolitos tóxicos durante el cultivo o el almacenamiento bajo condiciones apropiadas de temperatura y humedad para el crecimiento del hongo.

F. moniliforme es un hongo de alta presentación en el maíz (90%), el cual es el principal productor de las fumonisinas, toxinas potencialmente carcinogénicas en algunas especies, responsables de la leucoencefalomalacia equina, del Edema pulmonar porcino, además de estar estrechamente relacionada al cáncer esofágico de humanos.

Estudios previos han permitido detectar niveles de micotoxinas en masa y tortilla, como es el caso de las aflatoxinas, aún cuando el proceso de nixtamalización de la masa y la elaboración de la tortilla permite la detoxificación parcial del alimento contaminado, lo que no ha sido evaluado para las fumonisinas. Por otra parte, se ha observado que durante la nixtamalización se generan productos hidrolíticos de la micotoxina, cuyo grado de toxicidad parece incrementarse, lo que incrementa el interés en la detección y cuantificación de los niveles de fumonisinas en dichos productos.

Debido a la carencia de investigaciones relacionadas con este grupo de micotoxinas de reciente caracterización, y dada su trascendencia epidemiológica en países cuya alimentación básica depende del maíz, deben realizarse investigaciones que establezcan los niveles de fumonisinas de riesgo tanto para la salud humana como animal

JUSTIFICACION

La valoración de los niveles de fumonisinas en la masa y tortilla en los molinos y expendios de la zona metropolitana de Guadalajara permitirá estimar el riesgo toxicológico de la población. Además de identificar la problemática en salud pública, será posible detectar soluciones al problema de contaminación del maíz durante el almacenamiento en los molinos, así como durante el proceso de la nixtamalización y elaboración de la tortilla.

Puesto que es frecuente que el alimento contaminado se utilice para la alimentación de animales, y siendo conocido que durante el metabolismo de las micotoxinas en las diferentes especies de animales se producen metabolitos con frecuencia de mayor toxicidad, los cuales se depositan en los tejidos o bien se eliminan en sus secreciones, el uso de masa y tortilla contaminada como ingredientes en las raciones aumentaría el problema, por una parte, en pérdidas económicas en las explotaciones pecuarias y siguiendo la cadena alimenticia a la salud pública con el consumo de productos de origen animal.

La determinación de los niveles de fumonisinas en la masa y tortilla contribuirá a la investigación en la línea de “Residuos Tóxicos en Alimentos”, al ser parte del proyecto “Detección de Fumonisinas en maíz y efecto de la nixtamalización sobre la producción de hidrolizados de FB₁”, que se realiza en el laboratorio de Micotoxicología del C.U.C.B.A.

HIPOTESIS

La presentación de *Fusarium moniliforme* es frecuente en el maíz así como la producción de fumonisinas, y puesto que el proceso de la nixtamalización no elimina en su totalidad los metabolitos secundarios de hongos, es posible detectar niveles de fumonisinas en la masa y tortilla que puedan representar riesgo tóxico para la población humana.

OBJETIVOS

GENERAL :

Valorar el nivel de contaminación por fumonisinas en masa y tortilla en la zona metropolitana de Guadalajara.

PARTICULARES :

1. Determinar el nivel de contaminación de fumonisinas en la masa y tortillas que se expenden en la zona metropolitana de Guadalajara.
2. Comparar los niveles de fumonisinas en masa y tortillas en las diferentes zonas de Guadalajara.
3. Estimar la posible reducción de los niveles de fumonisina en la tortilla por efecto del proceso al que se somete la masa para la producción de la tortilla.

MATERIAL Y METODO

El presente estudio se desarrolló en el área de Micotoxicología del Departamento de Salud Pública, División de Ciencias Veterinarias, Centro Universitario de Ciencia Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Guadalajara.

Muestreo : Se recolectaron 500 g de masa y tortilla de 40 molinos y expendios de la zona metropolitana de Guadalajara, ambos seleccionados por la utilización exclusivamente de masa nixtamalizada (Información proporcionada por la Cámara Nacional de la Industria de la Masa y Tortilla).

