

# **UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**

---

**CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS  
DIVISION DE CIENCIAS VETERINARIAS  
POSGRADO INTERINSTITUCIONAL EN CIENCIAS PECUARIAS**



**“ DETECCIÓN DEL HONGO *Fusarium verticillioides* Y DE FUMONISINAS EN MAÍZ Y EFECTO DE LA NIXTAMALIZACIÓN SOBRE LA PRODUCCIÓN DE SUS HIDROLIZADOS ”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
DOCTOR EN CIENCIAS**

**PRESENTA:  
WALDINA PATRICIA REYES VELÁZQUEZ**

**DIRECTORA: DRA. MAGDA CARVAJAL MORENO  
ASESORES: DRA. IRMA TEJADA DE HERNÁNDEZ  
DR. RICARDO GARCÍA LOZANO**

Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jal.

Diciembre 2001



# UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS  
DIVISIÓN DE CIENCIAS VETERINARIAS  
COORDINACIÓN DE POSGRADO

COORDINACIÓN DE POSGRADO DE LA  
DIVISIÓN DE CIENCIAS VETERINARIAS  
DE LA UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA  
PRESENTE.

Por éste conducto nos permitimos enviar la **VERSION FINAL DE LA TESIS** que desarrolló la pasante de Doctorado en el Posgrado Interinstitucional en Ciencias Pecuarias de la Universidad de Guadalajara, **M en C. Waldina Patricia Reyes Velázquez**, cuyo título es:

**"Detección del hongo *Fusarium verticillioides* y de fumonisinas en maíz y efecto de la nixtamalización sobre la producción de sus hidrolizados"**

Trabajo dirigido por: **Dra. Magda Carvajal Moreno**

Los que suscriben la presente avalan esta versión, la cual fue revisada y reúne los requisitos teóricos y metodológicos necesarios.

ATENTAMENTE

Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jal. a 18 Octubre del 2001



REVISOR

Dr. Teodilo Quezada Tristán



REVISOR

Dr. Agustín Ramírez Álvarez




REVISOR

Dr. Efraín Pérez Torres



REVISOR

Dr. Jacinto Bañuelos Pineda



REVISOR

Dra. Esther Albarrán Rodríguez

c.c.p. Archivo

# CONTENIDO

	Página
Agradecimientos .....	i
Abreviaturas .....	iii
Lista de Tablas .....	iv
Lista de Figuras .....	vi
Lista de Anexos .....	viii
Resumen .....	ix
I. INTRODUCCION .....	1
II. ANTECEDENTES .....	3
1. El cultivo del maíz y su utilización .....	3
2. Contaminación fúngica del maíz .....	4
3. Taxonomía y morfología de <i>Fusarium verticillioides</i> .....	5
3.1. Taxonomía .....	5
3.2. Morfología .....	5
a. Fase asexual (anamorfo) .....	5
b. Fase sexual (teleomorfo) .....	6
c. Características y pigmentación de las colonias .....	6
3.3. Ocurrencia y patogenicidad en plantas .....	7
3.4. Ciclo biológico de <i>F. verticillioides</i> .....	8
4. Enfermedad "Germinación prematura del maíz" .....	9
4.1. Sintomatología .....	10
4.2. Epifitiología y control .....	10
5. Enfermedad "Putrefacción de la mazorca" .....	10
5.1. Sintomatología .....	11
5.2. Epifitiología y control .....	11
6. Control y prevención de <i>F. verticillioides</i> .....	12

	Página
7. Producción de micotoxinas por <i>Fusarium verticillioides</i> .....	14
a. Moniliformina .....	14
b. Fusarinas .....	14
c. Fumonisinias .....	15
7.1. Producción de fumonisinias en campo y almacén .....	16
7.2. Producción de fumonisinias en el laboratorio .....	18
8. Enfermedades asociadas con <i>F. verticillioides</i> y fumonisinias .....	21
8.1. Leucoencefalomalacia equina (LEME) .....	21
8.2. Edema pulmonar porcino (EPP) .....	23
8.3. Toxicidad en pollos de engorda .....	23
8.4. Hepatosis y nefrotoxicidad en roedores .....	24
8.5. Cáncer esofágico humano .....	25
9. Mecanismo de acción de las fumonisinias .....	27
9.1. Alteración del metabolismo de esfingolípidos .....	28
a. Evidencias <i>in vitro</i> .....	28
b. Evidencias <i>in vivo</i> .....	32
9.2. Revisión del papel regulatorio de los esfingolípidos .....	33
9.3. Posibles mecanismos de las fumonisinias como inductores de cáncer .....	34
10. Incidencia de <i>Fusarium verticillioides</i> y fumonisinias en maíz ...	35
10.1. Fumonisinias en el maíz y sus productos. ....	37
11. Efecto de los procesos sobre la estabilidad de las fumonisinias ..	39
11.1. Proceso de nixtamalización .....	41
12. Metodología analítica para la detección de fumonisinias .....	42
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	45
IV. JUSTIFICACIÓN .....	46

	Página
V. HIPÓTESIS .....	47
VI. OBJETIVOS .....	48
VII. MATERIALES Y MÉTODOS .....	49
7.1. Detección de <i>F. verticillioides</i> y fumonisinas en Huejotitán y Ameca, Jalisco .....	49
7.1.1. Muestreo .....	49
7.1.2. Aislamiento e identificación de <i>F. verticillioides</i> .....	52
7.1.3. Cuantificación de fumonisinas en maíz de campo .....	54
7.2. Producción de fumonisinas por cepas de <i>F. verticillioides</i> .....	56
7.2.1. Extracción y limpieza de las muestras .....	56
7.2.2. Cuantificación de fumonisinas por cromatografía de capa fina .....	57
7.2.3. Cuantificación de fumonisinas producidas en laboratorio .....	57
7.3. Detección de fumonisinas en masa y tortillas en la zona metropolitana de Guadalajara, Jalisco .....	59
7.3.1. Cuantificación de fumonisinas en masa y tortillas .....	59
7.4. Estudio del proceso de nixtamalización y elaboración de Tortilla .....	60
7.4.1. Muestreo .....	60
7.5. Evaluación de la producción de hidrolizados de fumonisinas ..	63
7.5.1. Muestreo .....	63
7.5.2. Extracción y análisis .....	64
7.5.3. Preparación de los derivatizantes, estándares e hidrolizados .....	64
7.5.4. Cuantificación de FB <sub>1</sub> , FB <sub>2</sub> , HFB <sub>1</sub> e HFB <sub>2</sub> .....	65
7.6. Análisis estadístico .....	66

	Página
VIII. RESULTADOS .....	67
8.1. <i>F. verticillioides</i> en el maíz de Huejotitán, Jalisco.....	67
8.2. <i>F. verticillioides</i> en el maíz de Ameca, Jalisco .....	70
8.3. Fumonisinias presentes en el maíz de Huejotitán y Ameca, Jalisco. ....	71
8.4. Capacidad productiva de fumonisinas .....	76
8.5. Contaminación de fumonisinas en masa y tortillas en la zona metropolitana de Guadalajara (ZMG) .....	76
8.6. Estudio del proceso de nixtamalización y elaboración de la tortilla sobre los niveles de fumonisinas .....	78
8.6.1. Detección de Fumonisinias .....	80
8.7. Efecto de la nixtamalización sobre los niveles de FB <sub>1</sub> , FB <sub>2</sub> y sus hidrolizados .....	83
IX. DISCUSIÓN .....	89
9.1. Contaminación por <i>F. verticillioides</i> y fumonisinas en maíz .....	89
9.2. Capacidad productiva de fumonisinas por <i>F. verticillioides</i> .....	92
9.3. Efecto del proceso de nixtamalización sobre la contaminación de fumonisinas .....	94
9.4. Efecto de la nixtamalización sobre los niveles de FB <sub>1</sub> , FB <sub>2</sub> Y sus hidrolizados .....	95
X. CONCLUSIONES .....	101
XI. BIBLIOGRAFIA .....	102

## AGRADECIMIENTOS

### A las personas:

Dra. Magda Carvajal Moreno, Directora de tesis; por su participación en la dirección, desarrollo y culminación de la investigación; por sus aportaciones en la metodología analítica para HPLC, durante la revisión de la tesis y por brindarme su confianza y motivación constantes para realizar esta etapa en mi formación académica.

Dra. Irma Tejada de Hernández, Asesora de Tesis; por su valiosa colaboración en el desarrollo de la tesis; por su invaluable apoyo y amistad.

Dr. Ricardo García Lozano, Asesor de Tesis; por su colaboración en el desarrollo de la investigación.

Dr. Agustín Ramírez Álvarez, Jefe del Departamento de Salud Pública, CUCBA, Universidad de Guadalajara; por su valioso apoyo durante todo el desarrollo de la tesis.

M.C. Ricardo Nuño Romero, por su apoyo en el análisis estadístico de los datos obtenidos en el campo y en el laboratorio.

M.C. Francisco Rojo Callejas, por su ayuda durante el análisis químico para la detección y cuantificación de las micotoxinas.

Dr. Teódulo Quezada, Dra. Esther Albarrán Rodríguez, Dr. Jacinto Bañuelos Pineda, Dr. Agustín Ramírez Álvarez y Dr. Efraín Pérez Torres; por su disponibilidad para formar parte de mi Jurado y por sus aportaciones durante la revisión de la tesis.

M.C. José Sánchez Martínez y M.C. Luis Arellano Rodríguez; por su apoyo y facilidades para la obtención de muestras de maíz de las variedades UDG-600, UDG-601 y UDG-602.

M.C. Patricia Landeros Ramírez, M.C. Cecilia Jiménez Plasencia, M.V.Z. Arlette Verónica Alcaraz, M.V.Z. Juan Antonio Ruelas Mendoza, M.V.Z. Claudia Udave Fonseca, M.V.Z. Jesús Díaz Morales, M.V.Z. Xochilt Castro Sotelo, colaboradores en el desarrollo experimental de la investigación.

**A las Instituciones:**

Al Posgrado Interinstitucional en Ciencias Pecuarias, por su apoyo y facilidades para llevar a cabo mi Programa de Estudios de Doctorado.

Al CONACYT, Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por otorgarme la beca de Doctorado que hizo posible la realización de mi tesis. Número de registro 70743, período 1995 – 2000.

A PROMEP, SEP, Programa de Mejoramiento para el Profesor, Secretaría de Educación Pública, por otorgarme beca para titulación. Número de acuerdo UDG 2000-14-01, período de Enero a Diciembre del 2001.

Al Departamento de Botánica del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, por su apoyo con instalaciones, equipo y material para realizar los experimentos de laboratorio.

Al área de Micotoxicología del Departamento de Salud Pública, CUCBA, Universidad de Guadalajara, por su apoyo con instalaciones, equipo y material para realizar los experimentos de laboratorio.

Al CIPRO, Centro de Investigaciones en Producción de Semillas del Departamento de Producción Agrícola, CUCBA, Universidad de Guadalajara, por su colaboración durante el muestreo en campo.



## ABREVIATURAS

AAL	<i>Alternaria alternata Lycopersi</i>
ANOVA	Análisis de varianza
AP <sub>1</sub> = HFB <sub>1</sub>	Aminopentol <sub>1</sub> = hidrolizado de fumonisina B <sub>1</sub>
AP <sub>2</sub> = HFB <sub>2</sub>	Aminopentol <sub>2</sub> = hidrolizado de fumonisina B <sub>2</sub>
Ca(OH) <sub>2</sub>	Hidróxido de calcio
CNIMT	Cámara Nacional de la Industria de la Masa y Tortilla
Co-A	Coenzima A
CUCBA	Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias
ELISA	Técnica de ensayo inmunoabsorbente con enzima Ligada (Enzimatic link immunoabsorbent análisis)
EPP	Edema pulmonar porcino
FAO	Organización para la Agricultura y Alimentación (Food and Agriculture Organization)
FB <sub>1</sub>	Fumonisina B <sub>1</sub>
FB <sub>2</sub>	Fumonisina B <sub>2</sub>
FB <sub>3</sub>	Fumonisina B <sub>3</sub>
FDA	Administración de Medicamentos y Alimentos (Food and Drugs Administration)
g	gramo
IC <sub>50</sub>	Concentración inhibitoria para el 50% de los animales
LEME	Leucoencefalomalacia equina
M	Molar
MCE	Mercaptoetanol
min	minuto
mL	mililitro
msnm	metros sobre el nivel del mar
µg/g	microgramo por gramo
µL	microlitro
µm	micrómetro
N	Normal
n	número de muestras
NOEL	Nivel de efectos no observados
OPA	Ophthaldialdehido
PBS	Solución buffer de fosfatos
P.M	Peso molecular
rpm	revoluciones por minuto
s	Desviación estándar
UFC g <sup>-1</sup>	unidades formadoras de colonias por gramo de muestra
UDG	Universidad de Guadalajara
TDI	Consumo diario tolerable
W	oeste
ZMG	Zona metropolitana de Guadalajara

## LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Tipos de Fumonisinias (Musser y Plattner, 1997) .....	16
2. Producción de fumonisinina B <sub>1</sub> de diferentes orígenes y cepas de cepas de <i>Fusarium verticillioides</i> (Bacon y Nelson, 1994) .....	20
3. Conteo de <i>Fusarium</i> en el maíz y en diferentes presentaciones (Katta, 1994) .....	36
4. Niveles de fumonisinias en harina comercial (Sydenham <i>et al.</i> , 1991) .	38
5. Efecto de la temperatura sobre fumonisinias en harina de maíz (Scott y Lawrence, 1992) .....	40
6. Clasificación del las mazorcas y unidades formadoras de colonias por gramo (UFCg <sup>-1</sup> ) y <i>F. verticillioides</i> en Huejotitán, Jalisco .....	67
7. Clasificación del daño visual de las mazorcas en las variedades de maíz UDG 600, 601 y 602 en Ameca, Jalisco (% de muestras) ....	70
8. Desarrollo de unidades formadoras de colonias por gramo (UFCg <sup>-1</sup> ) de maíz en las variedades UDG 600, 601 y 602 en Ameca, Jalisco ...	71
9. Relación entre el daño visual de la mazorca, UFCg <sup>-1</sup> y niveles de fumonisinias en maíz cosechado en Huejotitán y Ameca, Jalisco .....	72
10. Capacidad productiva de fumonisinias por cepas de <i>F. verticillioides</i> aisladas en el maíz de Huejotitán, Jalisco. ....	76
11. Niveles de fumonisinias en la masa y tortilla que se expenden en la zona metropolitana de Guadalajara (µg/g) .....	77
12. Porcentaje de reducción de fumonisinias en las tortillas respecto a a la masa de la ZMG .....	78
13. Temperatura y humedad relativa de almacenamiento registradas en los molinos del sector Reforma .....	79
14. Temperatura, tiempo de nixtamalización y de reposo del nixtamal ...	79

Tabla	Página
15. Niveles de fumonisinas en el maíz detectados en los molinos ( $\mu\text{g/g}$ ) .....	81
16. Niveles de fumonisinas detectados en los productos de elaboración de la tortilla ( $\mu\text{g/g}$ ) .....	82
17. Porcentaje de reducción en los niveles de fumonisinas en nixtamal, masa y tortilla respecto al maíz .....	82
18. Detección de $\text{FB}_1$ , $\text{FB}_2$ e $\text{HFB}_1$ ( $\mu\text{g/g}$ ) en maíz y productos de elaboración de la tortilla mediante Cromatografía de líquidos .....	86

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Estructura química de las fumonisinas .....	15
2. Metabolismo de esfingolípidos en células sanas de mamíferos (Riley <i>et al.</i> , 1994 a) .....	29
3. Alteración del metabolismo de esfingolípidos en células sanas de mamíferos expuestas a fumonisinas . ⊗ = Blanco bioquímico primario de inhibición de la esfingonina (esfingosina) N-aciltransferasa (Riley <i>et al.</i> , 1994) .....	31
4. Estructura química del hidrolizado de FB <sub>1</sub> (AP <sub>1</sub> ) .....	42
5. Localización del área de muestreo .....	50
6. Escala de clasificación del daño visual de las mazorcas (Rodríguez, 1994) .....	51
7. Aislamiento e identificación de <i>F. verticillioides</i> (Nelson <i>et al.</i> , 1983) ..	53
8. Determinación de fumonisinas por cromatografía de inmunoafinidad y detección fluorométrica (Ware <i>et al.</i> , 1994) .....	55
9. Producción de fumonisinas por las cepas de <i>F. verticillioides</i> aisladas en Huejotitán, Jalisco .....	58
10. Determinación de fumonisinas por el método de ELISA .....	61
11. Proceso de nixtamalización y elaboración de la tortilla .....	62
12. Evaluación del proceso de nixtamalización y elaboración de la tortilla .	63
13. Cadenas de microconidios típicas de <i>Fusarium verticillioides</i> .....	69
14. Características morfológicas de <i>F. verticillioides</i> .....	69
15. Precipitación y evaporación acumuladas de junio a noviembre de 1997 en Ameca, Jalisco .....	74

Figura	Página
16. Temperaturas máximas y mínimas registradas de junio a noviembre de 1997 en Ameca, Jalisco .....	74
17. Precipitación y evaporación acumuladas de junio a noviembre de 1996 en Huejotitán, Jalisco .....	75
18. Temperaturas máximas y mínimas registradas de junio a noviembre de 1996 en Huejotitán, Jalisco .....	75
19. Niveles promedio de fumonisinas presentes en masa y tortilla Detectados en la ZMG .....	77
20. Curva de calibración de la fumonisina B <sub>1</sub> .....	83
21. Curva de calibración de la fumonisina B <sub>2</sub> .....	84
22. Curva de calibración del hidrolizado de fumonisina B <sub>1</sub> .....	84
23. Curva de calibración del hidrolizado de fumonisina B <sub>2</sub> .....	84
24. Cromatogramas de los estándares de FB <sub>1</sub> , FB <sub>2</sub> , HFB <sub>1</sub> e HFB <sub>2</sub> .....	87
25. Detección de los picos cromatográficos de FB <sub>1</sub> e HFB <sub>1</sub> en muestra de tortilla .....	88

## LISTA DE ANEXOS

Anexo		Página
1.	Análisis estadístico de UFC en las variedades de maíz UDG-600, UDG-601 y UDG-602 de Ameca, Jalisco . . . . .	116
2.	Análisis estadístico de fumonisinas en las variedades de maíz UDG-600, UDG-601 y UDG-602 de Ameca, Jalisco . . . . .	117
3.	Análisis estadístico de UFC en Huejotitán, municipio de Jocotepec, Jalisco . . . . .	118
4.	Análisis estadístico de UFC en Ameca, Jalisco . . . . .	119
5.	Análisis estadístico de los niveles de fumonisinas en el maíz de Huejotitán, municipio de Jocotepec, Jalisco . . . . .	120
6.	Análisis estadístico de los niveles de fumonisinas en el maíz de Ameca, Jalisco . . . . .	121
7.	Análisis estadístico de la detección de fumonisinas en maíz de Huejotitán y Ameca, Jalisco . . . . .	122
8.	Análisis estadístico de la detección de fumonisinas en la zona metropolitana de Guadalajara . . . . .	123
9.	Análisis estadístico de fumonisinas de masa y tortilla por sectores en la zona metropolitana de Guadalajara . . . . .	124
10.	Análisis de varianza del efecto del proceso de Nixtamalización (transformación logarítmica) Contrastes ortogonales . . . . .	125
11.	Análisis estadístico de la detección de FB <sub>1</sub> y FB <sub>2</sub> mediante Cromatografía de líquidos . . . . .	126
12.	Análisis estadístico de la detección de HFB <sub>1</sub> mediante Cromatografía de líquidos . . . . .	127

## RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue valorar la incidencia del hongo *Fusarium verticillioides* (*moniliforme*) y los niveles de contaminación por fumonisinas en maíz cosechado en dos localidades del estado de Jalisco y determinar el efecto de la nixtamalización sobre los niveles de fumonisinas durante la elaboración de la tortilla. Bajo un diseño completamente al azar, se realizó el muestreo de mazorcas en Ameca (1997) y Huejotitán (1996), Jalisco, se clasificaron de acuerdo al daño visual y se realizó el aislamiento e identificación de *Fusarium verticillioides*. Se determinó la producción de fumonisinas por las cepas aisladas del hongo. Se cuantificaron los niveles de fumonisinas en el maíz mediante columnas de inmunoafinidad. Se realizó un monitoreo preliminar de los niveles de fumonisinas en masa y tortillas en la ZMG, estudio realizado mediante la técnica de ELISA, posteriormente se valoró el efecto de la nixtamalización sobre los niveles de fumonisinas y sus hidrolizados. La detección de fumonisina B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>), FB<sub>2</sub>, hidrolizado de FB<sub>1</sub> (HFB<sub>1</sub>) y HFB<sub>2</sub> se realizó por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). Se realizó el análisis estadístico mediante ANOVA, contrastes ortogonales,  $\chi^2$  cuadrada y t Student a un nivel de significancia del 0.05. Los resultados mostraron incidencia mayor al 80% por *F. verticillioides* en Huejotitán, y de 90 a 100% en el maíz procedente de Ameca, Jalisco. El desarrollo de unidades formadoras de colonias fluctuó de 1,884.5 a 418,333 UFC g<sup>-1</sup> presentando relación estadística positiva ( $p < 0.05$ ) en Ameca, respecto al daño visual de las mazorcas. De las cepas aisladas el 93.8% fueron productoras de fumonisinas en un rango de 700 a 2,280  $\mu\text{g/g}$ . El 100% de las muestras de maíz mostró contaminación por fumonisinas. Los niveles promedio fueron de 7.87  $\mu\text{g/g}$  en Ameca y de 10.2  $\mu\text{g/g}$  en Huejotitán similares estadísticamente ( $p > 0.05$ ). El proceso de nixtamalización que se realiza en la ZMG se caracteriza por tiempo promedio de cocimiento de 12.5 minutos, temperatura máxima de 85 °C y un periodo de reposo de 18.5 horas. El estudio mediante columnas de inmunoafinidad, mostró reducción significativa ( $p < 0.05$ ) de fumonisinas en los productos de elaboración de la tortilla, los niveles promedio fueron de 5.79  $\mu\text{g/g}$ , 1.47  $\mu\text{g/g}$ , 2.95  $\mu\text{g/g}$  y 1.41  $\mu\text{g/g}$  en maíz, nixtamal, masa y tortilla respectivamente. La detección con HPLC no mostró reducción significativa, los niveles promedio de FB<sub>1</sub> y FB<sub>2</sub> en maíz fueron de 7.257 y 0.143  $\mu\text{g/g}$ , en masa de 6.336 y 0.056  $\mu\text{g/g}$  y en tortilla 4.364  $\mu\text{g/g}$ . Se detectaron hidrolizados de FB<sub>1</sub> en maíz (0.086  $\mu\text{g/g}$ ), masa (0.524  $\mu\text{g/g}$ ) y tortilla (0.874  $\mu\text{g/g}$ ). Se concluye que existe alta contaminación por *Fusarium verticillioides* de alta capacidad productora de fumonisinas; el maíz cosechado en las dos localidades del estado de Jalisco mostró alta contaminación por dichas micotoxinas, se considera que el proceso de nixtamalización no cubre con el tiempo de cocimiento necesario para reducir eficientemente los niveles de fumonisinas, además de generar hidrolizados durante el proceso, lo que indica que existe riesgo de exposición en humanos y animales por el consumo de maíz o sus productos.

## I. INTRODUCCIÓN

La contaminación fúngica en cereales como el maíz representa importantes pérdidas económicas a la producción agrícola, además de causar deterioro del valor nutritivo de los granos por la degradación de las proteínas, grasas, carbohidratos y vitaminas. Entre otras alteraciones se considera de gran relevancia la producción de metabolitos secundarios de los hongos, denominados micotoxinas, las cuales pueden ocasionar daño irreparable a la salud de humanos y animales (Pont *et al.*, 1989).

Dentro de las especies de hongos productores de micotoxinas sobresale *Fusarium verticillioides* (antes *moniliforme*), de distribución mundial, que ha sido aislado principalmente en cereales como el maíz, trigo, sorgo y avena (Marasas *et al.*, 1979). Evidencias experimentales indican que *Fusarium verticillioides* es el agente causal de la "Germinación prematura del maíz" y de la "Pudrición de la mazorca" (Carvajal, 1987; Galindo y Romero, 1982).

Entre las micotoxinas producidas por este hongo se encuentran las fumonisinas, caracterizadas, en 1988, por Bezuidenhout y Gelderblom, las cuales son responsables de la leucoencefalomalacia equina y del edema pulmonar porcino, además de presentar efectos hepatotóxicos y cancerígenos en roedores y aterogénicos en primates no humanos (Marasas *et al.*, 1988; Osweiler *et al.*, 1992; Riley *et al.*, 1993 b). En algunas regiones de Sudáfrica, China, India y Estados Unidos existe estrecha relación entre los niveles de fumonisinas y la alta incidencia de cáncer esofágico humano (Marasas *et al.*, 1981; Norred y Voss, 1994; Sydenham *et al.*, 1990 b).

Existen altos niveles de fumonisinas principalmente en maíz parcialmente molido y harina (Sydenham *et al.*, 1991). Los niveles detectados en diferentes productos derivados del maíz varían de 0 a 3.5 ppm, demostrándose que la incidencia de fumonisinas es a nivel mundial (Bullerman y Tsai, 1994).



En la actualidad existe escasa información respecto al efecto de los procesos sobre la estabilidad de las fumonisinas, dichos estudios han sido limitados por la reducida eficiencia de la metodología analítica, la cual fue diseñada para la detección de fumonisinas a partir de granos (Bordson *et al.*, 1993).

Sydenham *et al.* (1992b, 1995) demostraron que el proceso de nixtamalización produce hidrólisis en la estructura de la fumonisina al involucrar la pérdida de 2 moléculas de propano-1,2,3-ácido tricarbóxico, lo que ocasiona la formación del aminopentol (AP) o hidrolizado de fumonisina (HFB). Abbas *et al.* (1993) encontraron que los productos hidrolizados de FB<sub>1</sub> y FB<sub>2</sub> (AP<sub>1</sub> y AP<sub>2</sub>) fueron más tóxicos en cultivos celulares que las toxinas originales, sin embargo en otros estudios el AP<sub>1</sub> no fue iniciador de cáncer en el hígado de ratas, lo que pudo deberse a la escasa absorción de los compuestos, mientras que la FB<sub>1</sub> y FB<sub>2</sub> lo fueron (Gelderblom *et al.*, 1993).

En una investigación realizada al noreste de la república mexicana (Estado de Nuevo León) se aislaron cepas de *Fusarium verticillioides* con alta capacidad productiva de fumonisinas (Desjardins *et al.*, 1994), lo que sugiere que existe alta contaminación de fumonisinas en maíz y sus productos. Sin embargo, en México se tienen pocos estudios sobre los niveles de contaminación de fumonisinas en maíz o en sus productos, así como del efecto de los procesos a los que se somete este cereal, siendo de gran importancia el proceso de nixtamalización para la elaboración de la tortilla, alimento base de la población. Por lo anteriormente señalado, el presente estudio pretende determinar el nivel de contaminación por *F. verticillioides* y fumonisinas en algunas localidades del estado de Jalisco, el cual ocupa un importante lugar en la producción de maíz a nivel nacional, así como estudiar el efecto del proceso de nixtamalización sobre los niveles de fumonisinas y la producción de hidrolizados.

## II. ANTECEDENTES

### 1. El cultivo de maíz y su utilización.

El maíz (*Zea mays L.*) a nivel mundial representa el 5.4% del total de las fuentes alimenticias de la población humana, y ocupa el tercer lugar después del trigo y del arroz. En México cubre el 51 % del área agrícola, ocupando Jalisco de los primeros lugares en producción nacional con 2'052 728 (González, 1995).

El consumo *per capita* de maíz se calcula en 300 g/día, que aportan el 56 % de las calorías y el 47 % de las proteínas de la alimentación. En las áreas rurales estos porcentajes son 70 % y 56 %, respectivamente (Jugenheimer, 1981).

Del maíz total utilizado en el país, el 72 % se consume como tortillas, 4.7 % es procesado por la industria almidonera y 23.3 % se destina a otros usos como semillas, alimento animal y consumo por parte del agricultor (Bartolini, 1990).

El método tradicional para transformar el maíz en tortillas consiste en un proceso térmico-alcálico, denominado "nixtamalización", que involucra la ebullición del maíz completo en agua con  $\text{Ca(OH)}_2$  al 1 %, durante un periodo que fluctúa de 10 minutos a 1 hora y posterior reposo de 16 horas a temperatura ambiente. El líquido de cocimiento se elimina y el grano cocido (nixtamal) se lava para remover el pericarpio y el exceso de calcio. El nixtamal se muele para producir masa, la cual es cocida al horno para la elaboración de la tortilla (Barragán, 1996).