Las muestras se desecaron en estufa de aire forzado a una temperatura de 60°C durante 48 horas, posteriormente se molieron a un diámetro de partícula de 1 mm en un molino de cuchillas (marca Miller) y se almacenaron a temperatura ambiente hasta el análisis.

Técnica de ELISA para Detección de Fumonisin.

(Fumonisin Quantitative Test Kit, Veratox. Distribuido por Noegen, 620 Lester, Lansing, M.I. (517) 372-9200)

Preparación de la muestra :

1. Se pesó 50 g de muestra y licuó con 250 ml de metanol al 70% durante 2 minutos en alta velocidad.
2. Se separó el extracto por medio de papel filtro N° 1 y colectó como mínimo 10 ml de la muestra.
3. Se diluyó la muestra utilizando 100 µl/lit del extracto ya filtrado y se colocó en los frascos del kit de dilución agitando para homogenizar la solución.

Procedimiento :

1. Se utilizaron las microceldillas rojas (Celdillas de mezclado) de acuerdo a las muestras a analizar, además de los controles.
2. Se tomaron el mismo número de microceldillas cubiertos con Anticuerpos.

3. Se colocó en las microceldillas de mezclado 100 μl /lt del conjugado en cada pozo y añadió 100 μl /lt de la dilución de la muestra y de los estándares.
4. Se transfirió 100 μl /lt. a los pozos correspondientes de anticuerpos y se descartaron las soluciones de las celdillas del mezclado (rojas) evitando salpicaduras de un pozo a otro para no contaminar.
5. Se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos y removió cada 5 minutos por 30 segundos, teniendo el cuidado de no salpicar el contenido de una celdilla a otra.
6. Después de 15 minutos se eliminó el contenido de los pozos y lavó con agua destilada, tiró, volteó el plato y secó con papel absorbente repitiendo este paso 5 veces.
7. Se agregó 100 μl /lt del substrato K-azul e incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos.
8. Se detuvo la reacción con la solución establecida (etiqueta roja) utilizando 100 μl por pozo.
- 9.- Se limpió la base de las microceldillas y tomó la lectura de la densidad óptica en el Lector de ELISA (EL 301, Biotec), utilizando el filtro de 650 nm.

Análisis estadístico.

Los resultados del estudio se evaluaron mediante el Análisis de varianza y se aplicaron Contrastes Ortogonales para la comparación de los niveles promedio de fumonisinas en la masa y tortilla.

Para estimar la reducción de fumonisinas por el posible efecto de la elaboración de la tortilla (estudio subjetivo, no evaluado técnicamente), se compararon el promedio general de masa y tortilla, considerando como punto de referencia a la masa (100%) y el de la tortilla el valor a contrastar.

RESULTADOS

El análisis de la masa y tortilla recolectadas en los diferentes expendios de la zona metropolitana de Guadalajara permitió detectar la presencia de fumonisinas en el 100% de las muestras (n=80).

Los niveles de fumonisinas observados en la masa fluctuaron en un rango de 0.5 a 3.8 ppm, con un valor promedio de 1.63 ppm cuando se agruparon de manera general los resultados, encontrándose los niveles mayores en los sectores Libertad y Reforma, siendo diferentes estadísticamente ($p < 0.05$) a los sectores Hidalgo y Juárez. (cuadro 1, gráfica 1)

La detección de fumonisinas en las tortillas fluctuó de 0.1 a 3.3 ppm, con un valor promedio de 1.130 ppm, encontrándose que los niveles de fumonisinas en los diferentes sectores de la ZMG mostraron similar tendencia a lo encontrado en la masa, coincidiendo los niveles máximos y mínimos en el sector Libertad. (cuadro 2, gráfica 2).

Es importante resaltar la reducción altamente significativa ($p < 0.01$) de los niveles de fumonisinas presentes en las tortillas respecto a los niveles de la masa. La disminución observada fue mayor en el sector Hidalgo con un 41.37% de reducción y fue menor en el sector Juárez con 19.4% (cuadro 3, gráfica 3).