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 con una producción de 11 millones de toneladas anuales (Figuroa *et al.*, 1997).

## 2. Contaminación fúngica del maíz.

El almacenamiento de granos en países con climas tropicales y subtropicales ocasiona con frecuencia pérdida de peso del grano, transformaciones químicas y contaminación con toxinas, microorganismos, fragmentos de insectos, orina y excretas de roedores. La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) estima una pérdida entre 5 y 10 % en los granos alimenticios cosechados, en América Latina las pérdidas varían de 25 a 50 %. Una de las funciones principales de la Agencia de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA = Food and Drug Administration) es la sanidad de los alimentos durante su manufactura, proceso y almacenamiento, por lo que se establecen medidas que determinen la contaminación por insectos roedores, pájaros; adulteraciones por partículas extrañas; u otras alteraciones que puedan ser nocivas al consumidor (Bartolini, 1990).

En el cultivo de maíz la contaminación por hongos requiere de altos contenidos de humedad (20 a 21 %), los cuales invaden y atacan a los granos antes de la cosecha afectando su apariencia y calidad (roña, manchas, decoloración). Los géneros de hongos frecuentes en el maíz son *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Helminthosporium*, *Penicillium* y *Fusarium*, considerándose este último tanto de campo como de almacén (González, 1995; Moreno, 1988).

Los principales daños ocasionados en el maíz por la invasión fúngica son alteraciones físicas y organolépticas, como son el apelmazamiento de los granos y la producción de malos olores y sabores, que disminuyen la calidad del alimento; deterioro del valor nutritivo por la degradación de proteínas, grasas, carbohidratos y vitaminas; aumento de temperatura y humedad por efecto del metabolismo de los hongos; producción de metano y otros gases inflamables, los cuales pueden ocasionar explosiones e incendios en el almacén, además de la producción de

metabolitos secundarios tóxicos, micotoxinas, que pueden ocasionar daño irreparable en animales y humanos (Pont *et al.*, 1989).

Dentro de las especies del género *Fusarium* de mayor interés en las investigaciones actuales, se encuentra *F. verticillioides*, que pertenece a la Sección Liseola y es considerado un hongo de distribución mundial (Riley *et al.*, 1993 b).

### **3. Taxonomía y morfología de *Fusarium verticillioides*.**

#### **3.1 Taxonomía.**

*Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg (anamorfo) fase asexual, pertenece al Reino Fungi, División Eumycota, Subdivisión Deuteromycotina, Clase Hyphomycetes, Orden Moniliales, Familia Tuberculariaceae. Mientras que la fase sexual es *Gibberella fujikuroi* Sawada (teleomorfo), se ubica en la Subdivisión Ascomycotina, Clase Euascomycetes, Subclase Pyrenomycetidae, Orden Hypocreales, Familia Hypocreaceae (Herrera y Ulloa, 1990). La taxonomía de *Fusarium* es compleja y confusa ya que se aplican diversos sistemas taxonómicos. El sistema propuesto por Nelson *et al.* (1983) establecen 12 secciones, entre las que se encuentra la sección Liseola, a la cual pertenece *F. verticillioides*.

El estado peritecial de este hongo consiste en un complejo de 6 diferentes especies o poblaciones biológicas designadas con las letras A a la F, miembros de las poblaciones A y F pertenecen a *Fusarium verticillioides*, las poblaciones B y E a *F. subglutinans* y la población D a *F. proliferatum* (Nelson *et al.*, 1994).

#### **3.2 Morfología**

##### **a. Fase asexual (anamorfo).**

*F. verticillioides* (Sacc.) Nirenberg forma conidióforos en hifas aéreas; éstos presentan una célula basal simple con 2 a 3 fiálides apicales laterales simples;

miden de 20-30  $\mu\text{m}$  de longitud, 2-3  $\mu\text{m}$  de ancho en la base y 1.5  $\mu\text{m}$  en el ápice. Los microconidios se forman agrupados en cabezas falsas sobre monofiálides y en cadenas basípetas originadas de conidióforos ramificados o en fiálides individuales. Son fusiformes, ovoides, elipsoidales o clavados, con la base ligeramente aplanada, usualmente mononucleares, miden de 1.5-3.5 x 5-12  $\mu\text{m}$ .

Los macroconidios se desarrollan de fiálides en hifas laterales; a veces son escasos. En medio de cultivo hojas de clavel-agar (HCA), se producen masas abundantes en esporodoquios anaranjado-pálidos. Son alargados, delgados defalcados a casi rectos, con 3 a 7 septos; miden de 2.5-4 x 25-60  $\mu\text{m}$ , y su pared es delgada. La célula apical es ligeramente curvada y ahusada en el extremo, y la célula basal tiene forma de pie. Esta especie se distingue por las cadenas largas de microconidios producidos por monofiálides individuales y la ausencia de clamidosporas (Booth, 1971; Burgess y Liddell, 1983; Nelson *et al.*, 1983).

**b. Fase sexual (teleomorfo).**

*Gibberella fujikuroi* produce peritecios individuales o en grupos, superficiales o sumergidos en el substrato, de globosos a subcónicos, azul-oscuros, ostiolados, de 220-300 x 250-375  $\mu\text{m}$ . Las ascas son rectas, elipsoidales a clavadas, con 4-8 ascosporas hialinas, de helipsoidales a fusiformes, con 1-3 septos, con sus extremos redondeados, con estrechamiento en los septos y dispuestas oblicuamente en 1 ó 2 series en el asca. Las masas de ascosporas son de color ocre-asalmonado; miden de 3.9-6 x 14-19  $\mu\text{m}$  (Nelson *et al.*, 1983).

**c. Características y pigmentación de las colonias.**

En medio de cultivo agar papa dextrosa (PDA) el hongo forma micelio blanco, de crecimiento rápido. Al madurar la colonia produce pigmentaciones que fluctúan de anaranjado-violeta a violeta-oscuro, pálido, lila, vináceo, crema o

magenta-oscuro, de acuerdo con el código de colores propuesto por Nelson *et al.* (1983). Algunos cultivos carecen de coloración. El micelio aéreo es denso, varía de velludo a afieltrado, de aspecto pulverulento por la formación de microconidios. Los esporodoquios están normalmente ausentes, cuando se presentan son de color anaranjado pálido a bronceado y están confluentes (Booth, 1971; Burgess y Liddell, 1983; Nelson *et al.*, 1983).

### 3.3 Ocurrencia y patogenicidad en plantas.

*Fusarium verticillioides* es un hongo de distribución mundial, presente tanto en zonas de clima templado húmedo y subhúmedo como en zonas tropicales y subtropicales. Se ha encontrado en Alemania, América central, Argentina, Australia, Brasil, Canadá, sur de China, Egipto, Estados Unidos, Filipinas, Hong Kong, India, Indonesia, Israel, Italia, Jamaica, Japón, Libia, México, Nepal, Nigeria, Nueva Zelanda, Perú, Sudáfrica, Taiwan, Turquía y Zimbabwe. Aunque se encuentra raramente en zonas de temperatura fría, se ha reportado en Rusia e Islandia (Marasas *et al.*, 1979; Miller, 1993; Nelson *et al.*, 1991; Sydenham *et al.*, 1992a).

Además de presentarse este hongo en el maíz, es común aislarlo de diversos cereales, incluyendo el trigo, arroz, sorgo y avena. También se presenta con menor frecuencia en otros alimentos como el frijol, cacahuate, plátano, pepino, soya, caña de azúcar y remolacha y productos no alimenticios como algodón y lino (Flood *et al.*, 1990; Leslie *et al.*, 1992). Se ha aislado también de forrajes como el pasto *Panicum coloratum* (Eiker, 1976), alfalfa y trébol rojo (Nelson *et al.*, 1991). Este hongo puede descomponer la madera, algodón, papel filtro y puede oxidar hidrocarburos y herbicidas. *F. verticillioides* se ha aislado ocasionalmente de varios tipos de agua como los estanques de estabilización de aguas negras y alcantarillados (Cooke, 1962). En Estados Unidos y Canadá se ha obtenido a partir de queratitis micóticas y de varios tipos de cáncer en pacientes humanos (Nelson *et al.*, 1991).

### 3.4 Ciclo biológico de *F. verticillioides*.

El hongo vive en estado latente en los residuos de cosecha, en el suelo y como micelio en el tejido interno de la semilla de maíz (Burgess y Liddell, 1983). Los peritecios se forman a principios de otoño y liberan las ascosporas que son diseminadas e inician la infección primaria. En los períodos de clima húmedo y cálido, sobre las lesiones de las plantas afectadas se forman abundantes macro y microconidios que son transportados por el viento y actúan como inóculo secundario (Holliday, 1989).

La presentación de *F. verticillioides* en el maíz es de forma endofita y permanece en la planta asintóticamente, expresión relacionada con la naturaleza genética del hongo, cultivo del maíz y condiciones ambientales. El hongo puede localizarse por debajo del tejido vascular de cada semilla, desde su punta hasta donde se implanta en la mazorca, con escasas hifas en semillas sanas, sin embargo bajo condiciones inadecuadas de almacenamiento puede iniciarse una invasión mayor. También se encuentra en rastrojo del maíz, especialmente en tallo y mazorca, donde sobrevive en el suelo (Nelson, 1992a).

Estudios de laboratorio indican que *F. verticillioides* puede permanecer viable en la semilla del maíz hasta por 8 años, debido a su localización sistémica lo que provee condiciones favorables para mantener su virulencia y viabilidad por años. Los macroconidios de sobrevivencia mayor, actúan acarreado al hongo durante las estaciones, mientras que los microconidios, transportados por el viento, funcionan como propágulos de infección secundaria, infectando la planta durante la estación de crecimiento. Se reporta que el hongo permanece en el suelo dentro de tallos enterrados a 30 cm, con humedad de 5 a 35 % , y temperatura de 5 a 10 °C durante 12 meses (Bacon y Nelson, 1994).

Los principales daños causados por *F. verticillioides* en maíz, 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 ser a través de los estilos de la mazorca o por esporas procedentes del viento, resultando 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 (Davis *et al.*, 1989).

Además de la infección local, las semillas contaminadas transmiten sistemáticamente la enfermedad, que se presenta durante o inmediatamente después de la germinación. El hongo entra en la región de la placa cotiledonaria cuando el tallo brota (germinación), o cuando la plúmula emerge del coléoptilo, el hongo crece en el parénquima del tallo. Durante la floración el micelio del hongo ramifica a toda la planta. Se ha encontrado también infección en las raíces primarias (Thomas y Buddenhagen, 1992).

#### **4. Enfermedad "Germinación prematura del maíz".**

Desde la primera mitad de este siglo se han señalado como agentes causales de esta enfermedad a factores: genéticos, ambientales, fisiológicos y fitopatógenos (Galindo y Romero, 1982, Galindo, 1983).

En 1983 se encontraron evidencias experimentales de que *F. verticillioides* es el agente causal de la enfermedad, al reproducirse los síntomas en el laboratorio, invernadero y campo, mediante la inoculación de conidios del hongo en elotes tiernos en estado lechoso-masoso (Galindo y Romero, 1982; Navarrete, 1986; Carvajal, 1987). Esta enfermedad se ha reportado en Estados Unidos, Francia, Venezuela y México (Galindo, 1983), en este último país, ha sido importante en regiones maiceras de clima templado, localizados en los valles altos de Puebla, Tlaxcala y Estado de México, provocando decrementos entre el 25 y 35% del rendimiento de grano (Galindo, 1983; Ortiz-Cereceres, 1983; Márquez, 1985).



#### **4.1 Sintomatología.**

El síntoma característico es la germinación de granos inmaduros (tiernos) en estado lechoso-masoso o en madurez fisiológica, adheridos a las mazorcas cubiertas por brácteas, sobre las plantas cultivadas en campo (Galindo y Romero, 1982). Algunos granos afectados exhiben el embrión de color verde claro cubierto por el epicarpio; mientras que otros originan plántulas verdes vigorosas, que en ocasiones emergen a través de las brácteas que cubren a la mazorca enferma (Galindo y Romero, 1982; Márquez, 1985).

#### **4.2 Epifitiología y control.**

El desarrollo de la enfermedad se favorece por un desequilibrio micronutricional (hierro, manganeso y zinc) en la planta; fechas de siembras tempranas; niveles altos de humedad en el suelo, temperatura de 6-28 °C, humedad relativa alta (> de 75%) y precipitación abundante (> de 30 mm diarios) (Navarrete, 1986).

La aplicación de altas dosis de fertilizante fosforado, la siembra de variedades resistentes en la época recomendada y la destrucción de los residuos de cosecha, son prácticas de cultivo que ayudan a disminuir la incidencia de la "germinación prematura" (Sánchez *et al.*, 1983). La semilla para siembra se puede desinfectar con fungicidas como Benomyl<sup>R</sup>, Bayleton<sup>R</sup> y Zineb<sup>R</sup> (Navarrete, 1986).

### **5. Enfermedad "Pudrición de la mazorca".**

Es la enfermedad más común de la mazorca en todo el mundo especialmente en climas cálidos-húmedos. Se ha reportado principalmente en Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Colombia, Costa Rica, Guatemala, India, México, Nicaragua, Perú, Nigeria, Sudáfrica y Tailandia donde se registraron daños ligeros, moderados y severos de la enfermedad. En territorio mexicano se ha reportado en

los Estados de México, Jalisco, Michoacán, Puebla, Tamaulipas, Tlaxcala, Veracruz y en el Bajío (Cepeda *et al.*, 1994).

### **5.1 Sintomatología.**

El hongo puede atacar desde la siembra hasta la cosecha. Causa marchitez de plántulas y pudriciones de la raíz, tallo y mazorca (Agrios, 1985). La pudrición de la mazorca y el grano son los daños más importantes, ya que disminuyen el rendimiento. Los granos afectados presentan síntomas de pudrición, rayas, ruptura, manchas oscuras del epicarpio, muerte del embrión, arrugamiento y germinación prematura (Agrios, 1985; González *et al.*, 1987). En los granos colonizados se desarrolla un crecimiento algodonoso de color rosado. En postcosecha el hongo invade y contamina severamente al grano que se almacena bajo condiciones de humedad relativa alta y temperatura favorable (Agrios, 1985).

### **5.2 Epifitiología y control.**

La enfermedad causa daños más severos cuando se presentan lluvias fuertes y permanentes, desde la etapa de espigamiento hasta la cosecha; su incidencia se incrementa en las mazorcas que no se encuentran bien cubiertas por las brácteas y que sufren daños por insectos y pájaros. En clima seco y cálido puede causar severas pudriciones de tallo de las plantas próximas a la floración (De León, 1984).

La eliminación de los residuos vegetales coadyuva a disminuir a un mínimo el inóculo de primavera. Además, se debe proteger con fungicida la semilla y sembrar variedades resistentes. Cuando el patógeno se disemina a través de la semilla es difícil eliminarlo con tratamientos físicos o químicos (Daniels, 1983).

## 6. Control y prevención de *F. verticillioides*.

El control de *F. verticillioides* depende de la prevención de la infección y del desarrollo del patógeno en el campo y almacén. Es importante determinar los factores involucrados en la patogenicidad del hongo y en la resistencia del hospedante (Desjardins *et al.*, 1992) con el objeto de establecer las prácticas más apropiadas de control biológico, químico y genético de la enfermedad.

El biocontrol ofrece tres aspectos: el uso de un agente que destruya al hongo, como un predador o un parásito, el uso de un agente que compita por el nicho ecológico, o un agente que secrete una "sustancia" que destruya al hongo toxígeno y/o sus metabolitos. Se han utilizado levaduras, mohos, bacterias, actinomicetos, algas y esporas. El comportamiento de las contaminaciones por *F. verticillioides* es variable debido a que existe heterocigocidad dentro de los cultivos de maíz, además de una variación genética dentro de la especie del hongo y diferencia en las condiciones ambientales. La habilidad de las especies de *Fusarium* para colonizar al maíz y producir micotoxinas sugiere que estas especies son altamente competitivas (Bacon y Nelson, 1994).

El biocontrol se realiza con especies de bacterias productoras de sustancias con actividad fungicida sobre especies de *Fusarium*, se usa el género *Pseudomonas* y otros bacilos. Recientes investigaciones realizadas en Argentina mostraron que la cepa de *Bacillus subtilis* inhibe el crecimiento de *Fusarium verticillioides* en el medio de cultivo. Respecto a la producción de fumonisina B<sub>1</sub>, se redujo 80% y 60% en los niveles de toxina a los 21 y 28 días de inoculación respectivamente (Cavaglieri *et al.*, 1997).

El manejo del cultivo antes y después de la cosecha influye en gran medida en los niveles de contaminación por hongos, sin embargo la carencia de datos en México sobre factores climáticos y de manejo agrícola limita el progreso en esta área (Rodríguez, 1994).

El balance adecuado en la fertilización se realiza con el fin de evitar el estrés de las plantas. La sequía ha sido asociada con el bajo aprovechamiento de nitrógeno por la planta, lo que incrementa el estrés fisiológico y en consecuencia la susceptibilidad a los hongos productores de micotoxinas. La competencia interespecífica en altas densidades de población, por humedad, nutrientes y luz, así como competencia del cultivo con la maleza pueden ser factores predisponentes (Jugenheimer, 1981).

En relación con la cosecha, se recomienda utilizar maquinaria que evite el quebrado del grano y la presencia de residuos del cultivo que contribuyan a la infección con hongos y a la producción de toxinas. Se recomienda secar rápidamente el grano para evitar problemas en el almacén. Es importante la entrega rápida de grano cosechado ya que la contaminación durante el transporte se incrementa hasta un 6% cada día. En los productos almacenados se recomienda bajar el contenido de humedad a niveles inferiores a los requeridos por el hongo (22% para *F. verticillioides*). Existen evidencias que señalan que altas concentraciones de bióxido de carbono o bajas concentraciones de oxígeno inhiben la síntesis de algunas micotoxinas (Bullerman y Northolt, 1982).

El uso de fungicidas se ha inclinado prácticamente al tratamiento con ácido propiónico y mezclas de otros ácidos orgánicos ó sus sales, sin embargo estas sustancias le imparten un sabor y olor desagradable al grano por lo que no se usa para alimentación humana. El uso del fungicida tiabendazole, es una alternativa promisoría ya que no es tóxica para el hombre y animales (Moreno, 1988).

Las soluciones para minimizar las pérdidas ocasionadas por la contaminación de hongos deben incluir un manejo total y multidisciplinario desde la selección de la semilla hasta el consumo del maíz. Los fitomejoradores deben mejorar la generación de nuevos híbridos y variedades mediante la inclusión de genes más resistentes a las condiciones adversas que predisponen a las plantas al ataque de hongos toxígenos. Se ha determinado que ciertas características de

la variedad como la cobertura de la mazorca, grosor del pericarpio y la tolerancia a plagas son importantes en la reducción del riesgo de contaminación (Bullerman y Northolt, 1982; Riley *et al.*, 1993b).

## 7. Producción de micotoxinas por *F. verticillioides*.

Las micotoxinas son metabolitos secundarios tóxicos producidos por diversas especies de hongos en medios de cultivo y substratos naturales como granos, forrajes y diversos productos alimenticios, que cuando son ingeridos por los animales o el hombre, pueden provocar enfermedad y la muerte (Peña y Durán de Bazúa, 1990; Riley *et al.*, 1993b).

Las principales micotoxinas producidas por *F. verticillioides*, son la moniliformina, fusarina C, ácido fusárico (fusarinas); y las fumonisinas (Nelson *et al.*, 1994, Riley *et al.*, 1993b).

**a. Moniliformina.-** Se reportó por primera vez a partir de una cepa de *F. moniliforme* (*verticillioides*), del cual deriva su nombre (Cole *et al.*, 1973), sin embargo la cepa perdió su habilidad de producir moniliformina durante el curso del estudio para determinar la estructura de la toxina. Existen conflictos respecto a la producción de moniliformina por cultivos de *F. verticillioides*, ya que sólo 22% de las cepas toxigénicas produjeron químicamente niveles detectables de la micotoxina y el promedio de producción fue bajo (Marasas *et al.*, 1986). Por lo general, cepas de *F. verticillioides* son pobres productoras de moniliformina, siendo otras especies mejores productoras como *F. subglutinans* (Nelson *et al.*, 1994).

**b. Fusarinas.-** Estudios a partir de cepas de *F. verticillioides* cultivadas en maíz estéril, demostraron que 21 cepas de 33, fueron mutágenas a *Salmonella typhimurium* TA 100 (Bjeldanes y Thomson, 1979). Los principales compuestos mutágenos fueron fusarina C y el ácido fusárico. Debido que la fusarina C es un metabolito mutágeno, se realizaron experimentos de la actividad iniciadora de

cáncer en ratas. Los resultados obtenidos (Gelderblom *et al.*, 1986) no apoyaron la teoría de que la fusarina C es cancerígena o es la causa de la hepatocarcinogenicidad de *F. verticillioides* MRC 826.

**c. Fumonisinás.-** Bezuidenhout y Gelderblom en 1988, caracterizaron la estructura de las fumonisinás como diésteres de ácido tricarbóxico y amino-alcoholes de 22 carbonos (peso molecular de 721). De las 13 fumonisinás caracterizadas químicamente (Figura 1 y Tabla 1) las FB<sub>1</sub>, FB<sub>2</sub> y FB<sub>3</sub> son consideradas de mayor interés por su actividad promotora de cáncer (Gelderblom *et al.*, 1988).

La producción de fumonisinás ha sido demostrada por diversas especies del género *Fusarium*, además de *F. verticillioides* y *F. proliferatum* (Matsushima) Nirenberg, en una amplia distribución geográfica. (Nelson *et al.*, 1991, 1992c). Entre las que se incluyen *F. nygamai* Burgues y Trimboli, *F. anthophilum* (R. Braun) Wollenw., *F. dlamini* Marasas, Nelson y Toussoun y *F. napiforme* Marasas, Nelson y Rabie (Nelson *et al.*, 1991, 1992c, Thiel *et al.*, 1991a).

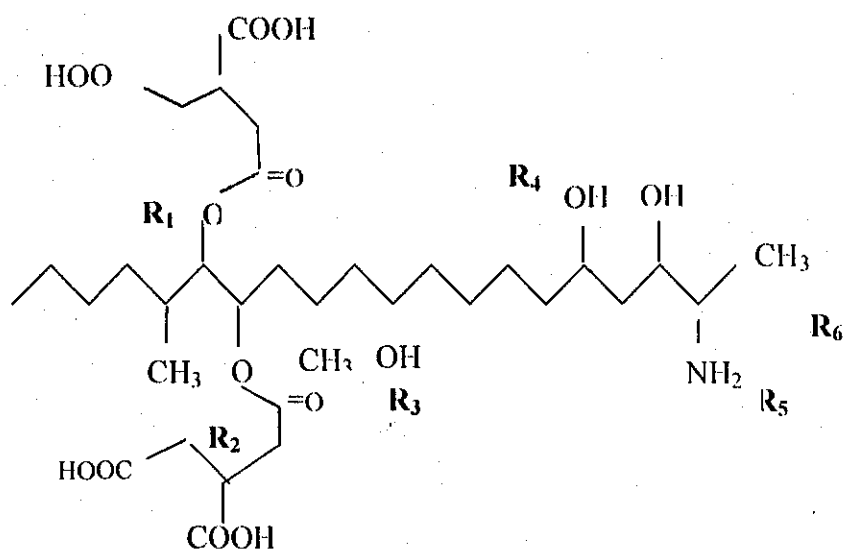


Figura 1. Estructura química de las fumonisinás (Shier *et al.*, 1995).

Desde el descubrimiento en 1988, las fumonisinas han sido aisladas a partir del maíz, alimentos y piensos a base de este cereal, en Argentina, Brasil Canadá, China, Egipto, Estados Unidos, Nepal y Perú (Nelson *et al.*, 1991; Sydenham *et al.*, 1992a; Thiel *et al.*, 1991a). La localización en estas regiones de amplia distribución geográfica, sugiere que la producción de fumonisinas en el maíz es mundial.

Tabla 1. Tipos de Fumonisinas (Musser y Plattner, 1997).

	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>	P.M
FA <sub>1</sub>	TCA	TCA	OH	OH	NHCOCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	763
FA <sub>2</sub>	TCA	TCA	H	OH	NHCOCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	747
FA <sub>3</sub>	TCA	TCA	OH	H	NHCOCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	747
FAK <sub>1</sub>	=O	TCA	OH	OH	NHCOCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	603
FB <sub>1</sub>	TCA	TCA	OH	OH	NH <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>	721
FB <sub>2</sub>	TCA	TCA	H	OH	NH <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>	705
FB <sub>3</sub>	TCA	TCA	OH	H	NH <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>	705
FC <sub>1</sub>	TCA	TCA	OH	OH	NH <sub>2</sub>	H	707
FP <sub>1</sub>	TCA	TCA	OH	OH	3HP	CH <sub>3</sub>	800
FP <sub>2</sub>	TCA	TCA	H	OH	3HP	CH <sub>3</sub>	784
FP <sub>3</sub>	TCA	TCA	OH	H	3HP	CH <sub>3</sub>	784
PH <sub>1a</sub>	TCA	OH	OH	OH	NH <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>	563
PH <sub>1b</sub>	OH	TCA	OH	OH	NH <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>	653

FA<sub>1</sub>; FA<sub>2</sub>; FA<sub>3</sub>; FAK<sub>1</sub>; FB<sub>1</sub>; FB<sub>2</sub>; FB<sub>3</sub>; FC<sub>1</sub>; FP<sub>1</sub>; FP<sub>2</sub>; FP<sub>3</sub>; PH<sub>1a</sub>; PH<sub>1b</sub> = tipos de fumonisinas; TCA = ácido tricarbóxico; OH = grupo hidroxilo; H = hidrógeno; 3HP = fosfato; NH<sub>2</sub> = grupo amino; CH<sub>3</sub> = grupo metilo; NHCOCH<sub>3</sub> = acetilamina; P.M. = peso molecular; R = radical.

### 7.1. Producción de fumonisinas en campo y almacén.

No se conoce con precisión el tiempo y el patrón de acumulación de las fumonisinas una vez infectada la planta. Las fumonisinas se han detectado en mazorcas de maíz, en glumas de inflorescencia, encontrándose aquí las mayores concentraciones, y en grano molido con mayor cantidad de fumonisina que el grano entero. La mayoría de las intoxicaciones suceden en cerdos y equinos (Bacon y Nelson, 1994).

*Fusarium verticillioides* puede comportarse como patógeno biotrófico o bien como saprófito. Se define principalmente como un hongo de campo, donde produce sus micotoxinas. Debido a que su relación con la planta no es obligatoria, se espera que en el grano, en sus fragmentos y en restos de plantas muertas sirvan de substrato para la producción de toxinas, particularmente bajo condiciones de almacén.

El rango de temperatura óptima para el crecimiento de *F. verticillioides* es de 22.5 a 27.5 °C, con un máximo de 32-37 °C y temperatura mínima de 2.5 a 5°C. Estudios adicionales indican que potencial osmótico para el crecimiento vegetativo es de -180 bars de potencial de agua, mientras que para la germinación de conidios requiere de -140 bars. El óptimo potencial osmótico es -10 bars y no ocurre crecimiento a -150 bars (Bacon y Nelson, 1994).

Los estudios de laboratorio pueden ayudar a definir las condiciones necesarias para el crecimiento y producción de las fumonisinas en condiciones de almacenamiento. Los estudios hechos sobre el crecimiento de este hongo en almacenamiento son limitados y estos no fueron diseñados para determinar la producción de toxinas. Maíz con humedad entre 18.4 y 23% fue óptimo para el crecimiento del hongo, mientras que fue inhibido con 28% de humedad (Bacon y Nelson, 1994).

El crecimiento de *F. verticillioides* en el almacén es complejo ya que existió interacción entre la humedad, los niveles de oxígeno (O<sub>2</sub>) y bióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). El hongo puede crecer en condiciones de almacén con 0% O<sub>2</sub> y 60% de CO<sub>2</sub> a 26 °C, pero con niveles similares de CO<sub>2</sub> en la atmósfera del almacén, el crecimiento se reduce cuando la temperatura es de 12 °C (Bacon & Nelson, 1994). El crecimiento de este hongo a 0% de O<sub>2</sub> y alto CO<sub>2</sub> sugiere crecimiento anaeróbico en el almacén. Además, el porcentaje de infección del grano por el hongo se pudo incrementar significativamente ( $p < 0.05$ ) en el maíz cosechado con un promedio de humedad de 12.4% y almacenado por 8 meses (Marasas *et al.*, 1979).



Las investigaciones respecto a las condiciones de almacenamiento indican que el hongo posee un alto potencial para producir micotoxinas bajo un amplio rango de condiciones de almacén (Bacon y Nelson, 1994).

## **7.2. Producción de fumonisinas en el laboratorio.**

La evaluación de la capacidad productiva de fumonisinas por *F. verticillioides* en el laboratorio se basa en su cultivo en maíz estéril y en el análisis de la cantidad de la toxina producida (Alberts *et al.*, 1990 y 1993; Ross *et al.*, 1990). La producción en el laboratorio requiere del ajuste del contenido de humedad del maíz parcialmente molido a 43% y la esterilización en autoclave del maíz húmedo durante 30 minutos; el agua destilada estéril se deja absorber por 1 ó 4 horas. La proporción de agua en el maíz es crítica ya que el exceso de agua reduce el rendimiento productivo del hongo (Bacon y Nelson, 1994).

Un aspecto crítico para la producción de fumonisinas es la cantidad de aire que el cultivo recibe, esto usualmente se controla con la reducción de la cantidad de maíz en el matraz y con el uso de tapones de ajuste ligeramente holgados. Se recomienda colocar 50 g de maíz en matraces Erlenmeyer de 300 mL de capacidad para pruebas de rutina, ó 100 g de en matraces de 500 mL; con 500 g se usan matraces Fernbach de 2.8 L, para la producción de fumonisinas a gran escala para investigaciones toxicológicas (Nelson *et al.*, 1991).

El inóculo utilizado es preparado a partir del crecimiento del hongo en medios tradicionales de laboratorio durante 1 a 2 semanas (Leslie *et al.*, 1992; Ross *et al.*, 1990; Sydenham *et al.*, 1992b), o pueden utilizarse liofilizados de conidios (Thiel *et al.*, 1991a). Los cultivos son incubados en la obscuridad a 25 °C de 21 a 30 días, aunque períodos de tiempo mayores resultan en una producción mayor. El período depende del método usado y de la cantidad total de maíz utilizado en el fermentador. Durante los tres primeros días de incubación, los cultivos son agitados una o dos veces diariamente. Una alternativa de

procedimientos es incubar dos semanas a 27°C, seguido por otras dos semanas a 15°C (Ross *et al.*, 1990).

Otros procedimientos para evaluar la producción de fumonisinas por cepas es a través de cultivos líquidos (Miller, 1993). Se han utilizado dos condiciones de medios y cultivos, uno como cultivo estacionario por 29 días (Jackson y Benneth, 1990) y el otro con cultivo en agitación por 14 días, considerando la reducción del tiempo de incubación, repetibilidad y el ligero incremento en el total de producción a partir de las cepas, este último método pudiera ser una alternativa de los cultivos líquidos (Miller, 1993).

El rendimiento de producción, por estos procedimientos, indica que las cantidades de fumonisinas obtenidas son específicas en la cepa de *F. verticillioides* (Tabla 2). La mayoría de las cepas de este hongo, a partir de diferentes áreas geográficas y substratos, pueden producir fumonisinas, lo cual sugiere alta capacidad de producción de las mismas.

Durante una investigación realizada en Europa (España, Francia, Italia y Polonia) para evaluar la producción de fumonisinas, por diferentes especies de *Fusarium* de diversos substratos, se observó que todas las cepas de *F. verticillioides* aisladas y una cepa de *F. proliferatum* produjeron fumonisinas en un amplio rango de concentraciones (0.7- 4,100 µg de FB<sub>1</sub>/g). La mayor producción de fumonisinas fue en el maíz (promedio de 1,259 µg/g) seguido por el trigo (promedio de 769 µg/g) y la cebada (promedio de 320 µg/g) (Visconti y Doko, 1994).

Tabla 2. Producción de fumonisina B<sub>1</sub> de diferentes orígenes y cepas de *Fusarium verticillioides* (Bacon y Nelson, 1994).

Fuente de donde se aisló la cepa.				
Alimento de animales con maíz contaminado (USA)	Sorgo y mijo (Nigeria y Zimbabwe)	Maíz mohoso (Nepal)	Alimento para animales con maíz de buena calidad (USA)	Queratitis micótica y cáncer (Canadá y USA)
Cepas de <i>F. verticillioides</i> y fumonisina B <sub>1</sub> (µg/kg) producida.				
M-2546 (2,589)	M-5054 (2,448)	M-5496 (nd)	M-211 (1927)	M-722 (1,914)
M-2552 (6421)	M-5067 (733)	M-5500(traza)	M-2232 (3,091)	M-773 (2,500)
M-2547 (144)	M-5068 (539)	M-5507(traza)	M-2270 (459)	M-1102 (nd)
M-2650 (traza)	M-5081 (traza)	M-5519 (60)	M-2285 (2,716)	M-1810 (130)
M-3031 (1,391)	M-5193 (traza)			M-2768 (nd)
M-3034 (6,090)	M-5243 (104)			M-5114 (2,900)
M-3041 (323)	M-5234 (95)			M-2978 (1,700)

Concentraciones de FB<sub>1</sub> en µg/kg dentro de paréntesis. nd = no detectado.

Nelson *et al.* (1991, 1992b) reportan la producción de fumonisinas por cepas de *F. verticillioides* en diferentes substratos y áreas geográficas, encontrando considerable variación en las cantidades de fumonisinas por las cepas en las diferentes fuentes, pero en general la variación fue baja dentro de cada substrato. La FB<sub>1</sub> se produjo por la mayoría de las cepas (95%) a partir de los alimentos a base de maíz que estuvieron relacionados con casos de Leucoencefalomalacia equina (LEME), por todas las cepas aisladas en el maíz de buena calidad y destinado a ser consumido en granjas. Todas las cepas de Nepal, a excepción de una, produjeron pocas fumonisinas (49 µg/g), al igual que las cepas a partir de mijo y sorgo de África, las del maíz usado como alimento para ratas de laboratorio, y del sorgo de Australia, produjeron niveles bajos e intermedios. Es de interés el que la mayoría de las cepas (85%), aisladas de queratitis micótica, úlceras y varios tipos de cáncer en humanos mostraran una producción de intermedia a alta (rango de 130 a 2,900 µg/g) de fumonisinas (Bacon y Nelson, 1994).

Musser y Plattner (1997), analizaron la composición de fumonisinas en cultivos de *F. verticillioides*, *F. proliferatum* y *F. nygami*, encontrando concentraciones mayores de FB<sub>1</sub> en los cultivos de *F. verticillioides* (3,430 µg/g), en tanto que en los cultivos de las otras especies la concentración fluctuó de 1 a 1,017 µg/g. El estudio demostró la producción de fumonisinas de la serie P, siendo ésta mayor bajo condiciones anaérobicas.

La producción de fumonisinas es variable, existe alto potencial de producción en substratos naturales y en productos agrícolas con cepas de *F. verticillioides* en diferentes áreas geográficas (Nelson *et al.*, 1991, 1992b, 1992c).

## **8. Enfermedades asociadas con *F. verticillioides* y fumonisinas**

### **8.1. Leucoencefalomalacia equina (LEME).**

El síndrome de LEME consta de reblandecimiento (licuefacción) de la materia blanca del cerebro, luego sobreviene necrosis y pérdida de esta sección afectada. Esta enfermedad fatal aparentemente se presenta sólo en equinos. La leucoencefalomalacia equina se reportó desde el siglo XIX y se consideró de presentación esporádica. En 1902, la LEME fue producida experimentalmente en equinos al alimentarlos con maíz mohoso, de un brote de campo, en Kansas. La enfermedad fue conocida como "contaminación del maíz mohoso", sin embargo, se fracasó en la identificación del hongo responsable (Bullerman y Draughon, 1994).

El establecimiento del agente causal de la enfermedad fue realizado por Wilson y Marapont (1971), con el aislamiento de *F. verticillioides* como el contaminante principal del maíz mohoso causante de numerosos casos de LEME y con la reproducción del síndrome mediante la alimentación con el material contaminado con el hongo.

Después del aislamiento de las fumonisinas y la identificación de sus estructuras Marasas *et al.* (1988), reprodujeron el síndrome en caballos mediante la administración intravenosa de fumonisina B<sub>1</sub>, lo cual se realizó evitando la hepatotoxicidad. Posteriormente, se reprodujo la enfermedad con el suministro de FB<sub>1</sub> con tubo gástrico, monitoreando la toxicidad hepática (Kellerman *et al.*, 1990).

Los investigadores han sugerido que altas dosis de fumonisinas inducen hepatotoxicidad fatal con lesiones leves en cerebro, mientras que dosis bajas causan hepatotoxicidad moderada y severas lesiones en cerebro. Sin embargo, se han presentado signos en el sistema nervioso central y lesiones hepáticas sin cantidades elevadas en suero, así como frecuente LEME con significativos daños en hígado en caballos alimentados con dietas contaminadas naturalmente con niveles bajos de fumonisinas (Wilson *et al.*, 1990).

La dosis mínima de fumonisinas que causa LEME permanece sin ser determinada. Es claro que los caballos son la especie más sensible a los efectos agudos de estas micotoxinas. Mientras no exista una guía oficial que disponga de los niveles de fumonisinas considerados de riesgo, la Asociación Americana de Diagnóstico Veterinario del Comité de Micotoxinas recomienda que alimentos que contengan niveles de fumonisinas mayores de 5 µg/g no deben suministrarse a caballos u otros equinos (Thiel *et al.*, 1992).

Investigaciones realizadas en México reportan principalmente estudios anatomopatológicos de los brotes que se han presentado en los Estados de México, Jalisco y Oaxaca, encontrándose lesiones en sistema nervioso central similares a los reportado previamente, el cuadro clínico observado en caballos se caracterizó por anorexia, adipsia, ceguera, parálisis glosofaríngea, incoordinación marcada, postración y muerte entre 24 a 48 horas (Sánchez, 1987).

Las concentraciones de fumonisinas que se encontraron en los análisis realizados en Oaxaca, en el alimento procedente de un brote de LEME, fueron de

1-10  $\mu\text{g}$  de  $\text{FB}_1/\text{g}$  de muestra, considerándose estos niveles como los responsables de la muerte de los animales (García, 1995).

## 8.2. Edema pulmonar porcino (EPP).

Esta inusual enfermedad en cerdos se caracteriza por severo edema pulmonar e hidrotórax, y muerte. En 1989-1990 se reportaron brotes de edema pulmonar porcino en diferentes partes de Estados Unidos de Norte América (Colvin y Harrison, 1992; Osweiler *et al.*, 1992; Ross *et al.*, 1991). En el maíz obtenido de granjas donde murieron cerdos con EPP, se encontró *F. verticillioides* como principal contaminante (Harrison *et al.*, 1990).

El alimento de cerdos con *F. verticillioides* produjo EPP al menos en un estudio (Osweiler *et al.*, 1992), desde el reporte de Kriek *et al.*, en 1981. Sin embargo, la asociación entre *F. verticillioides* y el edema pulmonar porcino parece ser fuerte, especialmente desde que la  $\text{FB}_1$  purificada demostró producir la enfermedad mediante la administración por vía intravenosa (Harrison *et al.*, 1990; Haschek *et al.*, 1992; Osweiler *et al.*, 1992). También el consumo de alimento naturalmente contaminado con fumonisinas, a dosis de 175  $\mu\text{g}/\text{g}$  durante 14 días, provocó EPP y con dosis  $>23 \mu\text{g}/\text{g}$  se ocasionó hepatotoxicidad en cerdos (Riley *et al.*, 1993b).

## 8.3 Toxicidad en pollos de engorda.

La implicación de toxinas de *F. verticillioides* en brotes de enfermedades en granjas ha sido controversial por mucho tiempo. La presencia de este hongo en el maíz se consideraba una condición benigna no asociada con toxicidad en pollos, sin embargo, después se presentaron efectos adversos. El pollo de engorda alimentado con material cultivado con *F. verticillioides*, bajó tanto de peso, como en la conversión alimenticia y tuvo anomalías en el esqueleto. Los patos fueron más sensibles que los pollos y pavos a *F. verticillioides*, pero las tres

especies desarrollaron degeneración del corazón e hígado (Engelhardt *et al.*, 1989). Otros estudios han confirmado inmunosupresión en gallinas (Chu *et al.*, 1988, Marijanovic *et al.*, 1991).

Desde el descubrimiento de las fumonisinas, diversos investigadores han intentado correlacionar los niveles de estas micotoxinas con la toxicidad en pollos. El rango de las concentraciones de fumonisinas en el alimento en estos estudios fue de 75 a 525  $\mu\text{g/g}$ . La toxicidad notoria (decremento del consumo de alimento y en la ganancia de peso, diarrea, elevada actividad enzimática en suero, incremento de peso del hígado y riñón, necrosis hepática y raquitismo) fue observada a dosis superiores a 150  $\mu\text{g/g}$ , observándose efectos sutiles (elevación en la relación esfingosina:esfingonina) a 75  $\mu\text{g/g}$  (Weibking *et al.*, 1993).

#### **8.4. Hepatosis y nefrotoxicidad en roedores.**

Las investigaciones primarias establecieron que el hígado es un órgano blanco de *F. verticillioides* en muchas especies, incluyendo las ratas (Norred y Voss, 1994). Estudios posteriores confirmaron que este hongo es también hepatotóxico en ratones (Voss *et al.*, 1992). A través de varias investigaciones conducidas en Sudáfrica, se descubrió que no todas las cepas de *F. verticillioides* son hepatotóxicas bajo condiciones agudas o subcrónicas (Gelderblom *et al.*, 1988). Voss *et al.*, (1992) agrega que no todas las cepas son hepatocancerígenas, además indica que parece que existe correlación positiva entre la hepatotoxicidad aguda/subcrónica y el potencial de la actividad promotora de cáncer de varias cepas de *F. verticillioides*.

Kriek *et al.* (1981) describen nefrosis en ratas expuestas subcrónicamente a material cultivado con *F. verticillioides*. Las lesiones se desarrollaron previo a la hepatotoxicidad, la cual fue reversible (dentro de 6 semanas) aún cuando continuó la exposición al material cultivado, por lo que se consideró de poca importancia toxicológica. Voss *et al.*, (1989, 1992) han encontrado reducción en

el peso de los riñones, incremento de la creatinina en suero y nefrosis en ratas alimentadas en forma natural con maíz contaminado así como con dietas contaminadas con niveles de 20-150  $\mu\text{g/g}$  de  $\text{FB}_1$  y cantidades menores de  $\text{FB}_2$  durante 4 semanas, especulando que la  $\text{FB}_1$  fue nefrotóxica.

Típicamente las lesiones subcrónicas en hígado consisten en necrosis celular, la cual aparece aleatoriamente en los lóbulos; vacuolización citoplasmática hepatocelular; variación en el tamaño del núcleo y en las propiedades de tinción; picnocirosis, fibrosis y proliferación de los conductos biliares (Gelderblom *et al.*, 1988). La exposición crónica resulta en franca cirrosis, carcinomas hepatocelulares, algunos de los cuales son metastásicos, además de colangiofibrosis y colangiocarcinomas (Gelderblom *et al.*, 1991).

El mecanismo de carcinogenicidad de las fumonisinas no ha sido descrito. Las evidencias indican que la  $\text{FB}_1$  no es genotóxica (Gelderblom *et al.*, 1991; Norred *et al.*, 1992), que posee pobre actividad de iniciación, sin embargo actúa como efectivo promotor del cáncer hepático tanto en ratas inducidas con dietilnitrosamina como en ratas no inducidas. Gelderblom *et al.*, (1993) compararon la toxicidad y la actividad iniciadora de las  $\text{FB}_1$ ,  $\text{FB}_2$  y  $\text{FB}_3$ , concluyendo que los tres isómeros causan efectos hepatotóxicos similares, aunque la  $\text{FB}_3$  parece ser la menos tóxica.

### **8.5. Cáncer esofágico humano.**

En algunas regiones del mundo la incidencia del cáncer esofágico excede la presentación "normal" considerada de 5 casos por cada 100,000 habitantes. Transkei, Sudáfrica ha sido la región más extensamente estudiada (Marasas *et al.*, 1981), con un rango de 50-200 casos por cada 100,000 habitantes. En esta región el maíz representa la base de la alimentación incluyéndose una cerveza fabricada de maíz y una bebida fermentada no alcohólica (Segal *et al.*, 1988).



La contaminación del maíz con *F. verticillioides* y fumonisinas en áreas de alta incidencia de cáncer esofágico fue estadísticamente mayor que la encontrada en las áreas de Transkei con baja incidencia (Rheeder *et al.*, 1992). Los niveles de fumonisinas encontrados en el área de alta incidencia fueron de 44  $\mu\text{g/g}$  de FB<sub>1</sub>. En un estudio más detallado se comparó la presencia de las diferentes especies del género *Fusarium* y la contaminación por fumonisinas y otras micotoxinas, tanto en maíz mohoso como en aparentemente sano así como en áreas de alta y baja incidencia de cáncer esofágico (Sydenham *et al.*, 1990b).

En las áreas de alta incidencia, *Fusarium verticillioides*, fue la especie predominante y tanto el maíz mohoso como el "sano" tuvieron altos niveles de fumonisinas. Los estudios ciertamente implican a las fumonisinas como agentes responsables del cáncer esofágico, sin embargo se requieren otras investigaciones epidemiológicas. El cáncer esofágico también se presenta con alta incidencia en algunas regiones de China (Yang, 1980), Iran (Kmet y Mahboubi, 1972) y Charleston, área de Carolina del Sur, Estados Unidos (Norred y Voss, 1994).

Los estudios con animales de laboratorio alimentados con cultivos de *F. verticillioides* o fumonisinas no mostraron lesiones cancerosas o precancerosas en esófago (Gelderblom *et al.*, 1991; Voss *et al.*, 1989). En un estudio realizado en China, pudieron observarse cambios cancerosos en el pre-estómago de ratas alimentadas con maíz contaminado con *F. verticillioides* durante 554 a 701 días (Li *et al.*, 1980). Estas lesiones fueron observadas sólo en 4 de 31 hembras. Sin embargo, hasta el momento no existe un modelo animal que apoye la teoría que el hongo puede estar relacionado con el cáncer esofágico humano. Otros factores como las nitrosaminas u otros agentes cancerígenos pueden estar contribuyendo al incremento de cáncer esofágico, e incrementando la actividad promotora de cáncer de las fumonisinas (Norred y Voss, 1994).

Un estudio realizado con monos Vervet, los cuales recibieron alimento contaminado con *F. verticillioides* y fumonisinas mostró la posibilidad que las micotoxinas estuvieran involucradas con otras enfermedades de humanos. En dicho estudio se encontró respuesta aterogénica, relacionada con una respuesta hipercolesterolémica, la cual se presentó con la alimentación de una dieta que contenía 5% de maíz contaminado con *F. verticillioides*. Los niveles de fumonisinas presentes en la dieta fueron de 209 a 547  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de peso vivo. También se encontró en los monos evidencias de daño hepático (elevada actividad de la aspartato transaminasa), sugiriendo los autores que la respuesta aterogénica fue secundaria al efecto hepatotóxico del hongo, sin embargo estos estudios han intrigado debido a la alta incidencia de aterosclerosis en la región norte de China donde la alimentación se basa en el maíz no así en el sur de China, donde la dieta se basa en arroz (Chang *et al.*, 1991).

Los efectos tóxicos de la contaminación de maíz con *F. verticillioides* en el ganado y los posibles efectos en humanos, representan un serio riesgo al desarrollo económico de productores de maíz y a la industria maizera. Muchos trabajos se realizan para determinar los niveles de fumonisinas que representan riesgos de salud, así como se requieren el conocimiento de las formas de prevenir la formación de fumonisinas y destoxificar una vez contaminado el alimento.

## **9. Mecanismo de acción de las fumonisinas**

Hasta la fecha se desconoce el mecanismo por el cual las fumonisinas inducen leucoencefalomalacia equina (LEME), edema pulmonar porcino (EPP) y nefrotoxicidad/ hepatotoxicidad y carcinoma hepatocelular en ratas. Se han desarrollado trabajos para tratar de entender el grado de responsabilidad de las fumonisinas sobre el incremento de incidencia de cáncer hepático en ratas y de las lesiones en las enfermedades de animales, entre los que sobresalen los relacionados con la alteración del metabolismo de esfingolípidos en los animales

enfermos y los que intentan explicar como las fumonisinas incrementan la incidencia de cáncer en ratas de laboratorio (Riley *et al.*, 1994b)

### 9.1. Alteración del metabolismo de Esfingolípidos.

#### a. Evidencias *In vitro*.

Los estudios sobre la cinética de la biosíntesis de *ново* de esfingolípidos fueron conducidos mediante la incorporación de serina o ácidos grasos radioactivos dentro de complejos de esfingolípidos de cadena larga (esfingomielina, glicoesfingolípidos, etc.). La primera evidencia de que las fumonisinas interferían en el metabolismo de esfingolípidos se observó en hepatocitos primarios de ratas (Wang *et al.*, 1991), demostrándose que las fumonisinas B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub> inhibían la incorporación de serina (<sup>14</sup>C) dentro del ácido hidrolizado de la molécula de esfingosina. La IC<sub>50</sub> (IC = concentración inhibitoria) de la FB<sub>1</sub>, en la biosíntesis de *ново* de esfingosina, en los hepatocitos fue de 0.1 M, indicando que la FB<sub>1</sub> y FB<sub>2</sub> fueron potentes inhibidores en la ruta de *ново* para la biosíntesis de esfingolípidos. Estudios posteriores demostraron que las FB<sub>3</sub>, hidrolizados de FB<sub>1</sub> y las toxinas AAL también fueron inhibidores (Merril *et al.*, 1993).

En animales el término "biosíntesis de esfingolípidos de *ново*" se refiere al paso enzimático que ocurre en el retículo endoplásmico y empieza con la condensación de serina y palmitol coenzima A (Co-A) para formar alfa-queto-esfingonina y dar lugar a la formación de ceramida (N-acil-esfingosina), la cual se forma por la reducción del di-hidro-ceramida (N-acil-esfingonina).

En la ruta biosintética de *ново* la enzima esfingonina N-acil-transferasa (ceramida sintetasa) es inhibida por las fumonisinas y las toxinas AAL (Merril *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1991). Esta enzima cataliza la unión de un ácido graso de la cadena larga de la base esfingoide, esfingonina para formar di-hidro-ceramida. La misma enzima tiene la habilidad para reacilar esfingosina, la cual es generada por

la hidrólisis de complejos esfingolípidos (Figura 2) por lo tanto el nombre colectivo de sintasa ceramida (Riley *et al.*, 1994a).

Debido a que la inhibición de la enzima esfingonina N-acil-transferasa ocurre en forma aparente por competencia tanto por la esfingonina como por la estearoil CoA, se hipotetizó que las fumonisinas interactuaban con los sitios de unión de ambos substratos, sin embargo la inhibición no fue reversible sugiriéndose que las fumonisinas se unen fuertemente a la enzima (Merril *et al.*, 1993).

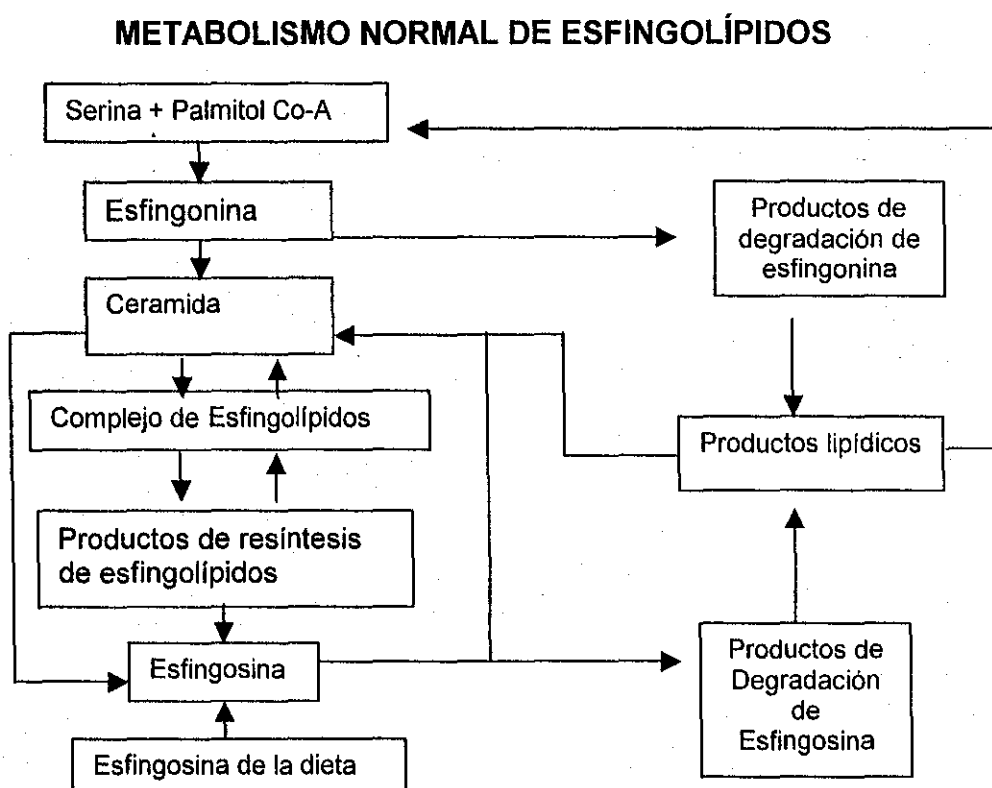


Figura 2. Metabolismo de esfingolípidos en células sanas de mamíferos (Riley *et al.*, 1994a).

La esfingosina es un amino alcohol de larga cadena insaturada y es la base esfingoide más frecuente de los esfingolípidos de mamíferos. En los hepatocitos primarios de ratas, durante el tiempo de la incorporación de la serina ( $^{14}\text{C}$ ) dentro de la esfingosina, el complejo esfingolípidos fue bloqueado por la fumonisina B<sub>1</sub>. La

esfingonina es similar a la esfingosina excepto porque en ésta no se presenta doble ligadura en el enlace 4 (base esfingoide saturada). El único esfingolípido en células de mamíferos que contiene esfingonina es la di-hidro-ceramida (N-acil-esfingonina), formada por N-acilación de la esfingonina (Riley *et al*, 1994a).

Puesto que la presentación de esfingosinas libres en células de mamíferos es siempre producto del catabolismo de esfingolípidos y la presencia de esfingoninas libres son intermediarios de la ruta biosintética de *novo* de esfingolípidos, ambos grupos esfingoides se encuentran siempre en concentraciones bajas en células sanas. Por lo que elevadas concentraciones pueden afectar el crecimiento de las células y dañar su integridad (Merril Jr., 1991), lo que ha sido asociado con defectos genéticos en la biosíntesis de esfingolípidos.

En resumen, hasta ahora se ha demostrado que algunas de las consecuencias de la inhibición de la esfingonina (esfingosina) N-aciltransferasa por las fumonisinas en estos modelos celulares son: a) inhibición de la biosíntesis de *novo* de esfingosina; b) acumulación de esfingonina libre (Wang *et al.*, 1991; Yoo *et al.*, 1992); c) reducción del complejo esfingolípido (Merril *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1991); d) incremento de los productos de degradación por el catabolismo de las bases esfingoides (Merril Jr., 1991; Merrill *et al.*, 1993); e) incremento de productos lipídicos derivados del aumento de productos de degradación de las bases esfingoides (Smith y Merrill, Jr., 1993) y f) incremento de esfingosina libre (Merril *et al.*, 1993; Yoo *et al.*, 1992) posiblemente por la inhibición de la reacilación de la esfingosina derivada tanto de la dieta o del catabolismo de complejos de esfingolípidos (Figura 3).

Otros estudios han demostrado que la FB<sub>1</sub> inhibe la proliferación celular y es citotóxica en diversos tipos de células (Shier *et al.*, 1991; Yoo *et al.*, 1992). Es incierto si las bases esfingoides libres, los complejos de esfingolípidos y sus productos de degradación juegan un papel importante en la regulación del

funcionamiento, proliferación, diferenciación y crecimiento celular (Hanada *et al.*, 1992; Merrill Jr., 1991). Por lo que la elevación intracelular de bases esfingoides libres es sólo un efecto de las fumonisinas en la alteración del metabolismo de esfingolípidos, lo que puede ser la causa de la alteración celular.