Cuadro 1

DESCRIPCION ESTADISTICA DE LOS RESULTADOS EN LA MASA EN LOS 4 SECTORES DE LA Z.M.G. (ppm)

Medida	Sector Libertad	Sector Hidalgo	Sector Juárez	Sector Reforma
Promedio	2.013	1.506	1.24	1.77
Mediana	2.15	1.5	1.3	1.4
Moda	2	1.3	1.6	1.4
Mínimo	0.5	0.73	0.7	0.7
Máximo	3.8	2.43	1.8	3.4

Cuadro 2

DESCRIPCION ESTADISTICA DE LOS RESULTADOS EN LAS TORTILLAS EN LOS 4 SECTORES DE LA Z.M.G. (ppm)

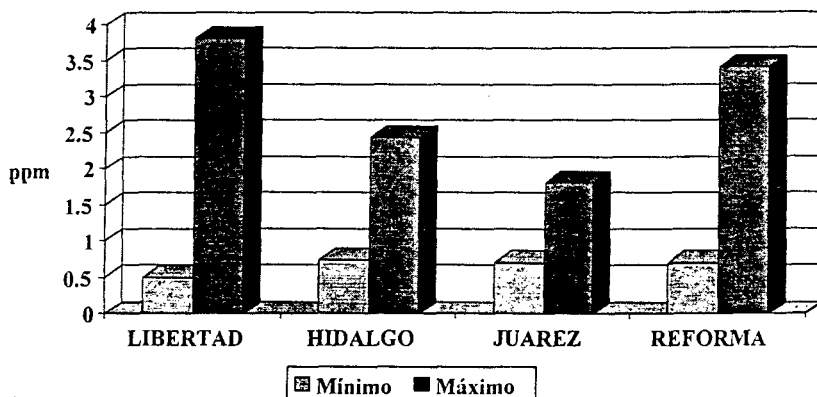
Medida	Sector Libertad	Sector Hidalgo	Sector Juárez	Sector Reforma
Promedio	1.277	0.883	1	1.396
Mediana	1.25	0.95	1	1.1
Moda	1.7	0.9	0.5	0.8
Mínimo	0.1	0.16	0.5	0.56
Máximo	3.3	1.5	2	3.1

Cuadro 3
PORCENTAJE DE REDUCCION DE FUMONISINAS EN LAS TORTILLAS

SECTOR	MASA	TORTILLA	REDUCCION
Libertad	2.013	1.277	36.56 %
Hidalgo	1.506	0.883	41.37 %
Juárez	1.24	1.0	19.4 %
Reforma	1.77	1.396	21.13 %

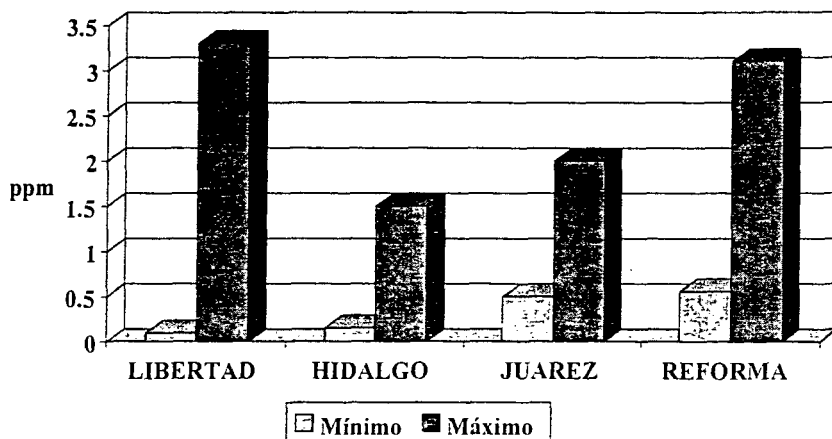
GRAFICA 1

Niveles de Fumonisina detectados en la Masa (ZMG)