### ALTERACIÓN DEL METABOLISMO DE ESFINGOLÍPIDOS

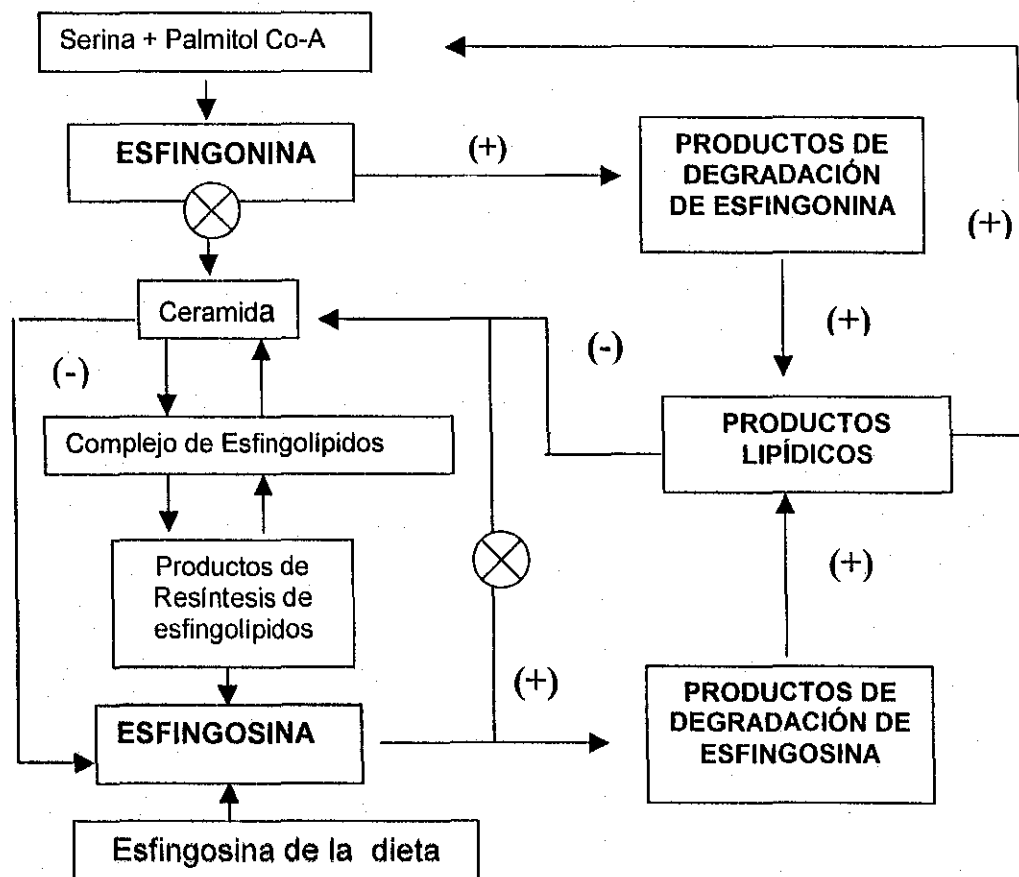


Figura 3. Alteración del metabolismo de esfingolípidos en células de mamíferos expuestas a fumonisinas. ⊗ = Blanco bioquímico primario de inhibición de la esfingonina (esfingosina) N-aciltransferasa (Riley *et al.*, 1994).

Estudios adicionales han mostrado estimulación de la síntesis de ADN en células Swiss 3T3 (Schroeder *et al.*, 1994), efecto de la FB<sub>1</sub> sobre la mitosis, lo que apoya la hipótesis de que la inhibición de la esfingonina (esfingosina) N-aciltransferasa y la resultante alteración del metabolismo de esfingolípidos son los

eventos primarios que conducen en cascada a otros eventos bioquímicos que alteran la regulación celular y dañan su integridad (Riley *et al.*, 1994 a).

**b. Evidencias *In vivo*.**

Debido que en cultivos celulares la relación de esfingosina libre con esfingonina libre demostró ser un marcador dimensional de la alteración del metabolismo de esfingolípidos por las fumonisinas, se hipotetizó que la alteración en el metabolismo de esfingolípidos en hígado (u otros órganos) de animales que consumen fumonisinas ó alimentos contaminados con la micotoxina pudiera ser detectada por el incremento de la relación esfingonina:esfingosinas libres en suero. Esta hipótesis fue probada en una serie de estudios utilizando suero y tejidos obtenidos de ponies, cerdos, pollos y ratas. El primer estudio (Wang *et al.*, 1992) se realizó con muestras de suero de ponies alimentados con material que contenía FB<sub>1</sub>, observándose incremento en la relación de los grupos esfingoide libres. El complejo esfingolípido disminuyó en suero. Observándose decremento en dicha relación al retirar el consumo de alimento.

En reciente estudio dietas formuladas con material cultivado con *F. proliferatum*, conteniendo predominantemente FB<sub>2</sub> ó FB<sub>3</sub> a 75 µg/g, se encontró que las dietas que contenían FB<sub>2</sub> causaron LEME y que la dietas con FB<sub>3</sub> no la causaron, ni fueron tan potentes como las FB<sub>1</sub> y FB<sub>2</sub> (Ross *et al.*, 1994). Los cambios en suero respecto a la relación de los grupos esfingoides apoyaron dichas conclusiones, sin embargo, mientras que la FB<sub>3</sub> no causó LEME o cualquiera indicación de hepatotoxicidad o nefrotoxicidad, la concentración de esfingonina y la relación de los grupos esfingoides fue significativamente elevada en suero, hígado y riñones de los ponies. El incremento detectado en suero y tejidos de ponies alimentados con dietas que contenían FB<sub>2</sub> fue mayor que el observado en los ponies alimentados con FB<sub>3</sub>. Similares estudios se han conducido en cerdos (Haschek *et al.*, 1993; Riley *et al.*, 1993a).

Basados en los estudios realizados en cerdos, se hicieron las siguientes conclusiones: a) la alteración de la biosíntesis de esfingolípidos en hígado, pulmones y riñones ocurre a baja concentraciones de fumonisinas; b) la elevación de esfingonina libre, de la relación de los grupos esfingoides y el agotamiento del complejo esfingolípido ocurre antes de que se presenten cambios bioquímicos en suero que indican que el daño tisular es elevado; y c) la FB<sub>1</sub> pura y dietas de maíz contaminadas naturalmente con fumonisinas, ambas alteran la biosíntesis de esfingolípidos principalmente en hígado, pulmones y riñones, siendo menor el daño en otros tejidos (cerebro, páncreas, nódulos linfáticos y músculo esquelético) (Haschek *et al.*, 1993).

En ratas Sprague Dawley alimentadas, con dietas conteniendo FB<sub>1</sub> por 4 semanas se observó estrecha correlación entre la severidad de los cambios estructurales observados en hígado y riñón y la elevación de esfingonina libre y la relación esfingonina:esfingosina (Riley *et al.*, 1994 a). Otros estudios *in vivo* con pollos (Weibking *et al.*, 1993), peces y conejos dosificados intravenosamente con fumonisinas o consumiendo dietas contaminadas mostraron similares hallazgos. A fin de entender como la alteración del metabolismo de esfingolípidos por las fumonisinas puede conducir a las enfermedades, es necesario comprender el papel que juegan los esfingolípidos en la función celular.

## **9.2. Revisión del papel regulatorio de los esfingolípidos.**

El mantenimiento de niveles bajos de bases esfingoides libres en los tejidos es importante debido a que estos compuestos tienen una actividad biológica intrínseca importante y pueden ser citotóxicos en concentraciones elevadas. Por lo tanto elevación intracelular de bases esfingoides libres alterará el mecanismo de regulación normal dentro de las células. Además, el complejo esfingolípido tiene numerosas funciones en las membranas celulares, incluyendo estabilización de la membrana, aceptación de proteínas y lípidos, capturando elementos



citoesqueléticos y en el reconocimiento célula-célula, por lo que el agotamiento de esfingolípidos puede afectar la función normal de la célula.

La alteración en la regulación del complejo esfingolípido, como la esfingomielina resulta en la formación de mensajeros secundarios de lípidos, estos mensajeros secundarios y los sistemas efectores (ejem. ceramida y productos de degradación de esfingolípidos), se ha demostrado o hipotetizado, que actúan como señales intracelulares para poner en marcha o detener procesos dentro de la célula que incluyen la expresión de los genes, activación o inactivación de proteínas específicas como la proteína C quinasa y la fosfatasa ácido fosfatídica, apoptosis, la regulación de factores de crecimiento y otros sistemas de señales intracelulares. Todos estos procesos están íntimamente conectados a los procesos de crecimiento, proliferación y diferenciación celular (Riley *et al.*, 1994b).

### **9.3. Posibles mecanismos de las fumonisinas como inductores de cáncer.**

Existen diversos mecanismos que pudieran explicar el efecto cancerígeno de las fumonisinas. La carcinogenicidad frecuentemente se define como la presentación de tres fases distintivas: iniciación (cambios genéticos), promoción (expansión clonal de células iniciadoras) y progresión (conversión maligna) (Harris, 1991).

Químicamente los agentes cancerígenos se han clasificado como no genotóxicos (que no causan daño al ADN), indirectamente genotóxicos (aquellos que causan daño en rutas celulares y que posteriormente dañan el ADN) y directamente genotóxicos (de acción cancerígena directa). Los agentes no genotóxicos pueden actuar junto con los cancerígenos y entre ambos ocasionar el desarrollo de cáncer en los diferentes estados.

Las fumonisinas, son agentes no genotóxicos (Gelderblom *et al.*, 1991), sugiriéndose que el mecanismo de incremento de riesgo de cáncer ocurre por aumento en la proliferación celular producida por efecto mitogénico a células

blanco o por proliferación celular regenerativa subsecuente a la citotoxicidad (Cohen y Ellwein, 1990). Aunque esta propuesta no es aceptada universalmente, provee los medios para conocer el papel que juegan las fumonisinas en relación al cáncer.

Agentes no genotóxicos pueden también actuar disminuyendo la reparación del ADN o durante la replicación del ADN, o bien inhibiendo la ruta por la cual se detiene el ciclo celular o se induce la apoptosis en respuesta del daño acumulado del ADN (Weinstein, 1991).

#### **10. Incidencia de *F. verticillioides* y fumonisinas en maíz.**

Existen reportes de contaminación por *F. verticillioides* en diversos países, influyendo las condiciones ambientales del año de cosecha y la localización geográfica. Este hongo resulta ser la especie más frecuente en el maíz amarillo y blanco. En Estados Unidos, en los años de cosecha de 1991 y 1992 se reportó un rango de infección del 28 al 94% por especies de *Fusarium*, existiendo en 1991 mayor contaminación por *F. verticillioides* en el maíz amarillo, especialmente en el maíz molido, en tanto que durante la cosecha de 1992 se encontró principalmente *F. subglutinans* en maíz blanco, lo cual pudo ser debido a las condiciones húmedas y frías que prevalecieron durante el año, lo que favoreció la invasión de otras especies de *Fusarium* (Bullerman y Draughon, 1994; Bullerman y Tsai, 1994).

El análisis en diferentes muestras de maíz y sus fracciones, permitió determinar la presencia de diversas especies de *Fusarium*, además se encontró mayor contaminación en las fracciones del germen y salvado, siendo consistentemente alto el desarrollo de unidades formadoras de colonias (UFC g<sup>-1</sup>), mientras que en las hojuelas de maíz se observó menor contaminación (Tabla 3).

La alta prevalencia del hongo en el germen y salvado puede ser indicativo de la localización del hongo en el germen, bajo el pericarpio, así como la baja contaminación o ausencia en las fracciones de hojuelas, y puede explicar porqué el cereal de maíz consistentemente se encuentra libre de fumonisinas (Katta, 1994).

Tabla 3. Conteo de *Fusarium* en el maíz y en diferentes presentaciones (Katta, 1994).

No. de muestra	Infección (%) por <i>Fusarium</i>	Conteo de <i>Fusarium</i> (UFC g <sup>-1</sup> )			
		Salvado	Germen	Hojuelas	Harina
10493	25	< 100	4800	< 100	1600
11193	28	2000	8900	< 100	< 100
11893	24	< 100	6000	< 100	900
12593	21	< 100	16000	< 100	100
20193	23	1000	350	< 100	< 100
20893	20	4000	< 100	< 100	1300
21593	20	<100	4200	< 100	1400
22293	13	< 100	100	< 100	100
30193	13	< 100	300	< 100	< 100
30893	17	< 100	4600	< 100	2700
31593	10	< 100	2900	< 100	600
32293	12	64000	9400	< 100	100
Promedio	19	5600	5200	< 100	730

En investigaciones desarrolladas en Argentina se evaluó la contaminación por especies de *Fusarium* en diferentes estados de madurez del maíz, encontrándose *F. verticillioides* como la especie de mayor prevalencia durante las etapas finales de madurez, mientras que *F. proliferatum* se encontró en altos

niveles en los estados de madurez intermedios, lo que concuerda con lo reportado en otros estudios (Chulze *et al.*, 1996; Doko *et al.*, 1995).

Estudio realizado al noreste de la República Mexicana permitió el aislamiento de *F. verticillioides* en 61% de las mazorcas analizadas, presentando el 97% de las cepas capacidad productiva de fumonisinas, con un rango de 10 a 9,000 ppm (Desjardins *et al.*, 1994).

### **10.1. Fumonisinas en el maíz y sus productos.**

Investigaciones relacionadas con la incidencia de fumonisinas en diferentes genotipos de maíz cultivados en Europa y África, reportan altos niveles de contaminación en Italia, Portugal y Zambia, con incidencia del 100%, encontrándose niveles de fumonisinas (FB<sub>1</sub> + FB<sub>2</sub>) de 2850, 4450 y 1710 ng/g respectivamente. Se observó una tendencia general de alta contaminación en genotipos de maíz de madurez tardía o de endospermo tipo dentado, aunque también las condiciones ambientales del área específica de cultivo juegan un papel importante en la formación de fumonisinas en el maíz, se requieren estudios que valoren la interacción genotipo-área-estación (Doko *et al.*, 1995).

El rango de concentración reportado por presentación natural en maíz asociado con cáncer esofágico es de 0.0 a 10 500 ng/g (ppb) en maíz considerado como "sano" y entre 600 y 63 200 ng/g en maíz obviamente "mohoso" (Hopmans y Murphy, 1993; Sydenham *et al.*, 1991). Los niveles de fumonisinas en alimentos de animales asociados con brotes de leucoencefalomalacia equina se encuentran entre 1300 y 150 000 ng/g de FB<sub>1</sub>, 100 y 23 000 ng/g de FB<sub>2</sub>, mientras que los niveles asociados con el edema pulmonar porcino son 105 000 a 155 000 ng/g de FB<sub>1</sub> (Colvin *et al.*, 1993; Haschek *et al.*, 1992).

El maíz considerado "sano" puede o no tener correlación entre los niveles de fumonisinas y el número de unidades formadoras de colonias (UFC g<sup>-1</sup>) de este

hongo, sin embargo existe cuando los datos se expresan en incidencia (porcentaje de infección del grano) (Rheeder *et al.*, 1992; Sydenham *et al.*, 1992b).

Los derivados de alimentos analizados para evaluar la contaminación con fumonisinas, incluyen maíz parcialmente molido, harina, cereal, tortillas, totopos, palomitas y torta de maíz. La Tabla 4 muestra los niveles de fumonisinas en harina de maíz comercial de muestras obtenidas de Canadá, Egipto, Perú, Estados Unidos y Sudáfrica (Sydenham *et al.*, 1991).

Tabla 4. Niveles de fumonisinas en harina comercial (Sydenham *et al.*, 1991).

País	Niveles de fumonisinas ( $\mu\text{g/g}$ )		
	No. de muestras	FB <sub>1</sub>	FB <sub>2</sub>
Canadá	2	0-0.05	0
Egipto	2	1.8-3.0	0.5-0.8
Perú	4	0-0.7	0-0.1
Sudáfrica	52	0-0.5	0-0.1
Estados Unidos	17	0-2.8	0-0.9

Estudios conducidos por la FDA en alimentos obtenidos de supermercados en el área de Washington, D.C., reportaron la mayor contaminación por fumonisinas en harina y en maíz parcialmente molido, moderada en pan y bajos niveles en tortillas y totopos (Stack y Eppley, 1992).

En Suiza la mayor contaminación prevaleció en dichos productos, encontrándose en el 75% de las muestras niveles por debajo de  $0.1 \mu\text{g/g}$  (Pittet *et al.*, 1992). En campos de Argentina se reportó la presencia de *F. verticillioides* y fumonisinas, la mayoría de las muestras tuvieron niveles de fumonisinas mayores de  $2 \mu\text{g/g}$  y algunos fueron tan altos como  $6-10 \mu\text{g/g}$ . El rango de contaminación

por *F. verticillioides* fue de 10 000 a 700 000 UFC g<sup>-1</sup>, estos niveles se presentaron en el maíz aparentemente sano (Sydenham *et al.*, 1993).

Doko y Visconti (1993) indican contaminación en maíz y sus productos en Italia, los niveles presentes fueron de 0.01 a 6.8 µg/g. De 26 genotipos de maíz, cuatro mostraron niveles superiores a 1 µg/g, conteniendo el maíz comercial niveles mayores de 2 µg/g, mientras que los productos de maíz con mayor contaminación fueron la harina, el maíz inflado y la polenta (un tipo de harina).

Ueno *et al.* (1993) en un estudio realizado en China, Japón y Nepal encontraron en el maíz entero niveles de FB<sub>1</sub> de 0.6 a 4.1 µg/g y en gluten de maíz los niveles fueron de 0.3 a 2.4 µg/g, demostrando que la incidencia de fumonisinas a nivel mundial en el maíz es similar a los niveles encontrados en el maíz de Asia (Castelo *et al.*, 1998; Murphy *et al.*, 1993; Sydenham *et al.*, 1991; Sala *et al.*, 1994; Viquez *et al.*, 1996).

#### **11. Efecto de los procesos sobre la estabilidad de las fumonisinas.**

Los estudios que han reportado la presencia de fumonisinas en el maíz y en los productos para consumo humano, muestran altos niveles en el maíz entero así como en productos que se han sometido al menos a procesos mínimos como la molienda.

Los productos con un nivel mayor de procesamiento como los cereales hojueleados y de maíz inflado tienden a ser negativos o presentar niveles bajos de fumonisinas. Sin embargo, estos resultados deben tomarse con precaución debido a que proceden de estudios con un número limitado de muestras (Bullerman y Tsai, 1994).

Existe limitada información respecto al efecto de los procesos sobre la estabilidad de las fumonisinas. Hasta ahora la fumonisina B<sub>1</sub> ha sido considerada

como un compuesto estable al calor. Alberts *et al.* (1990) reportó que material cultivado con *F. verticillioides* sometido a ebullición durante 30 minutos seguido por deshidratación a 60°C por 24 horas no presentó cambios o pérdida en los niveles de FB<sub>1</sub>. Recientemente Scott y Lawrence (1992) demostraron la recuperación del 40% de las FB<sub>1</sub> y FB<sub>2</sub> después del calentamiento de maíz a 190°C, no recuperándose a 220°C (Tabla 5).

Tabla 5. Efecto de la temperatura sobre fumonisinas en harina de maíz (Scott y Lawrence, 1992).

Substrato	Recuperación (%)			
	°C	minutos	FB <sub>1</sub>	FB <sub>2</sub>
Harina de maíz	22	60	69	65
	22	60	77	79
	190	60	42	38
	220	25	0	0
Harina de maíz + H <sub>2</sub> O (1+1)	22	60	39	41
	22	60	63	76
	190	60	17	21
	190	60	23	32

El estudio sobre el efecto de los procesos es complicado por la escasez de métodos analíticos propicios. Las fumonisinas tienen el inconveniente que no siempre son extractadas y recuperadas de diferentes matrices, la mayoría de los métodos trabajan mejor en la recuperación a partir de maíz. Una vez que el maíz ha sido calentado o procesado, la extracción normal no recupera o mide el total de las fumonisinas. El calentamiento del maíz y de muestras de alimentos presentaron decremento en la eficiencia de extracción por los métodos actuales (Bordson *et al.*, 1993).

Los niveles de fumonisinas pueden reducirse 50% o más después del calentamiento, pero el substrato permanece tóxico. La toxina posiblemente permanece atada a la matriz del alimento y llega a no ser recuperada, por lo que es muy importante distinguir entre la descomposición y la adherencia de la toxina en la matriz del alimento (Bullerman y Tsai, 1994).

Por otra parte, los métodos analíticos deben ser capaces de detectar productos hidrolizados de las fumonisinas que permanecen tóxicos en los alimentos como la tortilla. La nixtamalización, proceso térmico-alcalino para la elaboración de la tortilla, remueve la FB<sub>1</sub>, pero resulta en la formación de productos hidrolíticos que permanecen tóxicos (Hendrich *et al.*, 1993; Sydenham *et al.*, 1991), estos productos hidrolizados son de gran interés ya que algunas investigaciones sugieren que poseen los mismos efectos toxicológicos *in vitro* (Gelderblom *et al.*, 1993) y la misma actividad promotora de cáncer hepático *in vivo* (Hendrich *et al.*, 1993) que la fumonisina original.

#### **11.1. Proceso de nixtamalización.**

La nixtamalización, método tradicional para la elaboración de tortillas, involucra el cocimiento de maíz entero en agua conteniendo 1% de hidróxido de calcio, seguido de un período de reposo. El líquido de cocimiento (agua de nejayote) es descartado y el grano cocido (nixtamal) es lavado para remover el pericarpio y el exceso de calcio. El nixtamal se muele para obtener la masa la cual es preparada y cocida para producir las tortillas (Serna-Saldivar *et al.*, 1990). El alto pH del sistema alcalino parece promover la ionización de los grupos hidroxilo en el almidón, produciendo ligaduras del almidón con el calcio (Dombrink-Kurtzman y Dvorak, 1999). Este tratamiento puede hidrolizar a la fumonisina B<sub>1</sub> original a hidrolizado de fumonisina B<sub>1</sub> (HFB<sub>1</sub>) denominado aminopentol (AP<sub>1</sub>) (Figura 4).



La reacción involucra la pérdida de dos moléculas de propano-1,2,3-ácido tricarbónico (ácido tricarbálico) lo que ocasiona la hidrólisis de FB<sub>1</sub> a aminopentol (Sydenham *et al.*, 1995). El tratamiento con hidróxido de calcio en maíz molido y entero conteniendo FB<sub>1</sub> a temperatura ambiente durante 24 horas ocasionó la pérdida considerable de FB<sub>1</sub> y la aparición de AP<sub>1</sub> en la fracción acuosa del calcio, además de detectarse FB<sub>1</sub> parcialmente hidrolizada y una mezcla de monoésteres (Shephard *et al.*, 1994).

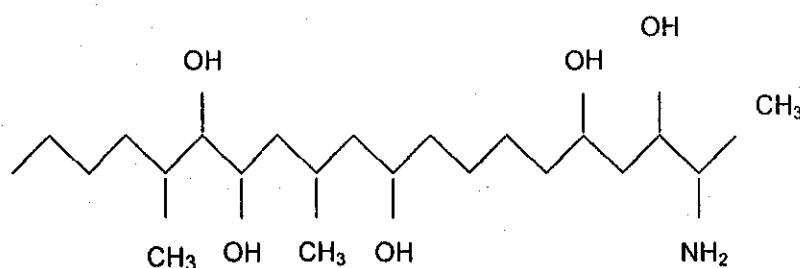


Figura 4. Estructura química del hidrolizado de FB<sub>1</sub> (AP<sub>1</sub>).

El AP<sub>1</sub> y el correspondiente producto hidrolizado de FB<sub>2</sub> (AP<sub>2</sub>) fueron más tóxicos que los correspondientes FB<sub>1</sub> y FB<sub>2</sub> en algunos cultivos celulares (Abbas *et al.*, 1993; Gelderblom *et al.*, 1993). Sin embargo, el AP<sub>1</sub> no fue iniciador de cáncer en el hígado de ratas, aunque la FB<sub>1</sub>, FB<sub>2</sub> y la FB<sub>3</sub> lo fueron (Gelderblom *et al.*, 1993); la escasa absorción de los compuestos pudo ser la posible explicación.

Los productos nixtamalizados producidos en México no han sido examinados, por lo que deben conducirse investigaciones en productos a base de maíz como las tortillas para detectar la presencia de fumonisinas (nativas e hidrolizadas) dado el alto consumo por la población.

## 12. Metodología analítica para la detección de fumonisinas.

En la actualidad se citan 2 métodos de extracción mediante solventes polares (metanol/agua o bien acetonitrilo/agua); seguido de limpieza mediante columna de intercambio iónico (SAX) o vía columna C<sub>18</sub> de fase de reversa Sep-Pak (Waters Associates, Milford) (Stack, 1998).

Para la detección de las fumonisinas mediante cromatografía de líquidos o cromatografía de capa fina se requiere derivatización con agentes fluorescentes como fluorescamina, OPA (o-phthal-di-aldehído) ó el NAD (2,3 dicarboxi-aldehído-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 tricarboxílicos 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, pero se requiere de tiempo considerable para su análisis y de equipo costoso (Rothinghaus *et al.*, 1992; Tejada *et al.*, 1994).

El método más usual para la detección de fumonisinas en alimentos es mediante cromatografía de líquidos, el cual permite la separación de las fumonisinas FB<sub>1</sub>, FB<sub>2</sub> y FB<sub>3</sub> en 16 minutos mediante un sistema de solventes y permite un límite de detección de 50 ng/kg (Rice y Frank 1994; Sydenham *et al.*, 1992b).

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 µg/kg (Rothinghaus *et al.*, 1992).

Con el desarrollo de la tecnología de anticuerpos monoclonales y policlonales en aplicaciones analíticas, particularmente en el terreno de las micotoxinas, se hace posible el análisis rápido y confiable de contaminación con

métodos de bajo costo. Se ha desarrollado para la inspección de alimentos, la técnica ELISA (Ensayo Inmunoabsorbente de enzima ligada) y el método de Inmunocromatografía (Azcona *et al.*, 1992).

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 sustrato y obtener el cambio de color por efecto del conjugado. A mayor conjugado ligado a anticuerpos mayor coloración (Tejada *et al.*, 1994). Entre los métodos que utilizan anticuerpos se incluyen las técnicas inmunoenzimáticas (Agri-Screen y Veratox de Neogen), las cuales se basan en la técnica de ensayo inmunoabsorbente mediante enzima ligada (ELISA) (Ware *et al.*, 1994).

Investigaciones realizadas para la detección de fumonisinas en productos nixtamalizados han mostrado interferencia por el calcio presente en las tortillas. Se analizó la presencia de fumonisinas en tortillas utilizando columnas para extracción y limpieza  $C_{18}$  fase de reversa y derivatización con o-phaldi-aldehído y 2-mercaptoetanol, obteniendo un porcentaje de recuperación de 86.5% para  $FB_1$  y de 82.6% para  $HFB_1$ . Los contenidos de  $FB_1$  e  $HFB_1$  en las tortillas obtenidas en la frontera de Texas-México fueron de 187 y 82 ng/g respectivamente. En masa fueron de 262 y 64 ng/g. Los resultados encontrados en el estudio mostraron que la  $FB_1$  y su hidrolizado se encuentran presentes en las tortillas consumidas por la población (Stack, 1998).

### III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

*Fusarium verticillioides*, hongo productor de las fumonisinas, se ha encontrado a nivel mundial principalmente en cereales como el maíz, algunos estudios reportan incidencias mayores del 90%. En la planta de maíz puede ocasionar germinación prematura y pudrición de la mazorca, enfermedades que ocasionan decremento en el rendimiento del grano y grandes pérdidas económicas en la cosecha.

Las fumonisinas son responsables de la leucoencefalomalacia equina y del edema pulmonar porcino. En algunos países se encuentran estrechamente relacionadas con la alta incidencia de cáncer esofágico humano y de defectos en tubo neural de recién nacidos. Actualmente se estudian medidas de control, durante el cultivo, que permitan incrementar la resistencia de la planta a los daños por fitopatógenos así como la producción de fumonisinas.

La alta incidencia de fumonisinas en el maíz y en sus productos, en diversos países, ha conducido al estudio de los efectos de los procesos a los que se somete el maíz con el propósito de evaluar la estabilidad de dichas micotoxinas. Entre los procesos que se han estudiado se encuentra la nixtamalización, que reduce los niveles de fumonisinas, sin embargo, se ha detectado la formación de productos hidrolizados, compuestos que permanecen tóxicos en el alimento. Sin embargo, hasta la fecha las investigaciones realizadas en productos nixtamalizados han sido conducidos en otros países, bajo condiciones diferentes a las del proceso tradicional de la tortilla en México.

Como el maíz es la base de la alimentación en México, se debe evaluar el riesgo de exposición a su contaminación por *F. verticillioides* y fumonisinas, para establecer medidas de control en regiones altamente contaminadas, además de determinar la eficiencia del proceso de nixtamalización sobre productos procesados como las tortillas, de alto consumo humano.

#### IV. JUSTIFICACIÓN

El maíz en México es la base de la alimentación de la población humana y se incorpora a raciones balanceadas de animales. Durante el cultivo y almacenamiento se requieren medidas de control que eviten pérdidas en el rendimiento de la cosecha, en la calidad nutricional así como en la inocuidad del grano y sus productos.

El monitorear la contaminación por *Fusarium verticillioides* y fumonisinas en grano de maíz, se considera una de las medidas para determinar el riesgo de exposición de su consumo, ya que junto con estudios epidemiológicos se puede establecer el riesgo a la salud de humanos y animales.

Por otra parte, el valorar la capacidad productiva de fumonisinas por cepas de *F. verticillioides* aisladas en localidades consideradas de alta producción en maíz, permitirá determinar si las cepas nativas puedan ser consideradas de mayor riesgo toxicológico, puesto que cepas de alta capacidad productiva se encuentran relacionadas con la presencia de cáncer.

Es relevante considerar la eficiencia de los procesos a los que se somete el maíz para la producción de alimentos, como la nixtamalización, proceso para la elaboración de la tortilla, lo cual permitirá establecer si existe reducción de los niveles de fumonisinas y formación de productos hidrolizados bajo las condiciones tradicionales que se realizan en molinos de nixtamal.

## V. HIPÓTESIS

Es posible encontrar elevada contaminación por *Fusarium verticillioides* en el maíz cosechado en el Estado de Jalisco, con alta capacidad productiva de fumonisinas, lo que resulta potencialmente tóxico para humanos y animales que lo consumen.

El proceso de nixtamalización y elaboración de la tortilla permite la reducción de los niveles de fumonisinas produciendo hidrolizados de fumonisinas.

## VI. OBJETIVOS

### GENERALES

1. Detección de *Fusarium verticillioides* y fumonisinas en el maíz cultivado en localidades de alta producción agrícola de Jalisco.
2. Evaluar el efecto de la nixtamalización sobre los niveles de fumonisinas y la producción de sus hidrolizados en el nixtamal, masa y tortilla.

### ESPECÍFICOS

- 1.1. Determinar el porcentaje de incidencia de *F. verticillioides* en maíz blanco cosechado en Huejotitán, municipio de Jocotepec y de Ameca, Jalisco.
  - 1.2. Detectar los niveles de fumonisinas en las variedades de maíz UDG 600, UDG 601 y UDG 602 cultivadas en Ameca y en el maíz cosechado en Huejotitán.
  - 1.3. Establecer si existe relación estadística entre el daño visual de la mazorca, el número de unidades formadoras de colonias (UFC/g de maíz) y los niveles de fumonisinas presentes en el maíz.
  - 1.4. Valorar la capacidad productiva de las cepas de *F. verticillioides* aisladas en el maíz bajo condiciones "in vitro".
- 
- 2.1. Monitorear los niveles de fumonisinas en masa y tortillas que se expenden en la zona metropolitana de Guadalajara.
  - 2.2. Evaluar la eficiencia de la nixtamalización y elaboración de tortilla sobre los niveles de fumonisinas en los productos del maíz (nixtamal, masa y tortilla).
  - 2.3. Cuantificar la producción de hidrolizados de fumonisinas durante el proceso tradicional de nixtamalización.

## VII. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio se realizó en el Laboratorio de Micotoxicología del Departamento de Salud Pública del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA) de la Universidad de Guadalajara y en el Laboratorio de Micotoxinas del Departamento de Botánica del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

### 7.1. Detección de *F. verticillioides* y fumonisinas

#### 7.1.1. Muestreo

Se realizó un muestreo aleatorio en 4 parcelas localizadas en Huejotitán Municipio de Jocotepec, ubicadas en un radio aproximado de 3 km de la zona urbana, a una latitud norte de 20° 21' , una longitud oeste de 103° 29' y una altitud de 1552 msnm. Se analizaron cinco mazorcas de maíz blanco semidentado por parcela (n= 20) y se trasladaron al laboratorio para su análisis. El muestreo se realizó al término de la cosecha de junio – noviembre de 1996.

Se realizó otro muestreo aleatorio en una parcela localizada en el Centro Experimental Agrícola del CUCBA, en Ameca, localizado a una latitud 20° 33'N, longitud 104° 03' W y altitud de 1225 msnm, donde se obtuvo un total de 90 mazorcas maduras (30 de cada variedad) de las variedades de maíz tipo amarillo semidentado UdG 600, UdG 601 y UdG 602, se trasladaron en bolsas de papel estraza para su análisis al término de la cosecha de junio – noviembre de 1997 (Figura 5).

Para el análisis de las muestras, tanto de Huejotitán como de Ameca, Jalisco, las mazorcas se separaron de acuerdo a la clasificación del daño visual descrita por Rodríguez (1994), tomando la Escala mostrada en la Figura 6.



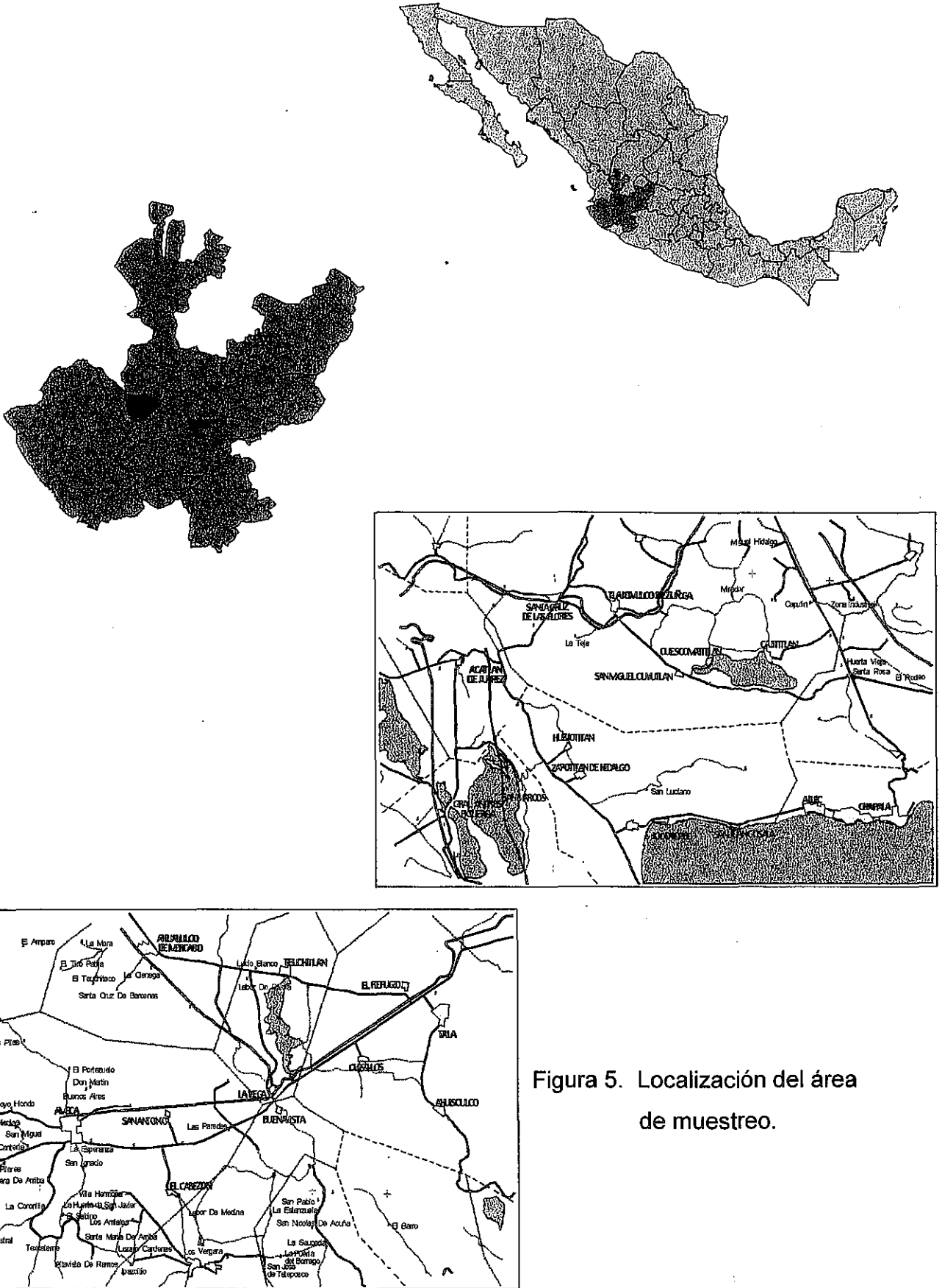
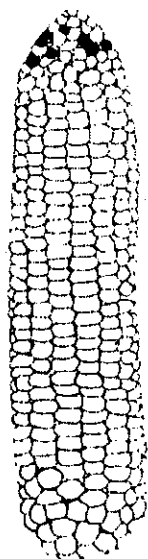
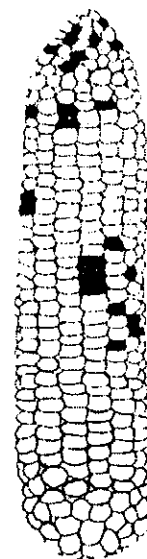


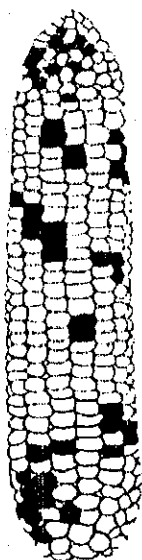
Figura 5. Localización del área de muestreo.



Daño visual 0-2 %



Daño visual 2-10 %



Daño visual 10-25 %



Daño visual 25-50 %

Figura 6. Escala de clasificación del daño visual de las mazorcas (Rodríguez, 1994).

### 7.1.2. Aislamiento e identificación de *F. verticillioides* .

El aislamiento del hongo se realizó a partir de muestras de maíz de campo de ambas localidades, cosechadas, secadas y molidas previamente. Se aplicó la siguiente técnica. Figura 7.

1. En un tubo de ensaye se colocó 1 g de muestra con 9 mL de agua destilada estéril (dilución 1/10 ) y se agitó durante 30 segundos.
2. Se pasó 1 mL de la dilución a un segundo tubo con 9 mL de agua destilada (dilución 1 /100) y se agitó durante 30 segundos, posteriormente se hizo una tercera dilución en un tercer tubo (dilución 1/1000 ).
3. Se agregó 0.1 mL de cada dilución sobre el medio selectivo de Nash-Sneider dispersándose con una varilla de vidrio previamente esterilizada. Se prepararon 3 repeticiones por muestra.
4. Se incubó durante 4 a 5 días a una temperatura entre 20 y 25 °C y se procedió a la identificación de la especie y a la cuantificación de unidades formadoras de colonias (UFC).
5. Se seleccionaron las cajas de Petri de la dilución donde se desarrollaron entre 10 y 100 colonias, el número de UFC se multiplicó por 10 y luego por el denominador de la dilución correspondiente (10, 100 ó 1000).

Preparación del medio Nash – Sneider:

Contiene:	15.5 g	Difco peptona
	1.0 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	0.5 g	MgSO <sub>4</sub>
	20.0 g	Agar bacteriológico
	1.0 g	Penta-cloro-nitro-benceno (terraclor)
	1000 mL	Agua destilada

El medio se ajustó a un pH de 5.5 a 6.5, con HCL 0.1 N, se esterilizó en autoclave a 15 lb durante 20 minutos, se le agregaron 20 mL de sulfato de estreptomicina en solución (5 g de estreptomicina, 750 unidades de estreptomicina

base/mg en 100 mL de agua destilada) y 12 mL de sulfato de neomicina en solución (1 g de sulfato de neomicina, 702 mg de neomicina base/mg en 100 mL de agua destilada) por cada litro, posteriormente se distribuyó a las cajas de Petri previamente esterilizadas.

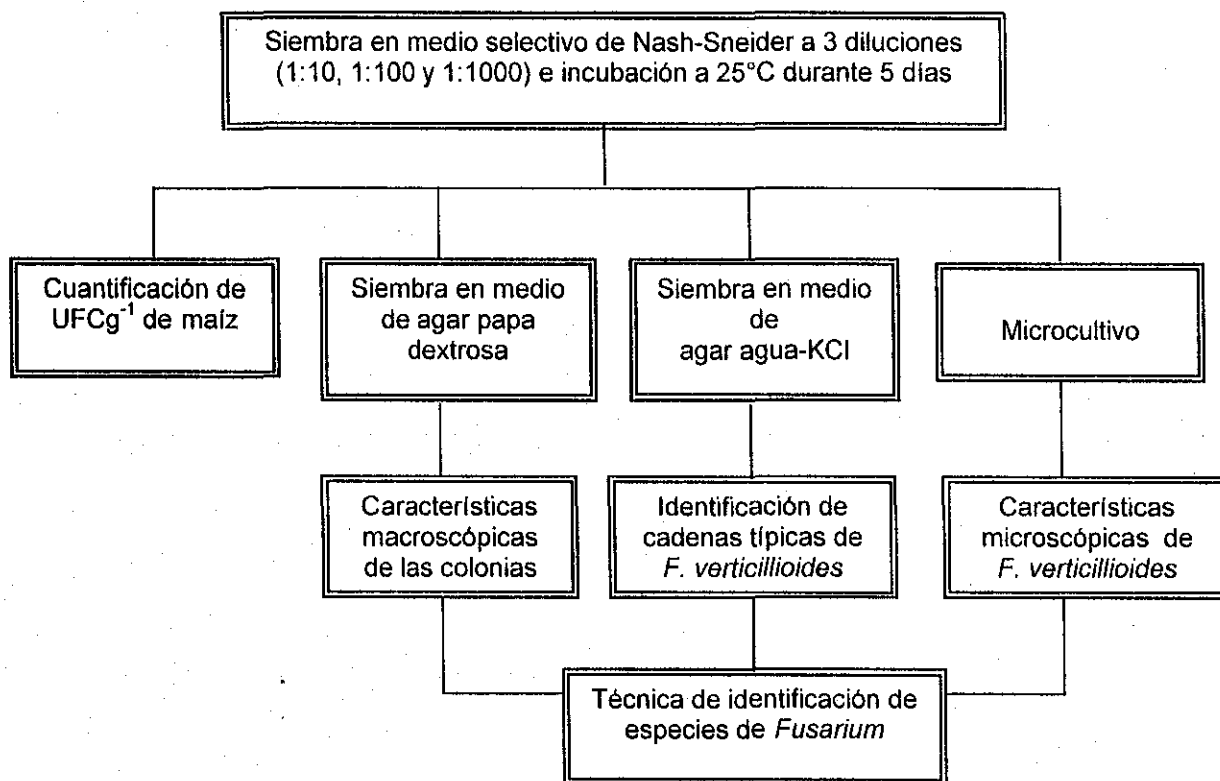


Figura 7. Aislamiento e identificación de *F. verticillioides* (Nelson *et al.*, 1983).

La identificación de la especie se hizo a partir de colonias aisladas, en el medio selectivo para especies de *Fusarium*, las cuales se seleccionaron por sus características típicas de crecimiento descritas en el Manual de Nelson *et al.* (1983). Después se resembraron en papa dextrosa agar (PDA), en agar agua-KCl (5 g de KCl + 15 g de agar bacteriológico en un litro de agua destilada) y en microcultivo.

### 7.1.3. Cuantificación de fumonisinas en maíz de campo.

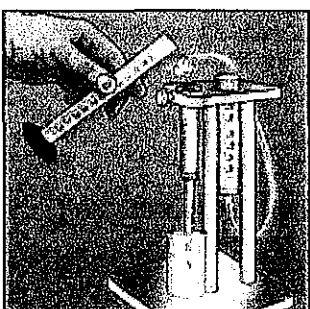
La detección y cuantificación se realizó mediante la técnica de cromatografía por inmovilización de anticuerpos y detección fluorométrica (Ware *et al.*, 1994). (Figura 8).

1. Se colocaron 50 g de muestra con 5 g de cloruro de sodio en una licuadora.
2. Se agregaron 100 mL de metanol al 80% y se licuó a alta velocidad durante 1 minuto.
3. Se filtró en papel aflautado de poro fino y se colectó en un vaso de precipitado.
4. Se diluyeron 10 mL de extracto filtrado en 40 mL de solución amortiguadora de fosfatos (PBS).
5. Se filtró el extracto diluido con papel de fibra de vidrio y 10 mL del mismo se agregaron a la columna de Fumonitest (Vicam).
6. Se lavó dos veces la columna con 10 mL de PBS al 0.1%.
7. Se eluyeron las fumonisinas con 1 mL de metanol grado HPLC y se colectó el eluante en una cubeta de vidrio para fluorómetro.
8. Se agregaron 0.5 mL del derivatizante de O-phthaldialdehído y 0.5 mL de mercaptoetanol. La lectura de la concentración de fumonisinas se realizó a los 4 minutos.

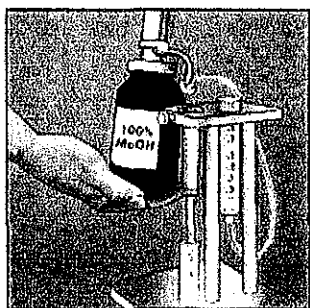
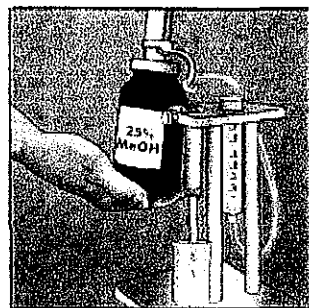


Extracción: 50 g de muestra con 5 g de NaCl y 100 ml de metanol al 80 %.

Filtración: papel aflautado de poro fino.

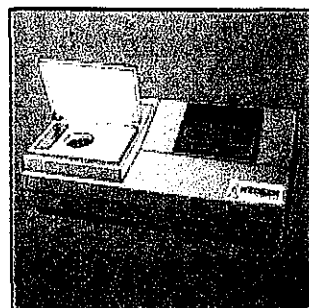


Dilución: 10 mL del extracto y 40 mL de solución amortiguadora PBS se mezcla y filtra en microfibra  
Cromatografía de afinidad:  
10 mL del extracto de la muestra se pasa a través de la columna a un flujo de 1 a 2 gotas por segundo.



Lavado: con 10 mL de la solución PBS se lava la columna (se repite).

Elución: en tubo se recuperan las fumonisinas con 1 mL de metanol grado HPLC y derivatizan.



Lectura: Insertar el tubo dentro del Fluorómetro serie 4 Vicam previamente calibrado.

Figura 8. Determinación de fumonisinas por cromatografía de inmunoafinidad y detección fluorométrica (Ware *et al.*, 1994).

## 7.2. Producción de fumonisinas por cepas de *F. verticillioides*.

Las cepas de *F. verticillioides* se identificaron a partir de conidios recuperados en extracto de malta agar (EMA) y se dejaron incubar 10 días a 25 °C, obteniendo el micelio aéreo mediante agua destilada estéril, posteriormente se agregaron a 40 mL de medio líquido pre-enriquecido de EMA y se incubaron con agitación orbital (100 rpm) durante 24 horas a 25 °C. Se cuantificaron los conidios en una concentración de  $10^7$  y se agregaron al fermentador para preparar el inóculo.

Se adaptó un fermentador con un matraz Erlenmeyer de 300 mL y tapón de gasa donde se colocaron 40 g de maíz parcialmente molido y se agregaron 11 mL de agua destilada, dejando 1 hora para después esterilizar en autoclave a 15 lb de presión durante 30 minutos. Una vez realizada la inoculación de las cepas de *F. verticillioides* se incubó en la oscuridad durante 30 días a 25 °C (Desjardins *et al.*, 1994) (Figura 9).

### 7.2.1. Extracción y limpieza de las muestras.

1. Se colocaron 15 g de muestra en una botella de boca ancha con 100 mL de acetonitrilo: agua (1:1 v/v) y se agitaron durante 30 minutos.
2. Se tomó una alícuota de 25 mL de extracto, decantó y filtró.
3. Se acondicionó una columna  $C_{18}$  con 5 mL de metanol, seguido por 5 mL de cloruro de potasio al 1%; 2 mL del extracto filtrado se combinaron con 5 mL de cloruro de potasio al 1% y se aplicaron a la columna, posteriormente se lavó con 5 mL de cloruro de potasio al 1% seguido por 2 mL de acetonitrilo: cloruro de potasio al 1% (1:9 v/v).
4. Las fumonisinas se extrajeron de la columna  $C_{18}$  con 4 mL de acetonitrilo:agua (7:3 v/v) y se evaporaron a sequedad.

### 7.2.2. Confirmación de fumonisinas por Cromatografía de capa fina.

Se aplicó la técnica de cromatografía de capa fina (Rottinghaus *et al.*, 1992) para confirmar la presencia de las fumonisinas en el maíz que se incubó con las cepas de *F. verticillioides*. Descripción de la técnica:

1. Se disolvió la muestra seca en un vial con 100  $\mu$ l de acetonitrilo:agua (1:1 v/v) y 10  $\mu$ l se aplicaron a la placa de cromatografía C<sub>18</sub>, así como 10  $\mu$ l del estándar de FB<sub>1</sub> en tres diluciones (5,10,100  $\mu$ g/g) en acetonitrilo:agua (1:1 v/v).
2. El desarrollador (fase móvil) que se aplicó a la placa fue metanol:cloruro de potasio al 1% (6:4 v/v).
3. Después la placa se secó al aire y se le aplicó un buffer de borato de sodio al 0.1 M (pH 8-9) seguido de fluorescamina (0.4 mg/mL de acetonitrilo).
4. Un minuto después se aplicó acetonitrilo:ácido bórico (6:4 v/v) y secó a temperatura ambiente.
5. La placa se examinó bajo luz ultravioleta con longitud de onda de 254 y 366 nm, y se realizó la detección de forma cualitativa.

### 7.2.3. Cuantificación de fumonisinas producidas en laboratorio.

Se realizó la cuantificación de fumonisinas por la técnica de cromatografía por inmunoafinidad y detección fluorométrica (Fumonitest) modificada por laboratorios Vicam para la determinación de niveles mayores a 100  $\mu$ g/g. La modificación consistió en diluir el extracto en 49 mL de PBS, del cual se tomó 1 mL (equivalente a 0.01 g de muestra) y se pasó por la columna, procediendo al lavado en forma similar a la técnica descrita previamente, al término de la determinación en el fluorómetro el resultado se multiplicó por 100.



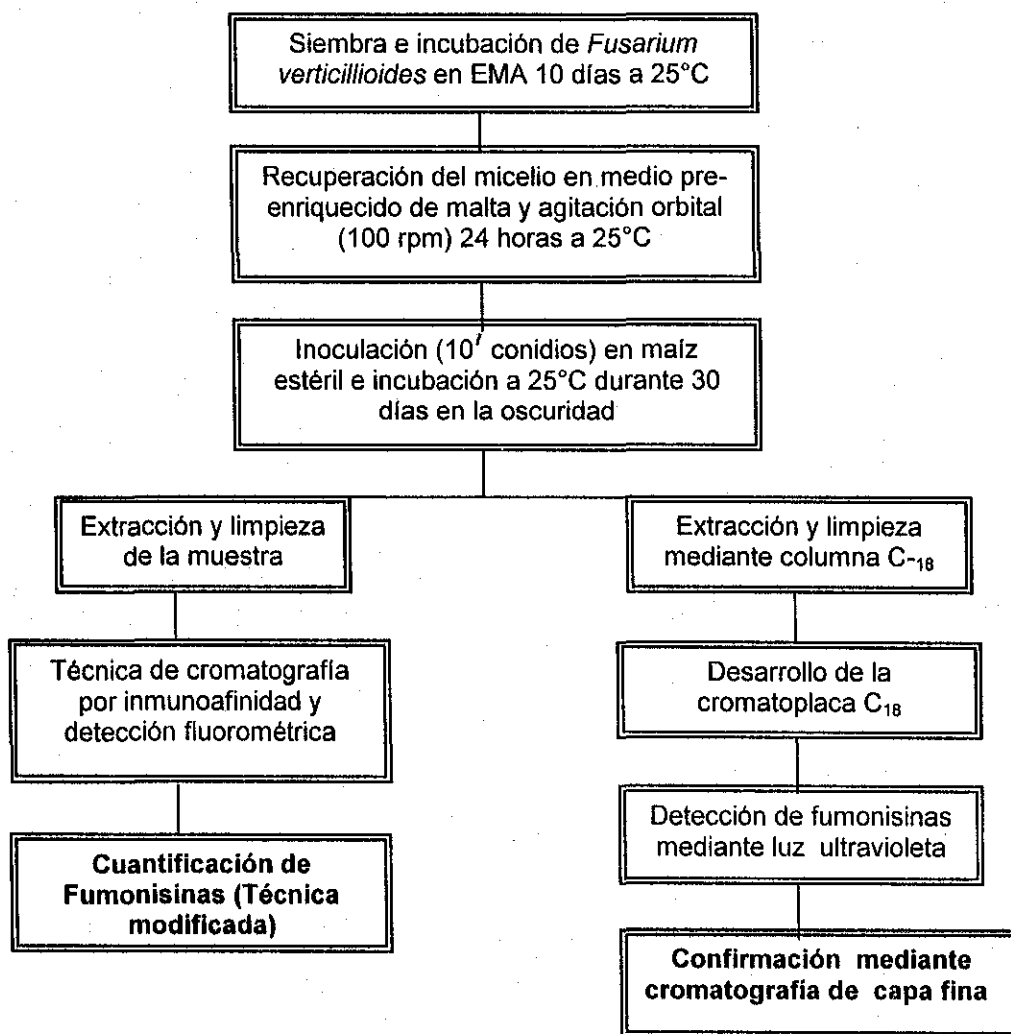


Figura 9. Producción de fumonisinas por las cepas de *F. verticillioides* aisladas en Huejotitán, Jalisco (Desjardins *et al.*, 1994).

### 7.3. Detección de fumonisinas en masa y tortillas en la zona metropolitana de Guadalajara, Jalisco.

Esta etapa consistió en un monitoreo previo de la contaminación de fumonisinas en masa y tortilla que se expenden en la zona metropolitana de Guadalajara (ZMG). Se muestrearon 4 sectores (Juárez, Hidalgo, Libertad y Reforma) obteniendo muestras de 10 molinos por sector. Actualmente la división de los 4 sectores mencionados, ahora corresponden a 7 zonas. Los molinos

seleccionados procesan exclusivamente masa nixtamalizada de grano, información proporcionada por la Cámara Nacional de la Industria de la Masa y Tortilla (CNIMT).

Se recolectaron 500 g tanto de masa como de tortilla por cada uno de los 40 molinos. 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 (Miller) y se almacenaron a temperatura ambiente hasta el análisis.

### **7.3.1. Cuantificación de fumonisinas en masa y tortilla**

La detección y cuantificación de fumonisinas se realizó mediante la técnica de inmunoensayo de ELISA (Fumonisin Quantitative Test Kit, Veratox, de Neogen). (Figura 10).

1. Se licuaron 50 g de muestra con 250 mL de metanol al 70% durante 2 minutos a alta velocidad.
2. Se filtró el extracto con papel Whatman N° 1 y se colectaron 10 mL.
3. Se diluyeron 100 µL del extracto de la muestra en los frascos de dilución del kit agitando para homogeneizar.
4. Se colocaron 100 µL del conjugado a cada pozo (microceldilla) y posteriormente se agregaron 100 µl de la dilución de la muestra y de los estándares.
5. Se transfirieron 100 µL de la muestra con el conjugado a los pozos recubiertos de anticuerpos.
6. Se incubó a temperatura ambiente por 15 minutos, agitando cada 5 minutos por 30 segundos, sin salpicar el contenido de una celdilla a otra.
7. Después de 15 minutos se eliminó el contenido de los pozos y se lavó con agua destilada, secando con papel absorbente repitiendo 5 veces el lavado.

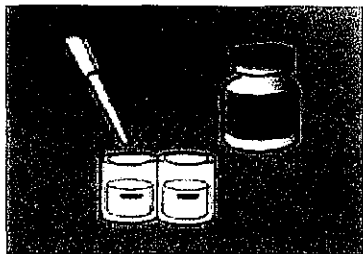
8. Se agregaron 100  $\mu$ L del substrato K-azul y se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos.
9. Se detuvo la reacción con 100  $\mu$ L de solución diluida de  $H_2SO_4$  por pozo.
10. Se limpió la base de las microceldillas y se leyó la densidad óptica en un Lector de ELISA (EL 301, Biotec), utilizando el filtro de 650 nm. (Figura 10).