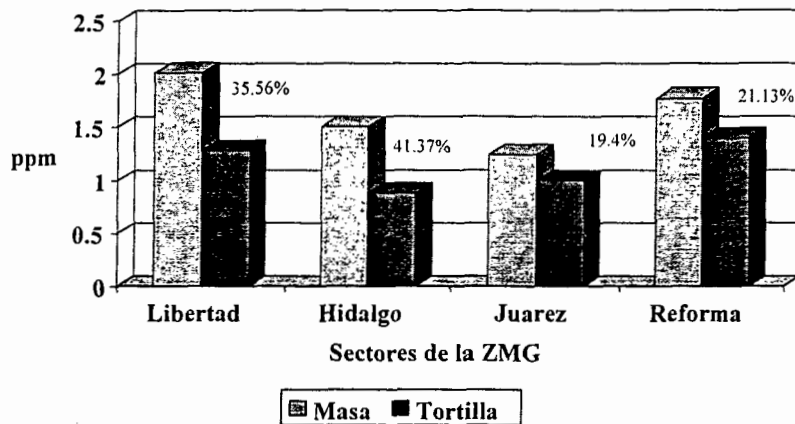


GRAFICA 2

Niveles de Fumonisinas detectados en la Tortilla (ZMG)



GRAFICA 3
Reducción de los niveles de Fumonisinias por Efecto de
Elaboración de la Tortilla



DISCUSION

La presencia de fumonisinas en el total de las muestras analizadas permite suponer que existe riesgo toxicológico en la población de la zona metropolitana de Guadalajara, sin embargo, deben ser considerados primeramente los niveles presentes en la masa y tortilla, los cuales se encontraron alrededor de 1 ppm, siendo comparables a los niveles detectados en Charleston SC (área de mayor incidencia de cáncer esofágico en Estados Unidos) con un rango de 0.17 a 2.4 $\mu\text{g/g}$, sin embargo, el estudio se realizó en harina de maíz.⁽⁵⁾ Si bien en Transkei, Sudáfrica se han reportado niveles de 10.2 $\mu\text{g/g}$ y 6.7 $\mu\text{g/g}$ en maíz sano a 63.2 $\mu\text{g/g}$ y 140 $\mu\text{g/g}$ en maíz mohoso en los años de cosecha de 1985 y 1989 respectivamente, ⁽²²⁾ los cuales son superiores a lo encontrado en el presente estudio.

Aunque los niveles presentes en la masa y tortilla no son altos, existe la posibilidad de que se encuentren productos hidrolizados de las fumonisinas generados por el procesamiento de la nixtamalización, los cuales no son detectados por las técnicas usuales de análisis y esto pudiera ser de gran relevancia al enmascararse el grado real de contaminación de los productos de maíz. ⁽¹⁴⁾

Por otra parte, se debe determinar el potencial tóxico de las fumonisinas presentes en la masa y tortillas que se expenden en la ZMG mediante la confirmación a través de otras técnicas analíticas, ya que en la actualidad se cuenta con diversos métodos de detección de variable grado de precisión y sensibilidad, encontrándose algunas ventajas y desventajas en cada uno de ellos. Si bien el método de mayor precisión es a través de la cromatografía de líquidos de alta resolución, se requiere de equipo de alto costo y de personal altamente calificado para su realización, por lo que en la actualidad se utilizan con mayor frecuencia las técnicas de ELISA y de Sistemas de Cromatografía de Afinidad Inmunológica con detección Fluorométrica, los cuales son de rápida aplicación y de menor costo, aceptados por la Asociación de Químicos Analíticos Oficiales (A.O.A.C.), sin embargo tienen la desventaja de tener menor sensibilidad lo que puede dar por resultado falsos positivos o negativos. ^(26,31)

Es importante mencionar que la técnica de ELISA, desarrollada por los Laboratorios Noegen, consiste en Kits preparados con anticuerpos monoclonales que permiten establecer una reacción competitiva mediante

enzima ligada, fue diseñada para el análisis de granos y alimentos con mínimo procesamiento, por lo que tiende a disminuir su sensibilidad y precisión en productos sometidos a procesos químicos como lo es la nixtamalización. (2) sin embargo se seleccionó debido a la disponibilidad del equipo y material en el momento de la investigación.