#### **7.4. Estudio del proceso de nixtamalización y elaboración de tortilla.**

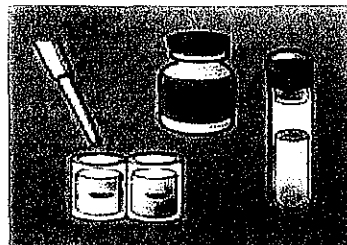
De acuerdo a la CNIMT, Delegación Regional en el Estado de Jalisco del número total de molinos de nixtamal en el Sector Reforma (Universo de estudio) que cuentan con el proceso tradicional de elaboración de la tortilla se decidió muestrear 4 molinos al azar. Los molinos del sector Reforma se localizan al sureste de la ZMG. La Figura 11 presenta las etapas del proceso y las variables secundarias estudiadas.

##### **7.4.1. Muestreo de productos del proceso.**

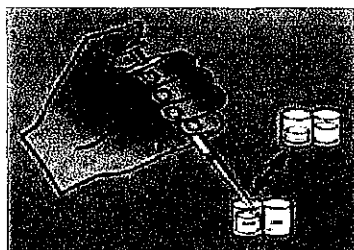
Se obtuvieron muestras de 500 g de maíz, nixtamal, masa y tortilla, registrándose condiciones de temperatura, humedad y tiempos de cocción durante el proceso de nixtamalización y elaboración de la tortilla, con la finalidad de valorar su efecto sobre los niveles de fumonisinas (Figura 12). Las muestras se trasladaron al laboratorio de Micotoxicología del Departamento de Salud Pública del CUCBA, donde se procedió a la determinación de los niveles de fumonisinas mediante el método de cromatografía por inmunoafinidad con detección fluorométrica, previamente descrito (Ware *et al.*, 1994).



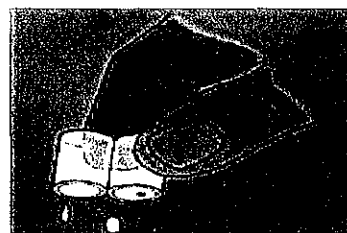
1. Adicionar el conjugado a las celdas.



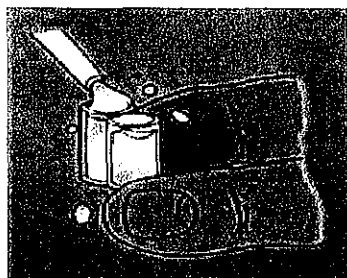
2. Agregar los controles y muestras.



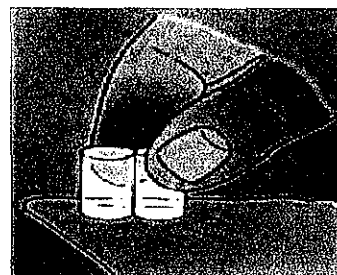
3. Transferir los controles y las muestras a celdas recubiertas con anticuerpos.



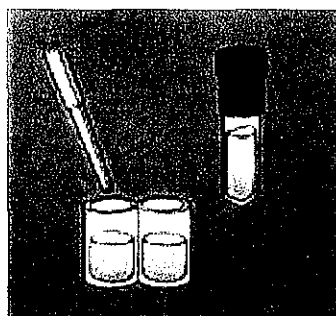
4. Después de incubar 15 min  
Desechar el líquido de las celdas.



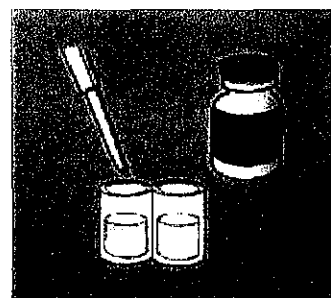
5. Lavar los pocillos 5 veces con agua  
destilada.



6. Retirar el exceso de agua  
golpeando fuertemente sobre  
papel absorbente.



7. Adicionar el sustrato e incubar.



8. Agregar la solución bloqueadora,  
mezclar y leer resultados.

Figura 10. Determinación de fumonisinas por el método de ELISA.

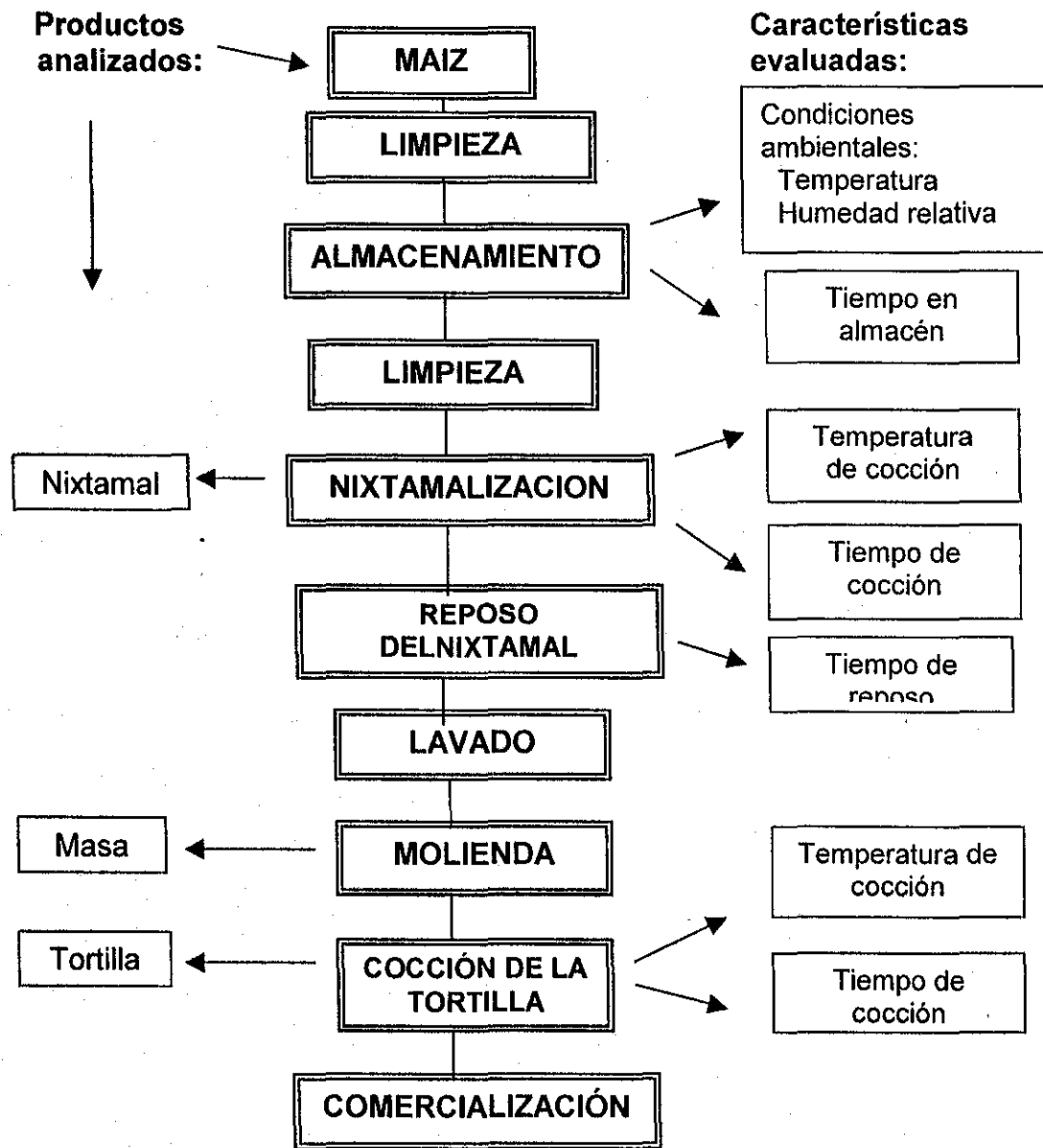


Figura 11. Proceso de nixtamalización y elaboración de la tortilla

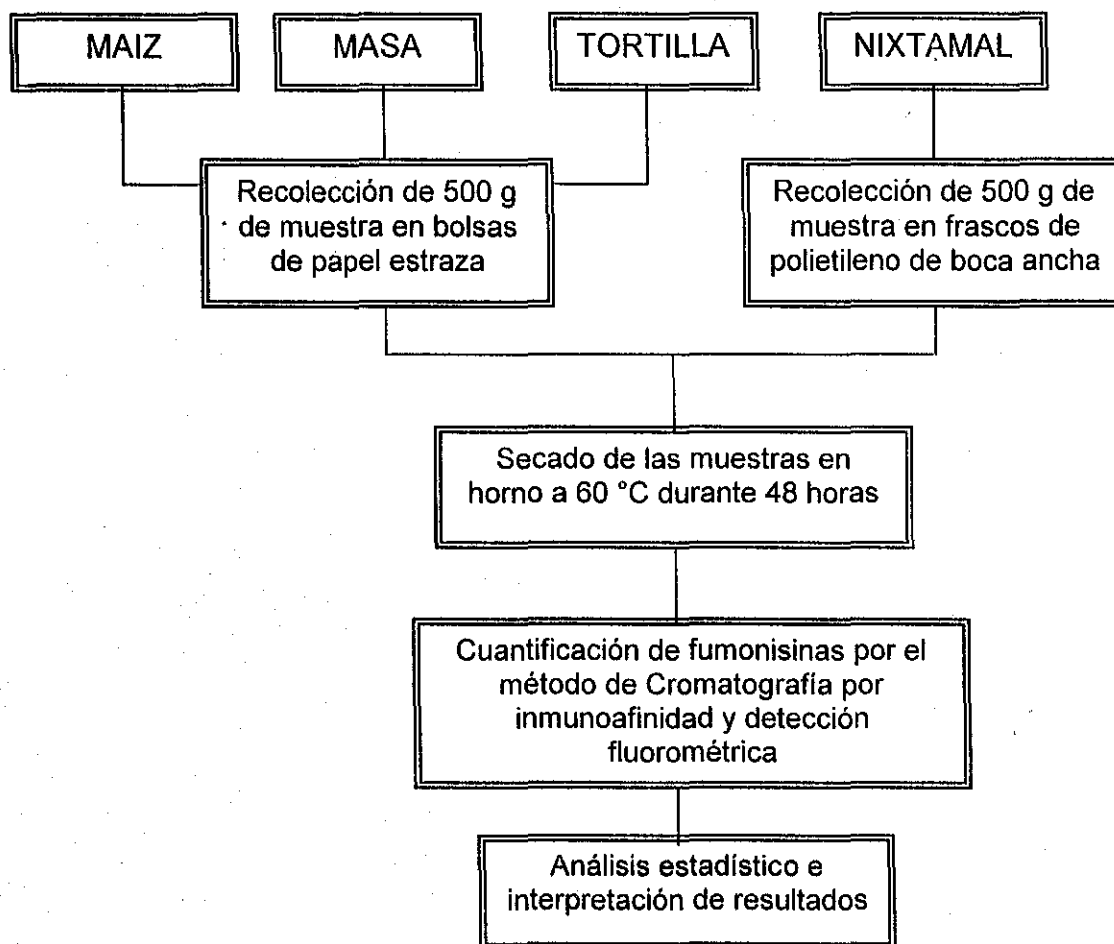


Figura 12. Evaluación del proceso de nixtamalización y elaboración de la tortilla.

## 7.5. Evaluación de la producción de hidrolizados de fumonisinas.

### 7.5.1. Muestreo.

Un año después de realizada la valoración del proceso de nixtamalización se hizo un nuevo muestreo de los 4 molinos del sector Reforma, ubicado al sureste de la ZMG y se obtuvieron muestras de 500 g por producto (maíz, nixtamal, masa y tortilla) de cada molino, se analizaron 3 repeticiones por producto/molino, correspondiendo a 12 submuestras por 4 molinos y un total de 48 observaciones.

### 7.5.2. Extracción y análisis.

Las muestras se desecaron en un horno a 60°C durante 48 horas, se molieron y almacenaron a temperatura ambiente previo al análisis (Figura 13).

Para la extracción y limpieza:

1. Se licuaron 10 g de la muestra con 50 mL metanol:agua (8:2 v/v) durante 2 minutos y se filtró en papel Whatman No. 4.
2. Se agregó el extracto en la columna Supelclean LC-SAX (Supelco) que separa a las fumonisinas y que requirió ser acondicionada con 2 mL de metanol y después con 1 mL de agua destilada. Se adicionó 1 mL del extracto de la muestra a la columna LC-SAX.
3. Una segunda columna C<sub>18</sub>SPE (Supelco) que separa a los hidrolizados de fumonisinas, también acondicionada en forma similar, se adaptó físicamente a la columna LC-SAX para recibir al eluante de la muestra.
4. La columna LC-SAX se lavó con 1 mL de agua, agregando el eluante del lavado a la columna C<sub>18</sub>SPE. Se separaron las dos columnas.
5. La columna LC-SAX se lavó con 500 µL de metanol, los cuales se descartaron y las fumonisinas se eluyeron con 1 mL de metanol:ácido acético (9:1).
6. La columna C<sub>18</sub>SPE se lavó con 500 µL de metanol:agua (5:5 v/v), los cuales se descartaron y el hidrolizado se eluyó con 1 mL de metanol.
7. Los eluyentes se evaporaron en viales de 1.8 mL a 60°C y el residuo fue disuelto en 100 µL de acetonitrilo:agua (5:5 v/v) previo a la determinación (Scott y Lawrence, 1996).

### 7.5.3. Preparación del derivatizante, estándares e hidrolizados.

Se preparó el derivatizante O-phthaldialdehído/mercaptoetanol (OPA/MCE) disolviendo 20 mg de OPA en 500 µL de metanol con 2 mL de borato de sodio al 0.05 M, posteriormente se agregaron 25µL de MCE. Este solvente es estable por

una semana en la oscuridad. Se debe hacer la derivatización 1 minutos antes de inyectar la muestra en el HPLC.

Las soluciones base de los estándares de FB<sub>1</sub> y FB<sub>2</sub> (Sigma Chemical Co.) se prepararon agregando 10 mL de acetonitrilo:agua (2:8 v/v) a 5 mg del estándar. Se hicieron diluciones de 10, 5, 3, 1, 0.5 y 0.3 µg/mL de cada estándar, con objeto de obtener los diferentes puntos de cada una de las 4 curvas de calibración (FB<sub>1</sub>, FB<sub>2</sub>, HFB<sub>1</sub> y HFB<sub>2</sub>).

Las hidrólisis de FB<sub>1</sub> y FB<sub>2</sub> se realizaron según técnica de Thakur y Scott (1996). Los hidrolizados (HFB<sub>1</sub> y HFB<sub>2</sub>) se prepararon a partir de soluciones base de los estándares de FB<sub>1</sub> y FB<sub>2</sub> (10 µg/mL) mezclando 5 mL de la solución base con 5 mL de hidróxido de potasio (KOH) al 1 N, calentando la mezcla en viales cerrados a 70° C durante 1 hora. Después de la limpieza los HFB<sub>1</sub> y HFB<sub>2</sub> se diluyeron a 10, 5, 3, 1, 0.5 y 0.3 µg/mL para obtener las curvas de calibración correspondientes. La hidrólisis se detuvo mediante acidificación con solución de HCL al 2 N (pH 4.5). La formación de HFB<sub>1</sub> y HFB<sub>2</sub> fue confirmada por inyección líquida directa en termoespray-espectrometría de masas.

#### **7.5.4. Cuantificación de FB<sub>1</sub>, FB<sub>2</sub>, HFB<sub>1</sub> y HFB<sub>2</sub>.**

Condiciones del equipo de cromatografía de líquidos (HPLC): Cromatógrafo de líquidos con sistema de bombeo Series 400, Detector de fluorescencia LC-10 e Integrador computarizado LCI-100, Perkin Elmer. Se utilizó una columna Prodigy 5 ODS-2, 250 mm x 4.6 mm x 5 µm de Phenomenex.

Se mezclaron 50 µL del derivatizante OPA-MCE a 12.5 µL de muestra en un vial ámbar de 1.8 mL y se esperó por un minuto. Una vez derivatizada la muestra se inyectaron 30 µL al cromatógrafo de líquidos, pues el loop (espiral o bucle) que se usó es de 20 µL, esto se hace para limpiar los residuos de la muestra anterior, con 30 µL se limpia el loop y recibe a la nueva muestra. La fase móvil fue metanol:



fosfato de sodio monobásico al 0.1 M (8:2 v/v), ajustado a pH 3.3 con ácido fosfórico a una velocidad de flujo de 1 mL/minuto (Shephard *et al.*, 1990). Los tiempos de retención fueron de 7.10-7.76 min (FB<sub>1</sub>), 14.3-16.75 min (FB<sub>2</sub>); 12.08-14.57 min (HFB<sub>1</sub>) y 14.91-15.88 (HFB<sub>2</sub>).

## 7.6. Análisis Estadístico.

Para el estudio estadístico del desarrollo de UFC g<sup>-1</sup> de maíz fue necesaria la transformación numérica de los datos a valores logarítmicos, ya que los primeros no cumplieron el supuesto de normalidad, utilizándose la prueba de homogeneidad de varianzas y se aplicó el análisis de varianza (ANOVA). Donde se encontró diferencia significativa, se aplicó la prueba de Tukey (Snedecor y Cochran, 1997).

La relación estadística entre el daño visual de la mazorca y los niveles de fumonisinas se obtuvo mediante la elaboración de una tabla de contingencia y se aplicó la prueba de Xi cuadrada y el análisis de varianza (Steel y Torrie, 1986).

La valoración de la capacidad productiva de fumonisinas se analizó como variable descriptiva expresada en una tabla de frecuencias y se establecieron las clases de acuerdo al rango máximo y mínimo de fumonisinas en µg/g.

El análisis del nivel de contaminación por fumonisinas en masa y tortillas, así como por el efecto del proceso de nixtamalización y elaboración de la tortilla en molinos de nixtamal en la ZMG, se realizó mediante el análisis de varianza y se aplicaron contrastes ortogonales para la comparación de los niveles promedio de fumonisinas en los diferentes productos. Los resultados de la producción de hidrolizados de fumonisinas se compararon mediante ANOVA y prueba de Tukey para comparación de medias a un nivel de significancia de 95%.

## VIII. RESULTADOS

### 8.1. *F. verticillioides* en el maíz de Huejotitán, Jalisco.

La clasificación del daño visual de las 10 mazorcas por parcela se observa en la tabla 6 resaltando que el mayor porcentaje de las muestras mostraron un daño menor a 10% y sólo una muestra presentó daño marcado (> 25%). El desarrollo de UFC de maíz en medio selectivo de Nash-Sneider permitió observar elevado número de colonias en todos los grupos según el daño visual, el promedio de UFC g<sup>-1</sup> para aquellas con daño < 2% fue de 22,422 UFCg<sup>-1</sup>, 42,157 UFCg<sup>-1</sup> (2-10%); y 418,333 UFCg<sup>-1</sup> (daño visual 10-25%). Puesto que el grupo con mayor daño visual mostró sólo una observación, no se consideró para su comparación. El análisis de varianza se realizó mediante la transformación logarítmica de los valores de unidades formadoras de colonias siendo similares estadísticamente entre grupos ( $p > 0.05$ ).

Tabla 6. Clasificación de las mazorcas, unidades formadoras de colonia por gramo (UFCg<sup>-1</sup>) y *F. verticillioides* en Huejotitán, Jalisco.

Daño Visual de la Mazorca (n)	% De Muestras	<i>F. verticillioides</i> % Positivas	Rango de UFCg <sup>-1</sup>	Promedio	Desviación Estándar
< 2 % (9)	45	78	300 – 80,000	22,422	33,255
2 – 10 % (7)	35	86	3,000 – 90,000	42,157	56,843
10 – 25 % (3)	15	100	5,000 – 1'160,000	418,333	643,707
25 – 50 % (1)	5	-	-	8,000	-

*Fusarium verticillioides* se aisló en todos los grupos excepto en el grupo con daño visual 25-50%, el porcentaje de aislamiento fue de 78% y 86% en los grupos con daño visual < 2% y 2-10 %, mientras que se aisló en el 100% en las muestras con daño mayor (daño visual 10-25%).

La identificación de *F. verticillioides* se realizó mediante la observación de las características macroscópicas de crecimiento de las colonias en papa dextrosa con agar, así como por las características morfológicas y microscópicas y la formación de las cadenas típicas de microconidios observadas en el microscopio compuesto (Figura 15).

En el medio de cultivo agar papa dextrosa se produjeron 4 tipos de pigmentaciones, las más comunes fueron el rojo carmín (8%), violeta oscuro (22%), violeta pálido (33%) y lila (37%).

Las cepas en el medio de cultivo de agar cloruro de potasio formaron abundantes cadenas de microconidios, que es una de las características morfológicas distintivas de esta especie de *Fusarium*. Las cadenas se pudieron distinguir con mayor facilidad a partir del microcultivo en el microscopio compuesto, observándose micelio hialino de crecimiento rápido, septado con abundantes ramificaciones, conidióforos simples y ramificados, microconidios hialinos unicelulares, ovales, producidos en forma individual, en falsas cabezas o en cadenas largas y microconidios hialinos, falcados con 3 a 5 septas producidos en fialides simples y esporodoquios (Figura 16). Estas características morfológicas y de cultivo son de valor taxonómico para la identificación de la especie *Fusarium verticillioides*.

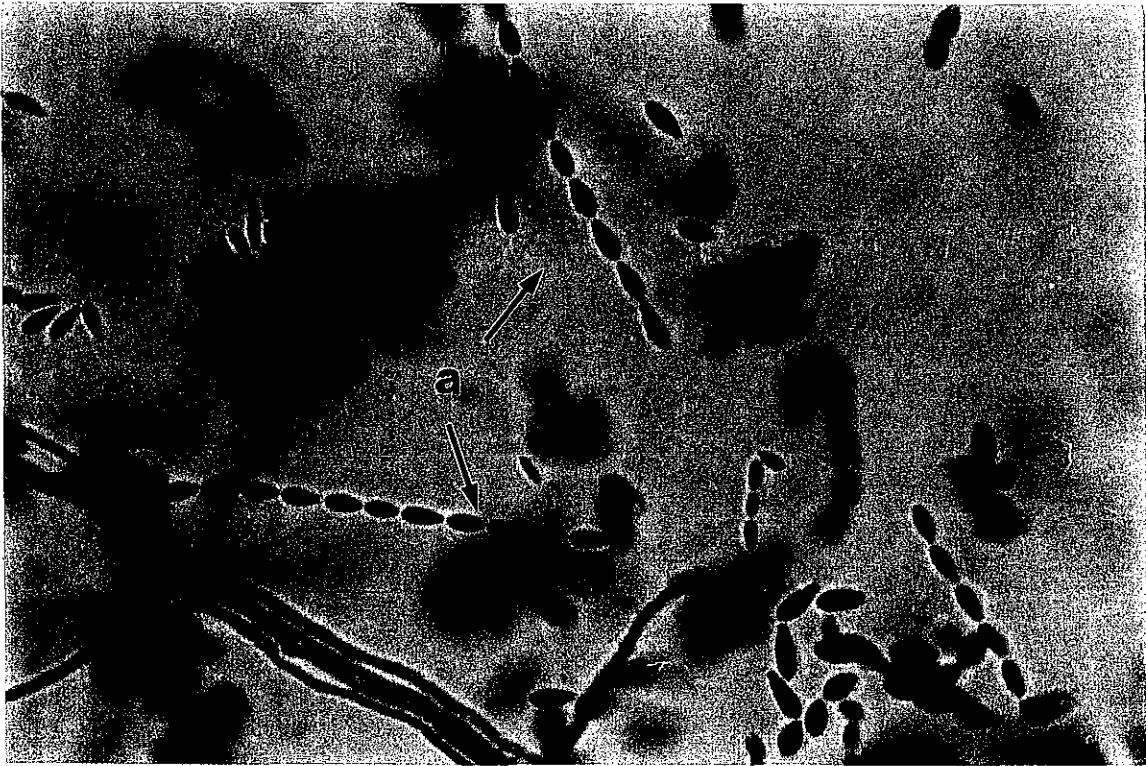


Figura 13.(a) Cadenas de microconidios típicas de *Fusarium verticillioides* (1250 X).



Figura 14. Características morfológicas de *F. verticillioides*: a) micelio hialino septado, b) monofiálides, c) microconidios en falsas cabezas y d) microconidios ovoides unicelulares (500 X).

## 8.2 *F. verticillioides* en el maíz de Ameca, Jalisco.

La clasificación del daño visual de las mazorcas permitió detectar alto porcentaje de mazorcas aparentemente sanas en las variedades UDG 600 y 602 (70%), mientras que la variedad UDG 601 sólo presentó el 40% de mazorcas aparentemente sanas, no se encontraron mazorcas con daño entre 10 y 25% ni con daño mayor del 50% (Tabla 7).

El cultivo en medios selectivos permitió el aislamiento de *Fusarium verticillioides* en el 90% de las mazorcas de la variedad UDG 600 y en el 100% de las muestras de las variedades UDG 601 y 602, las características de cultivo en medio de APD mostraron menor variación en la pigmentación, encontrándose principalmente tonalidades lila (65%) y violeta (35%). La morfología del hongo mostró características similares a las encontradas en las cepas aisladas de Huejotitán.

Tabla 7. Clasificación del daño visual de las mazorcas en las variedades de maíz UDG 600, 601 y 602 en Ameca, Jalisco (% de muestras).

Daño Visual (%)	UDG 600 % de Muestras	UDG 601 % de Muestras	UDG 602 % de Muestras
0 - 2	70	40	70
2 - 10	30	40	10
25 - 50	0	20	20

El elevado porcentaje de muestras aparentemente sanas no se considera determinante sobre la inocuidad del maíz, ya que la variedad con mayor número de mazorcas sanas presentó el 100% de incidencia de *F. verticillioides*, mientras que en las variedades con mayor número de mazorcas dañadas la incidencia del hongo fue menor.

El desarrollo de unidades formadoras de colonias en el maíz fluctuó de 8 a 52,571 UFCg<sup>-1</sup>, siendo los valores promedio de 2,966.9, 5,242.3 y 6,579.5 UFCg<sup>-1</sup> en las variedades UDG 600, 601 y 602 respectivamente (Tabla 8), no se encontró diferencia estadística entre las variedades de maíz, para dicho análisis fue necesaria la transformación logarítmica de los datos.

Tabla 8. Desarrollo de unidades formadoras de colonia por gramo (UFCg<sup>-1</sup>) de maíz en las variedades UDG 600, 601 y 602 en Ameca, Jalisco.

	UDG 600	UDG 601	UDG 602
Promedio	2,966.9	5,242.3	6,579.5
Desviación estándar	6,127	14,128	16,221
Máximo	20,000	43,538.4	52,571.4
Mínimo	27.05	8.42	83.3

### 8.3 Fumonisinias presentes en el maíz de Huejotitán y Ameca, Jalisco.

Los niveles de fumonisinias detectados en la variedad de maíz cosechada en las 4 parcelas de Huejotitán, Municipio de Jocotepec, Jalisco, fluctuaron en un rango de 8.5 µg/g a 17 µg/g, con un valor promedio de 10.2 µg/g. Cuando se compararon de acuerdo al daño visual los niveles promedio fueron de 10.21, 10.55, 9.33 y 11 µg/g en los grupos de daño visual: A(<2%), B(2-10%), C(10-25%) y D(25-50%) respectivamente, similares estadísticamente ( $p > 0.05$ ) (Tabla 9). En Ameca se detectaron en el total de las muestras de maíz, sin encontrarse diferencia estadística ( $p > 0.05$ ) entre variedades, los niveles promedio fueron de 6.6 µg/g para la variedad UDG 600, 6.12 µg/g para la UDG 601 y 6.78 µg/g para la variedad UDG 602. La comparación de los niveles promedio entre ambas localidades mostró diferencia estadística a un nivel de significancia  $p < 0.05$ .

Al agruparse las muestras de Ameca de acuerdo al daño visual de las mazorcas independientemente de la variedad de maíz, los niveles promedio fueron de 6.27, 8.3 y 9.05 en las parcelas A, B y D respectivamente, sin que se encontrara diferencia estadística ( $p > 0.05$ ) entre ellas. Cuando se analizó si se presentaba relación estadística de los niveles de fumonisinas con daño visual y UFC  $g^{-1}$ , sólo se valoró para los grupos A, B y C en Huejotitán y en Ameca los grupos A, B y D.

En Huejotitán se observó que a mayor daño visual en mazorcas mayor desarrollo de UFC  $g^{-1}$  sin que existiera diferencia estadística ( $p > 0.05$ ), sin embargo los niveles de fumonisinas fueron similares en todos los grupos, sin que se considerara el grupo D por presentarse una observación. En Ameca el estudio de relación entre el daño visual y el desarrollo de UFC  $g^{-1}$  permitió detectar diferencia estadística ( $p < 0.05$ ) mediante el análisis de varianza y una relación positiva que indica que a mayor daño visual se incrementa el desarrollo de unidades formadoras de colonias sin que fuera significativa la relación entre el daño visual y los niveles de fumonisinas de manera similar que en Huejotitán.

Tabla 9. Relación entre daño visual de la mazorca, UFC  $g^{-1}$  y niveles de fumonisinas en maíz cosechado en Huejotitán y en Ameca, Jalisco.

DAÑO VISUAL	HUEJOTITÁN				AMECA			
	UFC $g^{-1}$	Desviación Estándar	FUM $\mu g/g$	Desviación Estándar	UFC $g^{-1}$	Desviación Estándar	FUM $\mu g/g$	Desviación Estándar
< 2% A (n)	22,422 (9)	31,353	10.21	1.18	1,968.97 a(18)	4,533	6.27	4.68
2-10% B (n)	42,157 (7)	52,000	10.55	2.83	1,884.50 a (8)	987	8.3	654
10-25% C (n)	418,333 (3)	52,584	9.33	0.478	-	-	-	-
25-50% D(n)	8000 (1)	-	11.00	-	24,343.71 b (4)	23,925	9.05	4.8

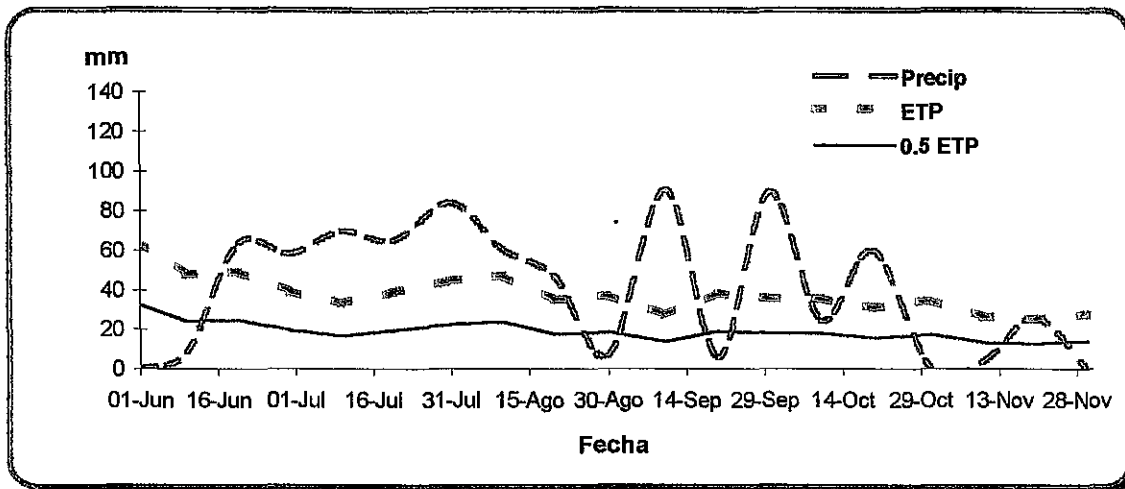
FUM = fumonisinas

Las literales indican diferencia estadística  $p < 0.05$ .

Al comparar las dos localidades se observó mayor desarrollo de UFCg<sup>-1</sup> en Huejotitán, lo cual coincide con una fluctuación pluvial de la época de cultivo (Figura 10), lo que favoreció además que se presentaran mayores niveles de fumonisinas en todos los grupos. En Ameca las condiciones climatológicas fueron favorables al cultivo durante los 3 primeros meses del cultivo al presentarse una precipitación pluvial entre 60 – 90 mm (Figura 7), lo que pudo influir en un menor desarrollo de UFCg<sup>-1</sup>.

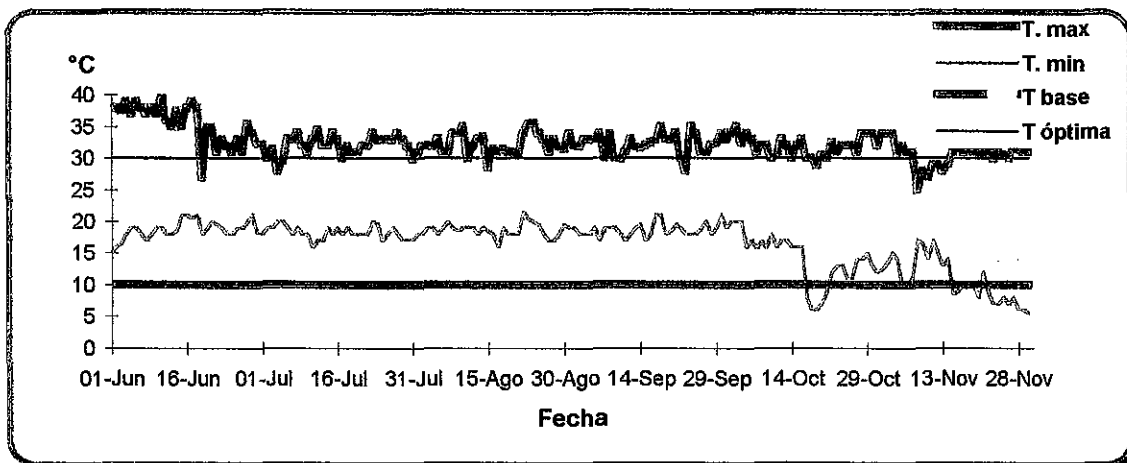
La valoración de las condiciones ambientales en ambas localidades se presentan en las Figuras 15 – 18, donde se aprecian fluctuaciones en la precipitación pluvial, en tanto que las temperaturas registradas fueron similares, debiéndose considerar que en Huejotitán el estudio se desarrolló durante la cosecha de 1996 y en Ameca en 1997.





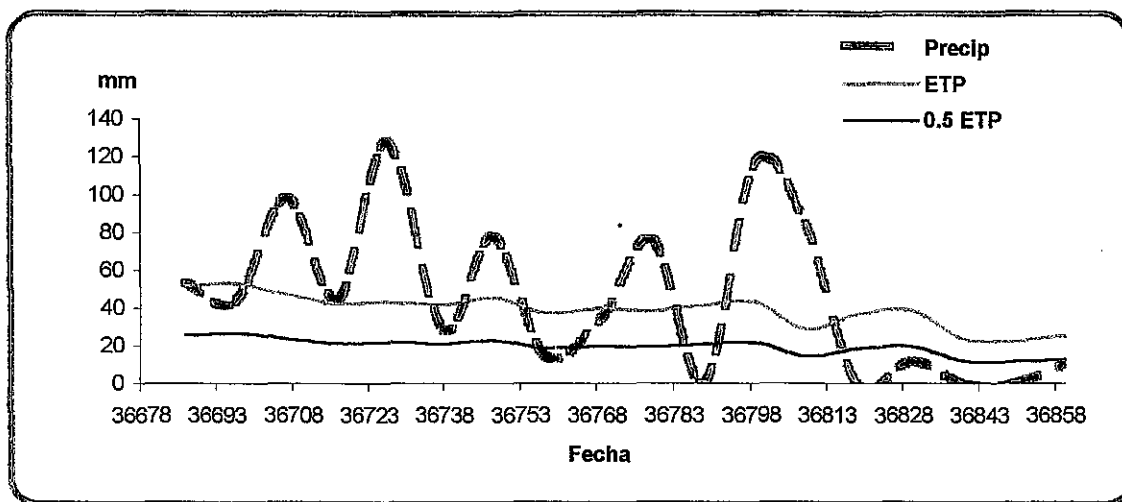
Precip: precipitación. ETP: evapotranspiración.

Figura 15. Precipitación y evaporación acumuladas de junio a noviembre de 1997 en Ameca, Jalisco.



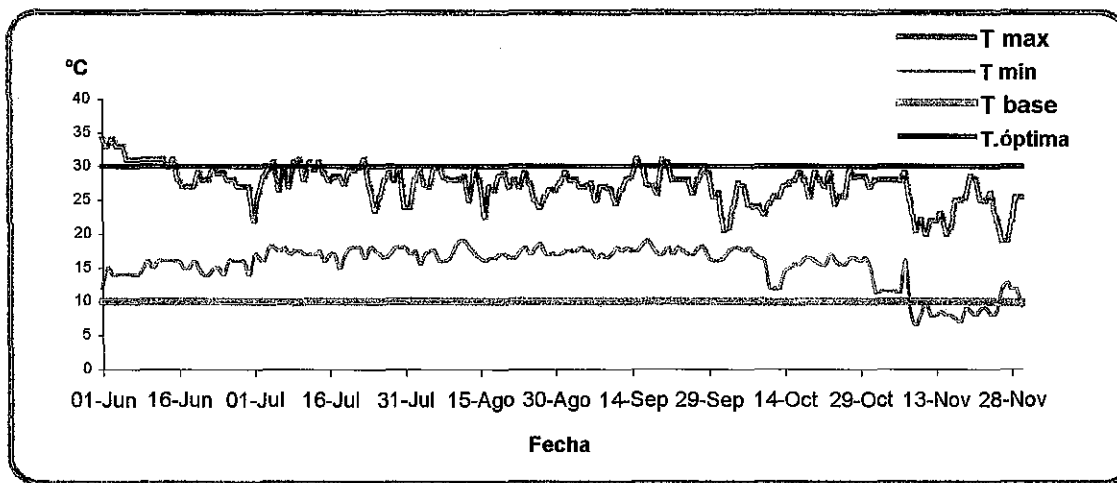
T. max.: temperatura máxima. T. min.: temperatura mínima. T. base: temperatura base.  
T. óptima: temperatura óptima.

Figura 16. Temperaturas máximas y mínimas registradas de junio a noviembre de 1997 en Ameca, Jalisco.



Precip: precipitación. ETP: evapotranspiración.

Figura 17. Precipitación y evaporación acumuladas de junio a noviembre de 1996 en Huejotitán, Jalisco.



T. max:: temperatura máxima. T. min: temperatura mínima. T. base: temperatura base.  
T. óptima: temperatura óptima.

Figura 18. Temperaturas máximas y mínimas registradas de junio a noviembre de 1996 en Huejotitán, Jalisco.

#### 8.4 Capacidad productiva de fumonisinas.

Los resultados de la producción de fumonisinas por las cepas aisladas de *Fusarium verticillioides* en el maíz se presentan en la tabla 10, siendo el 93.8% de las cepas (15/16) productoras de fumonisinas, con mínimo de 700  $\mu\text{g/g}$  y máximo de 2,280  $\mu\text{g/g}$ , encontrándose que el 80% de las cepas tuvieron una producción mayor de 1000  $\mu\text{g/g}$ .

Tabla 10. Capacidad productiva de fumonisinas por cepas de *F. verticillioides* aisladas en el maíz de Huejotitán, Jalisco.

Rango de fumonisinas ( $\mu\text{g/g}$ )	Cepas productoras Positivas/Total	Porcentaje	Frecuencia Acumulada (%)
2001-2500	3/15	20.0	20.0
1501-2000	3/15	20.0	40.0
1001-1500	7/15	46.7	86.7
700-1000	2/15	13.3	100.0

#### 8.5. Contaminación de fumonisinas en masa y tortillas en la zona metropolitana de Guadalajara (ZMG).

El análisis de la masa y tortillas recolectadas en los diferentes expendios de la ZMG permitió detectar la presencia de fumonisinas en el 100% de las muestras (n=80). Los niveles de fumonisinas se observan en la Tabla 11, en la masa fluctuaron en un rango de 0.5 a 3.8  $\mu\text{g/g}$ , con un valor promedio de 1.63  $\mu\text{g/g}$  cuando se agruparon de manera general los resultados, encontrándose los niveles mayores en los sectores Libertad (SL) y Reforma (SR), siendo diferentes estadísticamente ( $p < 0.05$ ) a los sectores Hidalgo (SH) y Juárez (SJ).

Tabla 11. Niveles de fumonisinas en la masa y tortilla que se expenden en la zona metropolitana de Guadalajara ( $\mu\text{g/g}$ )

Producto	Sector Libertad		Sector Hidalgo		Sector Juárez		Sector Reforma	
	Masa	Tortilla	Masa	Tortilla	Masa	Tortilla	Masa	Tortilla
Promedio	2.013	1.277	1.506	0.883	1.24	1.0	1.77	1.396
Desviación	0.999	0.979	0.460	0.418	0.375	0.459	0.924	0.788
Mínimo	0.5	0.1	0.73	0.16	0.7	0.5	0.7	0.56
Máximo	3.8	3.3	2.43	1.5	1.8	2.0	3.4	3.1

La detección de fumonisinas en las tortillas fluctuó de 0.1 a 3.3  $\mu\text{g/g}$ , con un valor promedio de 1.130  $\mu\text{g/g}$ , 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. La Figura 19 muestra los valores promedio de fumonisinas por sector.

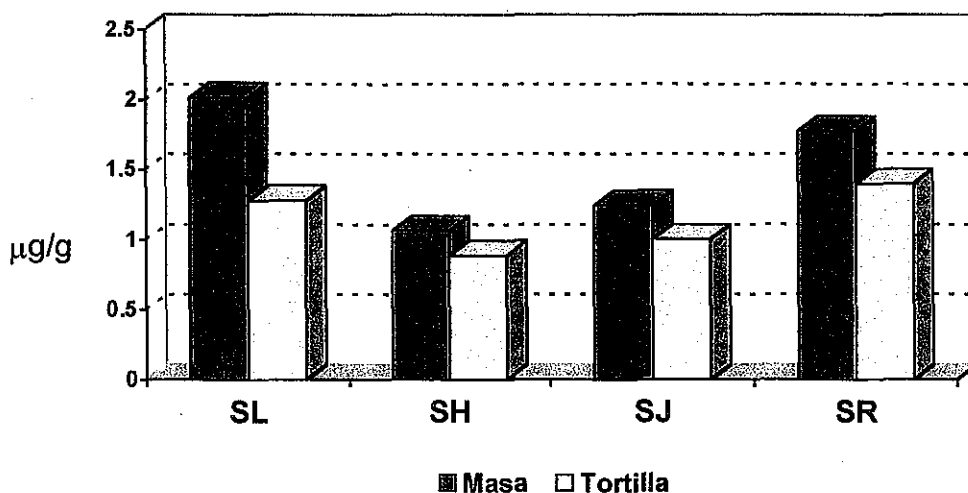


Figura 19. Niveles promedio de fumonisinas presentes en masa y tortilla detectados en la ZMG.

Se encontró reducción significativa 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% (Tabla 12).

Tabla 12. Porcentaje de reducción de fumonisinas de las tortillas respecto a la masa de la ZMG

SECTOR	MASA ( $\mu\text{g/g}$ )	TORTILLA ( $\mu\text{g/g}$ )	REDUCCIÓN (%)
Libertad	2.013	1.277	36.56
Hidalgo	1.506	0.883	41.37
Juárez	1.24	1.0	19.40
Reforma	1.77	1.396	21.13

#### 8.6. Estudio del proceso de nixtamalización y elaboración de la tortilla sobre los niveles de fumonisinas.

Puesto que el sector Reforma se consideró uno de los sectores de la ZMG con mayor contaminación por fumonisinas, se seleccionó para dicho estudio. En los sitios de almacenamiento del maíz se determinaron condiciones ambientales, así como el contenido de humedad del grano en el cual se determinaron las concentraciones de fumonisinas.

Durante los días de almacenamiento del maíz se registraron en los molinos temperaturas máximas de 30°C a 35°C y temperaturas mínimas entre 10°C y 17°C, en tanto que la humedad relativa fluctuó desde 63% hasta 88% (Tabla 13).

Tabla 13. Temperatura y humedad relativa de almacenamiento registradas en los molinos del sector Reforma.

Molinos	Temperatura °C			Humedad Relativa %
	Mínima	Máxima	Promedio	
A	15	30	22.5	72
B	13	35	24.0	63
C	10	31	20.5	88
D	17	35	26	85

El proceso de nixtamalización consistió en agregar cal ( $\text{Ca(OH)}_2$ ) a razón de 80 a 100 g por litro de agua, para 1000 g de maíz. Las temperaturas y tiempo de cocción registradas en cada molino se presentan en la Tabla 14. El promedio de temperatura registrada fue de 79.63 °C con un rango de 8.4 °C. En tanto que el tiempo de cocción varió desde 8 a 19 minutos, este proceso se completó hasta que se alcanzó un período de reposo, el cual consistió en dejar enfriar a temperatura ambiente el nixtamal durante un lapso mayor a 10 horas, teniendo como valor más alto 23 horas.

Tabla 14. Temperatura, tiempo de nixtamalización y de reposo del nixtamal.

Molinos	Tiempo de Nixtamalización (minutos)	Temperatura de Nixtamalización (°C)	Tiempo de Reposo del Nixtamal (horas)
A	8.0	79.1	21.0
B	13.0	85.0	23.0
C	19.0	77.8	19.5
D	10.0	76.6	10.5
Promedio	12.5	79.63	18.5
C.V	38.36	4.68	29.85

Una vez concluido el reposo del nixtamal, éste se lavó con agua a temperatura ambiente, con el fin de eliminar el exceso de solución alcalina (nejayote), quedando en condiciones de pasar al molino. El producto que se obtiene mediante la molienda es la masa, durante este proceso la masa incrementó la temperatura debido a la fricción que se presenta en el molino, alcanzando una temperatura promedio de 57.8°C con un rango hasta 2.3°C. Posteriormente se pesaron las porciones de masa de 20 kg y se dejaron en reposo sobre las mesas a temperatura ambiente.

La elaboración de tortillas se realizó mecanizadamente sometiendo la masa al cocimiento sobre bandas metálicas que alcanzaron temperaturas de 135°C a 260°C, con un tiempo de cocción de 31 a 44 segundos, alcanzando las tortillas una temperatura promedio de 86.5°C .

#### **8.6.1. Detección de Fumonisin.**

Respecto a la contaminación por fumonisin en los productos analizados (maíz, nixtamal, masa y tortilla) fue posible detectar niveles de las toxinas en el 100% de las muestras, encontrándose mayor contaminación en el maíz, el cual fue estadísticamente diferente ( $p < 0.05$ ) al resto de los productos.

Los niveles de fumonisin detectados en el maíz se presentan en la Tabla 15, los cuales se consideran elevados por lo que en todos los casos fue posible observar una reducción en el contenido de fumonisin debida al proceso de nixtamalización y elaboración de la tortilla. Los contenidos de fumonisin en el maíz presentaron valores tan elevados como 11.86 µg/g en promedio en el molino A, en tanto que el más bajo fue de 2.43 µg/g en promedio en el molino D. Estos promedios fueron comparados mediante contrastes ortogonales resultando que el maíz del molino A se considera significativamente diferente al recibido en el resto de los molinos (B,C y D) ( $p < 0.01$ ).

Tabla 15. Niveles de fumonisinas en el maíz detectados en los molinos ( $\mu\text{g/g}$ ).

MOLINOS	A	B	C	D
Promedio (ppm)	11.86 <sup>a</sup>	4.3 <sup>b</sup>	4.56 <sup>b</sup>	2.43 <sup>b</sup>
Desviación estándar	3.2	1.73	1.91	0.91
Coefficiente de variación	26.98	40.35	41.91	37.29

La Tabla 16 presenta el contenido de fumonisinas en todos los productos analizados, apreciándose niveles promedio de  $5.79 \mu\text{g/g}$ ,  $1.47 \mu\text{g/g}$ ,  $2.95 \mu\text{g/g}$  y  $1.41 \mu\text{g/g}$  de fumonisinas en el maíz, nixtamal, masa y tortilla respectivamente. En el nixtamal y la tortilla se detectó la menor contaminación por fumonisinas, registrándose los menores niveles en el molino D en ambos productos con  $0.76 \mu\text{g/g}$  en la masa y  $0.69 \mu\text{g/g}$  en la tortilla. En general, la masa incrementó la concentración de fumonisinas respecto al nixtamal, encontrándose niveles de hasta  $3.96 \mu\text{g/g}$  (molino A). En todos los molinos se observó el efecto de incremento de fumonisinas en la masa respecto a los encontrados en el nixtamal, siendo en una proporción de 2:1 en promedio.

El porcentaje de reducción de fumonisinas en los productos del proceso fueron calculados a partir de los niveles detectados en el maíz, en todos los casos el proceso de nixtamalización redujo significativamente el contenido de fumonisinas, probándose la diferencia a un nivel de significancia de  $p < 0.05$  mediante la técnica de contrastes ortogonales. La reducción del nixtamal fue de 74.8%, en la masa de 49.2% y en la tortilla de 75.6%, respecto a los niveles encontrados en el maíz (Tabla 17).



Tabla 16. Niveles de fumonisinas detectados en los productos de elaboración de la tortilla ( $\mu\text{g/g}$ ).

Molino	Maíz ( $\mu\text{g/g}$ )	Nixtamal ( $\mu\text{g/g}$ )	Masa ( $\mu\text{g/g}$ )	Tortilla ( $\mu\text{g/g}$ )
A	11.86	1.34	3.96	2.01
B	4.3	1.99	3.13	1.11
C	4.56	1.78	3.33	1.83
D	2.43	0.76	1.36	0.69
Promedio	5.79	1.47	2.95	1.41
C.V	71.7%	37.1%	37.8%	43.8%

Tabla 17. Porcentaje de reducción en los niveles de fumonisinas en nixtamal, masa y tortilla respecto al maíz.

Producto	Niveles de fumonisinas ( $\mu\text{g/g}$ )	% de Reducción
Maíz	5.79	--
Nixtamal	1.46	74.8
Masa	2.94	49.2
Tortilla	1.41	75.6

El efecto térmico de elaboración de la tortilla permitió la reducción de los niveles de fumonisinas en forma eficiente, calculándose una reducción del 52% respecto a los niveles detectados en la masa. Los contenidos de fumonisinas encontrados en la tortilla fueron significativamente menores a los registrados en la masa ( $p < 0.05$ ).

### 8.7. Efecto de la nixtamalización sobre los niveles de FB<sub>1</sub>, FB<sub>2</sub> y sus hidrolizados.

Previo a la cuantificación de los niveles de fumonisinas e hidrolizados se desarrollaron las curvas de calibración de los estándares (Figuras 20 a 23). En el rango de 5 a 35  $\mu\text{g}/\text{mL}$  la curva de estándares fue lineal, siendo los coeficientes de correlación ( $r^2$ ) para FB<sub>1</sub>, FB<sub>2</sub>, HFB<sub>1</sub> e HFB<sub>2</sub> de 0.9922, 0.9886, 0.9937 y 0.9907 respectivamente.

La Figura 24 muestra los cromatogramas de los estándares de FB<sub>1</sub> analizados por cromatografía de líquidos (HPLC) (con tiempo de retención de 7.10-7.76 min) + FB<sub>2</sub> (con tiempo de retención de 14.3-16.75 min) conteniendo 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y de los hidrolizados de FB<sub>1</sub> (HFB<sub>1</sub>) (con tiempos de retención de 12.08-14.57 min) e hidrolizado de FB<sub>2</sub> (HFB<sub>2</sub>) (con tiempo de retención de 14.90-15.88 min) con la misma concentración. La Figura 25 presenta los picos cromatográficos de FB<sub>1</sub>, FB<sub>2</sub>, e HFB<sub>1</sub> en muestra de tortilla.

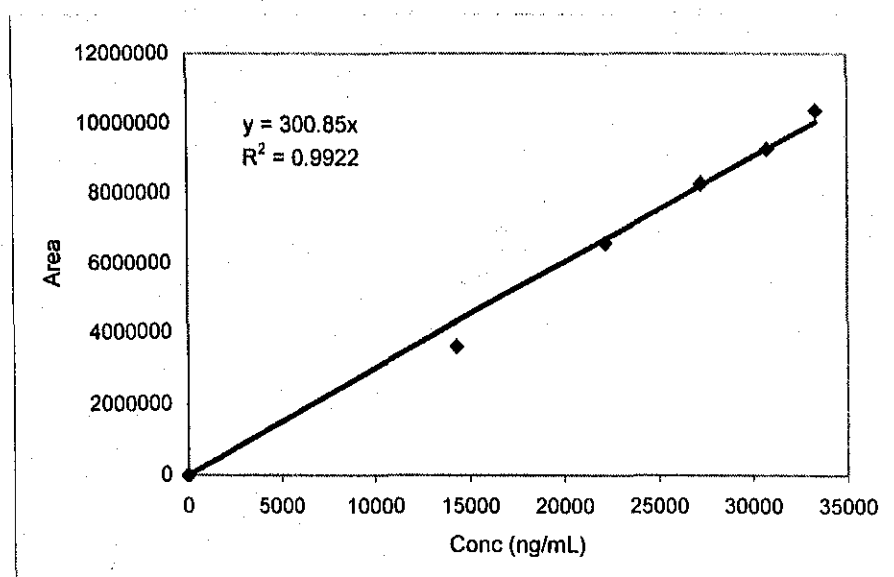
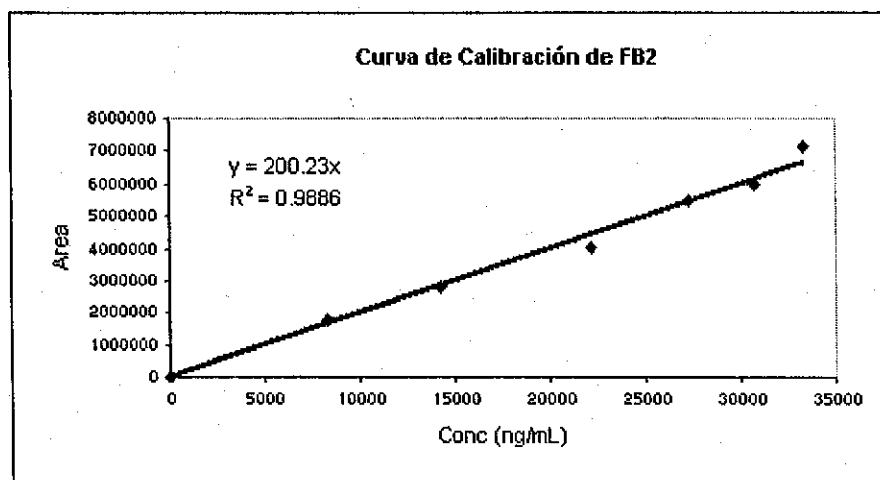
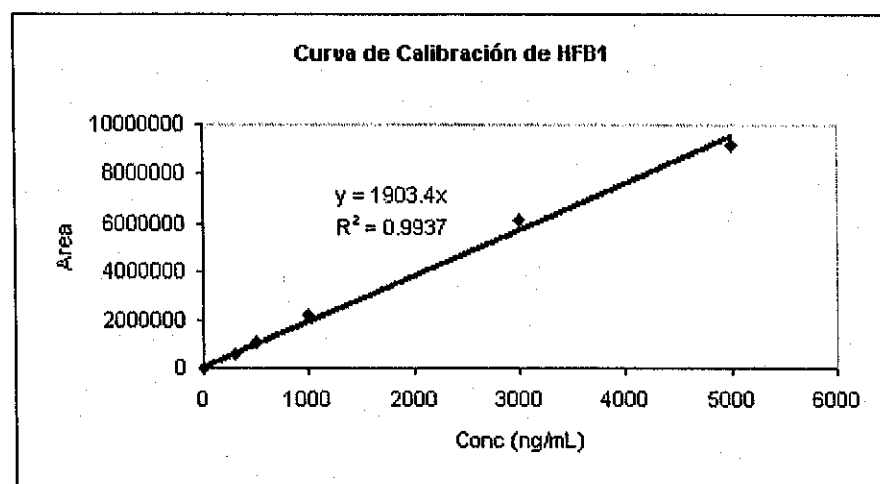
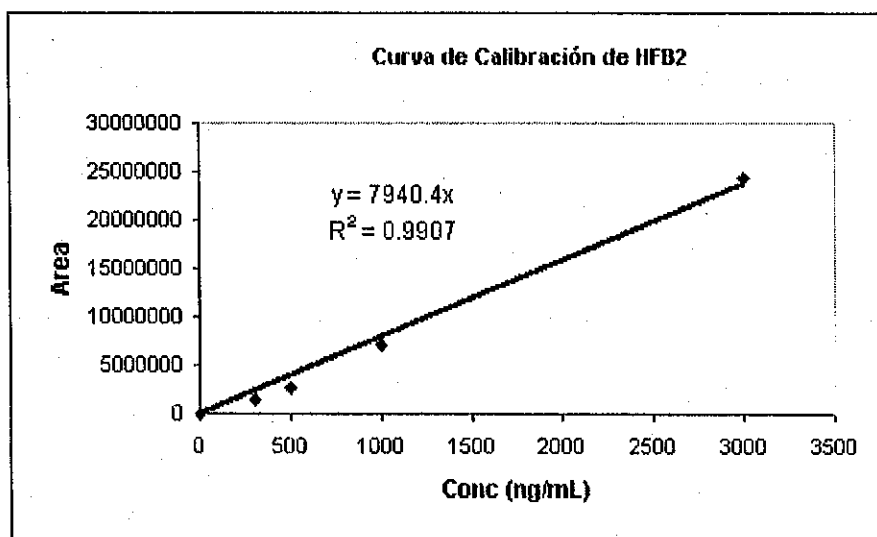


Figura 20. Curva de calibración de la fumonisina B<sub>1</sub>.