De los resultados obtenidos debe resaltarse que se observó mayor contaminación en los sectores Reforma y Libertad, ambos localizados en la zona oriente de la ciudad, lo cual puede ser debido al origen del maíz que abastece a los molinos de dichos sectores, sin embargo no fue posible obtener información al respecto, siendo un factor relevante, puesto que el hongo principalmente se desarrolla y contamina a nivel de campo, lo cual puede variar según la época del año y el tipo de cosecha, otros factores que contribuyen a la severidad o reducción de la contaminación son el almacenamiento, el proceso de nixtamalización y la elaboración de la tortilla. (24)

Aunque el nivel de contaminación de fumonisinas detectado en la masa y tortilla en la ZMG no son elevados, debe ser considerado la posible producción de hidrolizados, puesto que se ha reportado que la nixtamalización induce a la producción de hidrolizados de fumonisinas, lo que incrementa el riesgo tóxico de los productos procesados. El principal producto de hidrólisis durante la nixtamalización parece ser el HFB1, pero es posible que existan otros productos, tales como complejos de FB-calcio u otros de difícil identificación que jueguen un papel importante en la toxicidad del maíz contaminado por los hongos productores de fumonisina. (14)

Con relación al procesamiento de elaboración de la tortilla, el cual consiste en el paso a través de bandas de cocción a temperaturas que fluctúan entre 150 y 200 °C, no existen estudios sobre el efecto en los niveles de fumonisinas, lo cual pudiera contribuir a la reducción de la contaminación, ya que existen reportes sobre el efecto reductor en los niveles de fumonisinas a altas temperaturas. (10)

Desafortunadamente, los progresos en dicha área se encuentran limitados debido a que en la actualidad la metodología analítica no permite distinguir entre la degradación verdadera y la asociación de la toxina a la matriz del alimento (5)

Se puede concluir que los niveles de fumonisinas presentes en los productos de maíz analizados no son considerados tóxicos para consumo humano y/o animal, sin embargo los resultados deben complementarse con las investigaciones relacionadas al efecto del procesamiento de la nixtamalización sobre la producción de hidrolizados u otros metabolitos que incrementen el riesgo tóxico del alimento.

CONCLUSIONES

- 1 En todas las muestras obtenidas de masa y tortillas en la zona metropolitana de Guadalajara se detectó la presencia de fumonisinas.
- 2 Los niveles promedio de fumonisinas encontrados en masa y tortillas fueron de 1.63 y 1.13 ppm respectivamente.
- 3 En los sectores Libertad y Reforma se encontraron los niveles más altos de fumonisinas, siendo de 3.8 y 3.4 ppm para la masa y de 3.3 y 3.1 ppm para la tortilla.
- 4 El proceso de elaboración de la tortilla redujo significativamente la presencia de fumonisinas. La reducción se presentó entre el 19.4 y 41.37 %.
- 5 Considerando el potencial carcinogénico que representan las fumonisinas tanto en humanos como en animales, es necesario realizar estudios toxicológicos que permitan relacionar los niveles que se detectan en los alimentos sometidos a procesamiento.
- 6 Puesto que el desperdicio de los molinos y expendios de tortillerías generalmente se destina a consumo animal, deben ser valorados los niveles de fumonisinas presentes en dichos productos.

BIBLIOGRAFIA

1. **ALBERTS J.F.**, Gelderblom W.C.A., Thiel P.G., Marasas W.F. O., Schalwyk D.J.V. y Behrend Y. 1990. Effects of temperature and incubation period on production of fumonisin B1 by *Fusarium moniliforme*. Appl. Environ. Microbiol. 56 (6) : 1729-1733.
2. **AZCONA. O.J.**, Abouzied M. M., Plather D.R. and Pestka J.J, 1992, Production of monoclonal antibodies to the mycotoxins Fumonisin B1, FB2 and B3 J. Agric. Food Chem. 40 :531-534.
3. **BACON CH. W.** and Nelson P.E. 1994, Fumonisin Production in corn by toxigenic strains of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium Proliferatum*. J. Food Prot. 6 :514-521.
4. **BULLERMAN LL.B.** y Draughon F.A. 1994. *Fusarium moniliforme* and Fumonisin Symposium. J. Food Prot. 57 (6) : 513.
5. **BULLERMAN LL.B.** y Tsai Wei-Yun J. 1994 Incidence and levels of *Fusarium moniliforme*, *Fusarium proliferatum* and fumonisins in corn and corn-based Foods and Feeds. J. Food Prot. 57 (6) : 541- 546.
6. **CAWOOD M.E.**, Gelderblom W.C.A., Vieggar R.B, Thiel P.G. y Marasas W.F.O. 1991 . Isolation of Fumonisin Mycotoxins : A quantitative Approach. J. Agric. Food Chem. 39 :1958-1962.
7. **COLVIN B.M.**, Cooley A.J. y Beaver R.W. 1993. Fumonisin toxicosis in swine : Clinical and Patologic findings. J. Vet. Diagn. Invest. 5 :232-241.
8. **CHU F.S.** y Li G.Y. 1994. Simultaneous occurrence of Fumonisin B1 and other mycotoxins in moldy corn collected from the People's Republic of China in regions with high incidence of esophageal cancer. Appl. Environ. Microbiol. 60(3) :847-857.
9. **DESJARDINS A.E.**, Plattner R.D. y Nelson P.E. 1994. Fumonisin production and other traits of *Fusarium moniliforme* strains from maize in Northeast Mexico. Appl. Environ. Microbiol. 60(5) :1695-1697.

10. **DUPUY J.**, Bars P.L., Boundra H. y Bars J.L. 1993. Thermostability of Fumonisin B1, a mycotoxin from *Fusarium moniliforme* in corn. Appl. Environ. Microbiol. 59 : 2864-2867.
11. **GELDERBLOM W.C.A.**, Jaskrewiez K., Marasas W.F.O., Thiel P.G., Horak R.M., Viegarr R. y Kriek N.P.J. 1988. Fumonisin- novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. Appl. Environ. Microbiol. 54 :1806-1811.
12. **GONZALEZ A.U.** 1995. El Maíz y su conservación. Cap. 6. Plagas de maíz. Editorial Trillas p : 214-251.
13. **HAYWARD D.G.** 1996. Investigación Bibliográfica sobre micosis en Medicina Veterinaria. Fuentes, incidencia, patogenia, toxicidad, signos clínicos, diagnóstico y métodos analíticos. Tesis de Licenciatura de la Fac. de Medicina Veterinaria y Zootecnia. U.N.A.M.
14. **HENDRICH A.**, Miller K.M., Wilson T.M. y Murphy P.A. 1993. Toxicity of *Fusarium proliferatum* fermented nixtamalized corn based diets fed to rats : Effect of nutritional status. J. Agric. Food Chem. 41 : 1649-1654.
15. **HOLCOMB M.**, Sulherland J.Bb., Chiarelli M.P., Korfmacher W.A., Thompson H.C., Hankins L.J. y Cerniglia C.F. 1993. HPLC and FAB mass Spectrometry, Analisis of fumonisins B1 and B2 produced by *Fusarium moniliforme* on food substrates. J. Agric. Food Chem. 41 : 357-360.
16. **HOPMANS E.C.** y Murphy P.A. 1993. Detection of Fumonisin B1, B2, B3 and hidrolized Fumonisin B1 in corn containing foods. J. Agric. Food Chem. 41 :1655-1658.
17. **HARRISON L.R.**, Colvin B.M., Greene J.T., Newman L.E. y Cole J.R. 1990. Pulmonary edema and hidrotorax in swine produced by fumonisin B1, a toxic metabolite of *Fusarium moniliforme*. J. Vet. Diagn. Invest. 2 :217-221.
18. **MARIJANOVIC D.R.**, Holt P., Norred W.P., Bacon C.W., Voss K.A., Stancel P.C. y Ragland P. 1991. Inmunosuppressive effects of *Fusarium moniliforme* corn cultures in chickens. Poultry Sci. 70 :1895-1901.

19. **MURPHY P.A.**, Rice L.G. y Ross F. 1993. Fumonisin B1, B2 y B3 content of Iowa, Wisconsin and Illinois corn and corn screenings. *J. Agric. Food Chem.* 41 :263-266.
20. **NELSON P.E.**, Dignani M.C. y Anaissie E.J. 1994. Taxonomy, Biology and Clinical Aspects of *Fusarium* Species. *Clin. Microbiol. Rev.* 7(4) :479-504.
21. **NELSON P.E.**, Plattner R.D., Shackelford D.D. y Desjardins A.E. 1992. Fumonisin B1 production by *Fusarium* species other than *Fusarium moniliforme* in section *Liseola* and by some related species. *Appl. Environ. Microbiol.* 58(3) :984-989.
22. **NORRED W.P.** y Voss K.A. 1994. Toxicity and role of fumonisins in animal diseases and human esophageal cancer. *J. Food Prot.* 57(6) :522-527.
23. **OSWEILER G.D.**, Ross P.F., Wilson T.M., Nelson P.E., Witte S.T., Carson T.L., Rice L.G. y Nelson H.A. 1992. Characterization of an epizootic of pulmonary edema in swine associated with Fumonisin in corn screening. *J. Vet. Diagn. Invest.* 4 :53-59.
24. **PALOMINO H.J.** 1992. Protección Alimentaria y Actividades de Salud Pública Veterinaria. Oficina Internacional de Epizootias. *REVUE.* 11(1) :169-188.
25. **PITTET A.**, Parisod v. y Schellenberg M. 1992. Occurrence of Fumonisin B1 and B2 in corn based products from the swiss market. *J. Agric. Food Chem.* 40 :1352-1354.
26. **RICE G.L.** and Frank P.R. 1994. Methods for Detection and Quantitation of Fumonisin in corn, cereal products and animal excreta. *J. Food Prot.* 5 (6) :536-540.
27. **RILEY R.T.**, Hinton D.M., Chamberlain W.J., Bacon C.W., Wang E., Merrill A.H. y Voss K.A. 1994. Dietary Fumonisin B1 induces disruption of sphingolipid metabolism in Sprague Dawley rats: A new mechanism of nephrotoxicity. *J. Nutr.* 124 :594-603.

28. **RILEY R.T.**, Voss K.A. Soo Yool H., Gelderblom W.C.A. y Merrill A.H. 1994. Mechanism of Fumonisin toxicity and carcinogenesis. *J.Food Prot.* 57(6) :528-535.
29. **RODRIGUEZ S.R.S.** 1994. Estudio Preliminar de Correlaciones entre : Desarrollo de colonias de *Fusarium moniliforme* In-vitro, escala visual del daño de mazorca y contenido de Fumonisininas en el cultivo de maíz (*Zea mays* L.) Tesis de Licenciatura de Ingeniero Agrícola. U.A.G.
30. **ROSS P.F.**, Nelson P.E., Richard J.L., Osweiler G.D., Rice L.G., Plattener R.D. y Wilson T.M. 1990. Production of Fumonisin by *Fusarium moniliforme* isolates associated with equine leucoencephalomalacia and pulmonary edema syndrome in swine. *Appl. Environ. Microbiol.* 56 :3225-3226.
31. **ROTHINGHAUS E.G.**, Coathey E.C., Minor C.H. 1992. A rapid sensitive thin layer chromatography procedure for detection of Fumonisin B1 and B2. *J. Vet. Diagn. Invest.* 40 :326-329.
32. **SALA N.**, Sanchis V., Vilaro P., Viladricha R., Torres Ma. Viñas I. y Canela R. 1994. Fumonisin producing capacity of *Fusarium* Strains isolated from cereals in Spain. *J. Food Prot.* 10 :915-917.
33. **SCHROEDER J.J.**, Crane H.M., Xia J., Liotta D.C. y Merrill A.M. 1994. Disruption of sphingolipid metabolism and stimulation of DNA synthesis by fumonisin B1. *J. Biol. Chem.* 269(5) :3475-3481.
34. **SCOTT P.M.** 1993. Fumonisin Mini-review International. *J. Food Microbiol.* 18 :257-270.
35. **SYNDENHAM E.W.**, Gelderblom W.C.A., Thiel P.G. y Marasas W.F.O. 1990. Evidence for the natural occurrence of fumonisin B1, a mycotoxin produced by *Fusarium moniliforme* in corn. *J. Agric. Food Chem.* 38(1) :285-290.
36. **SYNDENHAM E.W.**, Marasas W.F.O., Shephard G.S., Thiel P.G. y Hirooka E.Y. 1992. Fumonisin concentrations in Brazilian feeds associated with field outbreaks of confirmed and suspected animal mycotoxicoses. *J. Agric. Food Chem.* 40 :994-997.

37. **SYNDENHAM E.W.**, Shephard G.S., Thiel P.G., Marasas W. F.O. y Stockenstrom S. 1991. Fumonisin contamination of commercial corn-based human foodstuffs. *J. Agric. Food Chem.* 39 :2014-2018.
38. **SYNDENHAM E.W.**, Shephard S.G. y Thiel G.P. 1992. Liquid Chromatographic determination of Fumonisin B1, B2 and B3 in foods and feeds. *J. AOAC International.* 2 :313-318.
39. **SYNDENHAM E.W.**, Shephard G.S., Thiel P.G., Marasas W. F.O. y Koch K.R. 1990. Natural occurrence of some *Fusarium* mycotoxins in corn from low and high esophageal cancer prevalence areas of the Transkei Southern Africa. *J. Agric. Food Chem.* 38 :1900-1903.
40. **TEJEDA M.V.**, Marovatsanga L.T. y Pestka J.J. 1994. Comparative detection of fumonisin by HPLC, Elisa and Immunocyto-Chemical localization in *Fusarium* cultures. *J. Food Prot.* 6 :666-672.
41. **THIEL P.G.**, Marasas W.F.O., Sydenham E.W., Shephard G.S., Gelderblom W.C.A. y Nievwenhuis J.J. 1991. Survey of fumonisin production by *Fusarium* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 57(4):1089-1093.
42. **THIEL P.G.**, Marasas W.F.O., Sydenham E.W. 1992. The implications of naturally occurring levels of fumonisins in corn for human and animal health. *Mycophatologia.* 117 :3-9.
43. **THIEL P.G.**, Sydenham E.W., Shephard G.S., Marasas W.F.O., Nelson P.E. y Wilson T.M. 1991. Levels of fumonisins B1 and B2 in feeds associated with confirmed cases of equine leucoencephalomalacia. *J. Agric Food Chem.* 39 :109-111.
44. **VOSS K.A.** Norred W.P. y Bacon C.W. 1992. Subchronic toxicological investigations of *Fusarium moniliforme*- contaminated corn, culture material and ammoniated culture material. *Mycophatologia.* 117 :97-104.
45. **WANG E.**, Ross P.F., Wilson T.M., Riley R.T. y Merrill A.H. 1992. Increases in serum sphingosine and sphinganina and decreases in complex

sphingolipids in ponies given feed containing fumonisins, mycotoxins produced by *Fusarium moniliforme*. J. Nutr. 122 :1706-1716.

46. **WEIBKING T.S.**, Ledoux D.R., Bermudez A.J., Turk J.R. y Rottinghaw G.E. 1993. Effects of feeding *Fusarium moniliforme* culture material, containing known levels of fumonisins B1 on the young broiler chick. Poultry Sci. 72 :456-466.

47. **WOLF D.D.P.** 1994. Mechanism of mitogenic action of fumonisin B1, a mycotoxin. Nutr. Rev. 52(7) :246-247.

48. **YOSHIZAWA T.**, Yamashita A. y Luo Y. 1994. Fumonisin occurrence in corn from high and low risk areas for human esophageal cancer in China. Appl. Environ. Microbiol. 60(5) :1626-162