Figura 21. Curva de calibración de fumonisina B<sub>2</sub>Figura 22. Curva de calibración del hidrolizado de fumonisina B<sub>1</sub>Figura 23. Curva de calibración del hidrolizado de fumonisina B<sub>2</sub>

Los niveles promedio de fumonisina B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> e hidrolizado de FB<sub>1</sub> en maíz, masa y tortilla se presentan en la Tabla 18. Los resultados del nixtamal fueron muy variables debido a la acción de la cal, y siendo éste un paso intermedio, se decidió no considerar estos resultados en el análisis estadístico. Respecto a la detección de hidrolizados de FB<sub>2</sub>, sólo se encontraron niveles traza en algunas observaciones.

La detección de FB<sub>1</sub> fue elevada en la mayoría de las muestras analizadas, mostrando niveles promedio el maíz de 7.257 µg/g, en masa 6.336 µg/g y tortilla 4.364 µg/g. Aún cuando los niveles promedio de FB<sub>1</sub> disminuyeron hasta 40% en la tortilla respecto a lo encontrado en maíz, no se detectó diferencia estadística ( $p > 0.05$ ) entre productos. Los niveles de FB<sub>2</sub> detectados fueron de 0.143 µg/g, 0.056 µg/g y 0.051 µg/g en maíz, masa y tortilla respectivamente, siendo menores significativamente ( $p < 0.05$ ) la masa y tortilla.

Se encontraron niveles importantes de hidrolizados de FB<sub>1</sub> en masa y tortilla, siendo los niveles promedio de 0.524 µg/g y 0.874 µg/g. Es importante mencionar que se detectaron niveles de HFB<sub>1</sub> (0.086 µg/g) en el maíz, si bien fueron menores estadísticamente ( $p < 0.05$ ) a los encontrados en la masa y tortilla.

Tabla 18. Detección de FB<sub>1</sub>, FB<sub>2</sub> e HFB<sub>1</sub> (µg/g).en maíz y productos de elaboración de la tortilla mediante Cromatografía de líquidos

Producto		FB <sub>1</sub>	FB <sub>2</sub>	HFB <sub>1</sub>
MAÍZ	Promedio	7.257	0.143 a	0.086
	Desviación estándar	8.218	0.066	0.050
	Mínimo	0.631	0.067	0.039
	Máximo	19.867	0.244	0.178
MASA	Promedio	6.336	0.056 b	0.524
	Desviación estándar	5.230	0.042	0.350
	Mínimo	2.059	0.0	0.170
	Máximo	15.640	0.106	1.234
TORTILLA	Promedio	4.364	0.051 b	0.874
	Desviación estándar	5.373	0.085	0.775
	Mínimo	0.0	0.0	0.313
	Máximo	12.613	0.234	2.742

Las literales indican diferencia estadística significativa entre promedios ( $p < 0.05$ ).

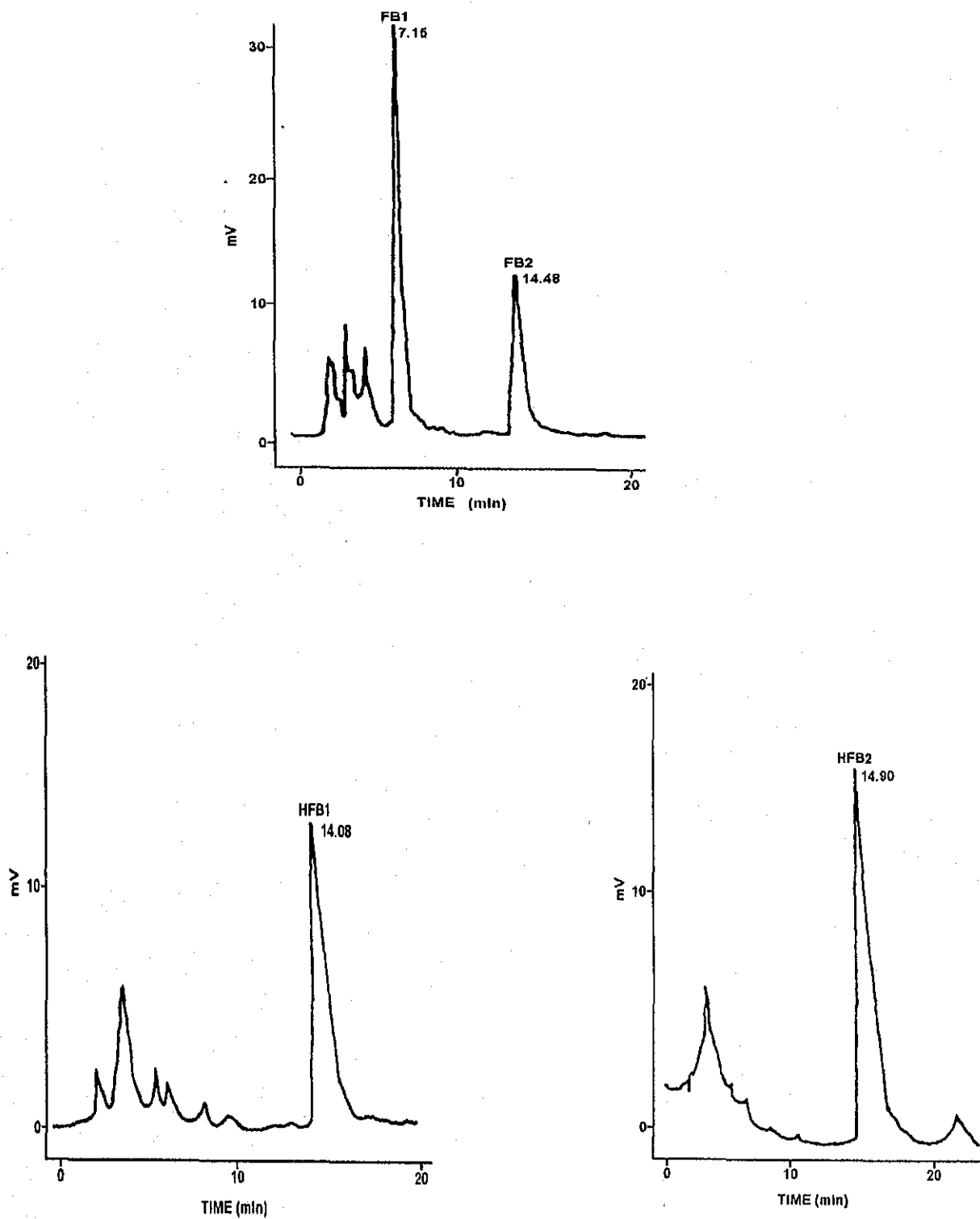


Figura 24. Cromatogramas de los estándares de FB<sub>1</sub>, FB<sub>2</sub>, HFB<sub>1</sub> e HFB<sub>2</sub>.

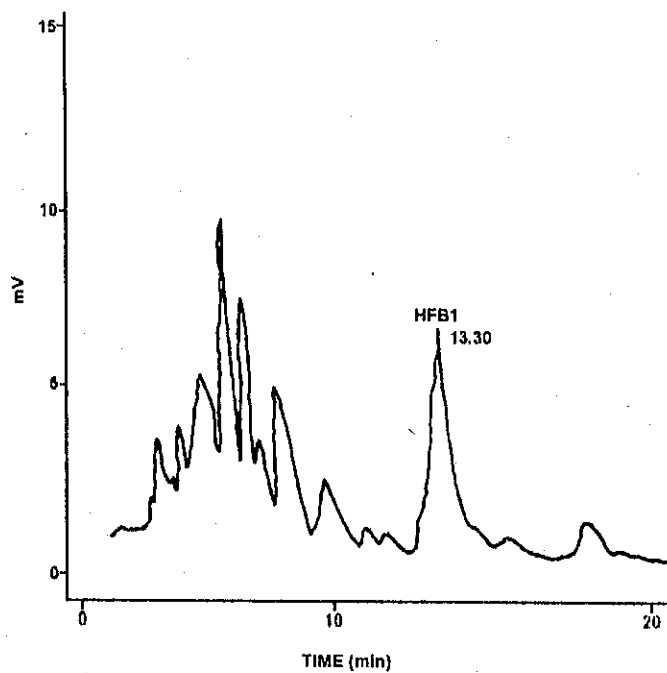
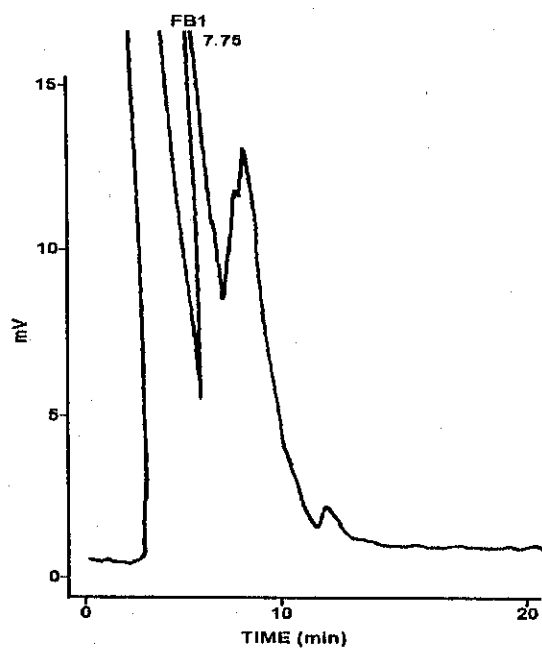


Figura 25. Detección de los picos cromatográficos de  $FB_1$  e  $HFB_1$  en muestra de tortilla.

## IX. DISCUSIÓN

### 9.1 Contaminación por *F. verticillioides* y fumonisinas en maíz.

La identificación de la especie de *Fusarium* en el presente estudio permitió observar gran variedad de pigmentación en las colonias, lo cual se ha descrito en los manuales de identificación de especies de *Fusarium* (Burgess y Liddell, 1983; Nelson *et al.*, 1983). Las variaciones y la tonalidad e intensidad de la coloración de los cultivos dependen además del genotipo de la especie, de la edad de la colonia y las condiciones de luz y temperatura (Booth, 1971), *Fusarium* es un género muy variable, que se adapta mediante cambios morfológicos y fisiológicos a las variaciones del medio donde se desarrolla (Nelson *et al.*, 1983), efecto que se presentó en las cepas aisladas.

La incidencia de *F. verticillioides* en el maíz cosechado en Huejotitán y Ameca, Jalisco fue elevada en ambas localidades independientemente de la variedad de maíz y del daño visual de las mazorcas, lo que coincide con lo reportado por Scott, (1993) que encontró niveles de 64 a 100% aún en maíz aparentemente sano.

Respecto al desarrollo de UFCg<sup>-1</sup>, indicativo del grado de infección del grano, se encontraron elevadas cuentas de colonias tanto en Ameca como en Huejotitán, sin embargo, en esta última localidad se presentó amplio rango en los valores en cada grupo, lo que pudo influir sobre el análisis de relación estadística. El mayor desarrollo de unidades formadoras de colonias que se observó en Huejotitán para todos los grupos, pudo ser determinado por las variaciones climatológicas que causaron estrés en el cultivo y favorecieron el desarrollo de hongos fitopatógenos y la producción de micotoxinas. Los resultados del presente trabajo coinciden con lo publicado por Bullerman y Northolt (1982) quienes encontraron relación entre las condiciones ambientales, el desarrollo de especies de *Fusarium* y la producción de micotoxinas.



El presente estudio se realizó en dos regiones de características climáticas semihúmedas similares, con lluvia estacional en verano, sin embargo durante la época de cultivo en Huejotitán se presentaron variaciones pluviales en todos los meses de la época de lluvias, mientras que en Ameca las variaciones sólo se presentaron durante los meses de septiembre y octubre. Las características ambientales presentes en la primera localidad se consideran estresantes al cultivo, lo que favorece al desarrollo del hongo durante la etapa previa a la madurez fisiológica de la planta de maíz, la cual se presenta, según Chulze *et al.* (1996), entre los 45 y 60 días después de la floración. Viquez *et al.*, (1996), reportan la presencia de *F. verticillioides* en el 86% de las muestras de maíz de las regiones de Brunca, Huetar Norte y Huetar Atlántica en Costa Rica, con niveles promedio de 912 UFCg<sup>-1</sup> y un intervalo de 0 a 32,359.4 UFCg<sup>-1</sup> existiendo significancia estadística ( $p < 0.05$ ) en la región de Huetar Atlántica, la cual mostró la mayor contaminación por este hongo, posiblemente debido a las condiciones ambientales de gran variación en los meses de marzo a agosto, aunado a las prácticas agrícolas pobres en las técnicas de cosecha, recolección y almacenamiento del maíz.

La comparación de la incidencia de *F. verticillioides* en cultivos de maíz en diferentes años de cosecha y países, como son Argentina, Estados Unidos, Italia y Sudáfrica, permitió observar una alta incidencia del hongo, siendo predominante en áreas calurosas, húmedas y donde se presenta pudrición de la mazorca. Shephard *et al.* (1996) observaron que la contaminación con fumonisinas en maíz parece ser menor en climas fríos como en los países del norte de Europa y en Canadá. En México, Galindo y Romero (1982) reportaron alta incidencia de pudrición de la mazorca en el Estado de Jalisco, que causa daños más severos cuando se presentan lluvias fuertes y permanentes, desde la etapa de espigamiento hasta la cosecha, estas condiciones prevalecieron en Huejotitán. Las temperaturas registradas en ambas localidades durante la época de estudio se consideran óptimas para el desarrollo de *F. verticillioides* (Nelson *et al.*, 1992 a,

1994) y fueron similares, manteniéndose para Huejotitán en un promedio de 25° C y en Ameca de 30° C.

El grado de infección del germen de maíz por *F. verticillioides* y la subsecuente contaminación de fumonisinas en el maíz y sus productos para consumo humano y/o animal ha llegado a ser un fenómeno crónico de amplia distribución mundial (Doko *et al.*, 1995). Los niveles de fumonisinas detectados en el maíz de Huejotitán y Ameca se consideran elevados si se comparan con los de otros países. Bullerman y Tsai, (1994) reportan un alto porcentaje de muestras contaminadas con niveles superiores a 2 µg/g de fumonisinas en maíz, en harina de maíz de 4.4 µg/g y en maíz inflado de 0.9 a 6.6 µg/g de Italia; en Egipto de 1.8 a 3 µg/g en harina de maíz, y en maíz de Brasil 0.2 a 38.5 µg/g. En Argentina los niveles de fumonisinas se analizaron en diferentes estadios de desarrollo de la mazorca, encontrándose niveles mayores en las etapas finales de la madurez, en un rango de 0.08 a 16.76 ppm. Castelo *et al.* (1998) publicaron niveles de fumonisinas de 3.5 a 7.4 ppm en maíz blanco y de 0.5 a 4.75 en maíz amarillo en Maryland, Estados Unidos.

No se presentó influencia por el tipo de variedad de maíz (UDG-600, 601 y 602) el cual es de tipo semidentado, respecto a la incidencia de *F. verticillioides*, el desarrollo de UFCg<sup>-1</sup> y la contaminación por fumonisinas, lo cual posiblemente se dio porque es una misma especie de hospedante. Los genotipos de maíz (líneas consanguíneas e híbridos) tienen características específicas como son el tipo de endospermo y la madurez, ambas se han estudiado para conocer su influencia sobre la contaminación por fumonisinas en el mencionado cereal, reportándose una mayor producción en el maíz de tipo dentado, intermedia en el semidentado y baja en el cristalino. Doko *et al.*, (1995) no encontraron relación entre el contenido de fumonisinas y el ciclo vegetativo del maíz en los diferentes países; sin embargo se pudo observar cierta tendencia a presentar mayor contaminación al prolongarse el ciclo vegetativo.

Stack y Eppley (1992) encontraron que los niveles de fumonisinas en maíz, no implicado con micotoxicosis, son variables, encontrándose mayor cantidad en el maíz molido o parcialmente molido. Shephard *et al.*, (1996) mostraron que existen niveles elevados de contaminación en maíz entero o en sus subproductos durante diferentes cosechas y países.

Los niveles de fumonisinas que encontramos en el presente estudio estuvieron en el rango de 6.3 a 11  $\mu\text{g/g}$  y que entran según Shephard *et al.* (1996) dentro de las cantidades encontradas en maíz relacionado con brotes de leucoencefalomalacia equina (con un rango de 10-23  $\mu\text{g/g}$ ), asimismo, los niveles de la toxina implicados con brotes de Edema pulmonar porcino (EPP) fueron de 3-330  $\mu\text{g/g}$ , con un nivel promedio de 76  $\mu\text{g/g}$  en maíz entero y molido. En México existen pocos reportes sobre el grado de contaminación de fumonisinas en alimentos de animales o de humanos, y como el maíz representa la base de alimentación de la población, fue importante determinar la incidencia natural de fumonisinas en este cereal y sus productos derivados, para establecer el riesgo que la presencia de estas micotoxinas tienen para la salud.

El estudio del riesgo involucra la frecuencia o el grado de la contaminación natural y los niveles de fumonisinas presentes, para valorar el grado de exposición, además el medir el impacto toxicológico de la toxina en animales.

## **9.2 Capacidad productiva de fumonisinas por *F. verticillioides*.**

En nuestro trabajo el 80% de las cepas del hongo aisladas del maíz, presentaron alta capacidad productora de fumonisinas, superior a 1000  $\mu\text{g/g}$ , según los estudios de Nelson *et al.*, (1992 b), quienes consideraron como cepas de alta producción a aquellas con niveles mayores a 500  $\mu\text{g/g}$ ; productoras intermedias de 50 – 500  $\mu\text{g/g}$  y de baja producción de menos de 50  $\mu\text{g/g}$ . El alimento asociado con leucoencefalomalacia tuvo cepas altamente productoras, mientras que pocas cepas provenientes del sorgo mostraron alta producción,

además concluyen que la mayoría de las cepas aisladas de diferentes substratos y áreas geográficas pueden producir estas micotoxinas y la producción es alta, encontrándose en maíz de buena calidad en Estados Unidos, niveles entre 459 y 3 091  $\mu\text{g/g}$  y en alimento de maíz dañado de 144 a 6 090  $\mu\text{g/g}$ , lo que coincide con los resultados que se encontraron en el presente estudio, con las cepas aisladas tanto de maíz sano como con daño aparente.

Chulze et al. (1996) indican que la capacidad de las cepas de *Fusarium verticillioides* aisladas en diferentes etapas del cultivo en Argentina, tuvieron niveles de fumonisinas de 1 467 a 3 986  $\mu\text{g/g}$ , encontrándose una mayor producción a los 75 días post – floración. En Cataluña, España, Sala et al. (1994) mostraron que el 33.8% de las cepas de *Fusarium* de la sección Liseola aisladas produjeron  $\text{FB}_1$  y el 18% produjo  $\text{FB}_2$ , siendo *Fusarium verticillioides* la especie predominante para la producción de fumonisinas. Se observó alto grado de variabilidad en las cantidades de  $\text{FB}_1$  y  $\text{B}_2$  por las 45 cepas del hongo, los niveles fluctuaron de 5 a 9 600  $\mu\text{g/g}$  de  $\text{FB}_1$  y de 1 a 4 600  $\mu\text{g/g}$  de  $\text{FB}_2$ . En Europa (España, Francia, Italia y Polonia ) la valoración sobre la producción de cepas de *Fusarium* aisladas a partir de maíz, sorgo, trigo, cebada y alimento balanceado mostraron que todas las cepas de *Fusarium verticillioides* y una cepa de *F. proliferatum* produjeron fumonisinas en cantidades desde 0.7 a 4 100  $\mu\text{g/g}$ . Todas las cepas produjeron tanto  $\text{FB}_1$  como  $\text{FB}_2$ , en una relación de  $\text{FB}_2/\text{FB}_1$  de 0.22. La mayor producción de fumonisinas se obtuvo a partir de las cepas aisladas de maíz (promedio 1 259  $\mu\text{g/g}$ ), seguido de las cepas obtenidas del trigo (promedio 764  $\mu\text{g/g}$ ) y cebada (320  $\mu\text{g/g}$ ). Los resultados de Visconti y Doko, (1994) confirman los datos de otras áreas geográficas de Europa, que son similares a los reportados para Norteamérica.

Con relación al estudio de cepas de *F. verticillioides* aisladas del maíz en zonas con alta incidencia de cáncer esofágico humano en Transkei, Sudáfrica, se encontró que la cepa MRC 826, a partir de la cual se caracterizaron las fumonisinas, produjo 7 100  $\mu\text{g/g}$  de  $\text{FB}_1$  y 3 000  $\mu\text{g/g}$  de  $\text{FB}_2$ . Alberts et al. (1993)

encontraron que existe relación entre la alta producción de fumonisinas y la actividad promotora de cáncer, como es el caso de la mencionada cepa y de otras (MRC 4317 y MRC 4321), con alta producción de fumonisinas, mientras que cepas de baja producción no exhibieron actividad promotora de cáncer. Debido a que las cepas de *F. verticillioides* aisladas en el maíz de Huejotitán, Municipio de Jocotepec, Jalisco son consideradas de alta producción, deben realizarse nuevas investigaciones tanto toxicológicas como epidemiológicas.

### **9.3 Efecto del proceso de nixtamalización sobre la contaminación de fumonisinas.**

La presencia de fumonisinas en el total de las muestras analizadas indica que existe riesgo toxicológico en la población de la ZMG, pues sus niveles son comparables a los datos proporcionados por Bullerman y Tsai, (1994), quienes detectaron un rango de 0.17 a 2.4  $\mu\text{g/g}$  en harina de maíz, en Charleston SC, Estados Unidos. De los resultados obtenidos en nuestro estudio, se observó mayor contaminación en los sectores Reforma y Libertad, ambos localizados en la zona oriente de la ciudad, lo cual pudo ser debido al origen del maíz que abastece a los molinos de dichos sectores, aunque no fue posible obtener información al respecto. 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.

Las condiciones ambientales que prevalecieron en el almacén de los molinos bajo estudio se consideran dentro del rango óptimo para el crecimiento de hongos y producción de micotoxinas, además de que el maíz permaneció almacenado durante 8 días en promedio, tiempo suficiente para la producción de esporas, lo cual puede ocurrir de 2-3 días a 28°C y en 5 días a 20°C (González, 1995). Durante la nixtamalización el tiempo de reposo, así como la temperatura y

humedades registradas fueron consideradas similares a los reportados por Barragán (1996) y Guzmán de Peña (1995). Tanto el reposo como los lavados previos a la preparación de la masa siguieron el proceso tradicional.

#### **9.4 Efecto de la nixtamalización sobre los niveles de FB<sub>1</sub>, FB<sub>2</sub> y sus hidrolizados.**

Los productos nixtamalizados de maíz en esta investigación presentaron altos niveles de FB<sub>1</sub> si se comparan con los encontrados por Stack (1998), quien reporta niveles promedio de FB<sub>1</sub> de 0.262 en masa y de 0.187 µg/g en tortilla, en la frontera de Texas-México; las muestras obtenidas en México mostraron niveles mayores en ambos productos, con rango de 0.21 a 1.80 µg/g y un promedio de 0.79 µg/g de FB<sub>1</sub>, mientras que las muestras adquiridas en Estados Unidos de Norteamérica mostraron niveles de 0.04 a 0.38 µg/g y promedio de 0.16 µg/g. La elevada contaminación por FB<sub>1</sub> presente tanto en maíz como en masa y tortilla, en nuestro estudio, posiblemente se deba a un proceso de nixtamalización incompleto, ya que el tiempo de cocimiento que se realiza en los molinos de la ZMG es de 12.5 minutos menor al indicado en el estudio realizado por Stack (1998), donde se establece un período de una hora.

En otra investigación, con muestras obtenidas en dos localidades de Guatemala, los niveles promedio de FB<sub>1</sub> encontrados en tortilla en la región de Santa María de Jesús fueron de  $0.85 \pm 2.0$  (s) y en Patzicia de  $2.2 \pm 3.6$  (s), siendo los niveles mayores de 6.5 y 11.6 µg/g en dichas localidades. Éstos últimos niveles son comparables a los encontrados en el presente estudio.

Sydenham *et al.* (1991) sugieren que el tratamiento de maíz con álcalis como el hidróxido de calcio puede reducir los niveles de fumonisinas. Los estudios involucran cocimiento a 100 °C durante una hora (Hendrich *et al.*, 1993) o el mantener maíz entero o molido, contaminado con FB<sub>1</sub> en soluciones acuosas de hidróxido de calcio (1-2%) a temperatura ambiente durante 24 horas (Sydenham *et*

*al.*, 1992 b, 1995). En el presente estudio se observó una reducción del 40% de FB<sub>1</sub> en la tortilla respecto a lo encontrado en maíz, sin ser significativa estadísticamente, manteniendo la tortilla niveles que se consideran de riesgo a la salud.

Existen estudios sobre la descontaminación de las fumonisinas del maíz por medio de calor, sin embargo, Alberts *et al.* (1990) observaron que los tratamientos térmicos no redujeron los niveles de fumonisinas. La estabilidad de dichas micotoxinas al calor fue confirmada por Doko y Visconti (1993) y Dupuy *et al.* (1993). Viljoen *et al.* (1993) reportaron reducción progresiva en los niveles de fumonisinas durante el refinamiento de la comercialización de maíz en procesos de molienda, mientras que Sydenham *et al.* (1995) encontraron una reducción del 29 al 69% en los niveles de fumonisinas por efecto del tamizado. Bothast *et al.* (1992) detectaron degradación mínima de FB<sub>1</sub> durante la fermentación a etanol por el maíz contaminado. La mayoría de la toxina fue recuperada en el grano destilado, en silo y en las fracciones solubles, sin detectarse a la FB<sub>1</sub> en el alcohol destilado o en sólidos centrifugados.

Norred *et al.* (1991) estudiaron el efecto de tratamientos con amonio a bajas temperaturas y presión, encontrando sólo reducción parcial de la FB<sub>1</sub> mientras que la toxicidad del material tratado fue retenida. En contraste, Park *et al.* (1996) demostraron que la aplicación de altas temperaturas junto con presión produjo una reducción del 80% de la FB<sub>1</sub>.

El proceso tradicional de nixtamalización produce una reacción que involucra pérdida de los dos ácidos tricarbóxicos de la molécula original de fumonisina generando un compuesto hidrolizado (Sydehham *et al.*, 1995). Hendrich *et al.* (1993) encontraron que el hidrolizado de FB<sub>1</sub> a concentraciones de 8-11 mg/kg de peso mostró los mismos síntomas de toxicidad que la observada por el consumo de maíz contaminado con *F. proliferatum* conteniendo de 45-48 mg/kg de FB<sub>1</sub>.

Se encontraron hidrolizados de fumonisina B<sub>1</sub>, en el presente estudio, destacando su detección en el maíz, lo cual no se ha reportado previamente. Estos hallazgos son novedosos, al no ser esperados, sin embargo, se ha reportado que los hidrolizados de fumonisinas pueden ser desarrollados por *Fusarium*. Keller y Sullivan (1998) encontraron que la FB<sub>1</sub> parcialmente hidrolizada fue detectada en cultivos por *Fusarium proliferatum* lo cual pudiera deberse a la presencia de estearasa en esta especie de hongo. Jackson *et al.* (1996) indican que el HFB<sub>1</sub> se ha detectado en otros alimentos de maíz que no fueron nixtamalizados, en los cuales el calor y el agua pudieron ser suficientes para efectuar una hidrólisis.

Los niveles de HFB<sub>1</sub> presentes en masa y tortilla en este estudio fueron mayores a los reportados por Dombrink-Kurtzman y Dvorak, (1999) quienes encontraron como nivel máximo de HFB<sub>1</sub> a 0.1 µg/g, además, mostraron que la FB<sub>1</sub> representa aproximadamente el 70% del total de las fumonisinas detectadas, por lo que el principal producto de la hidrólisis de las fumonisinas, es el hidrolizado de FB<sub>1</sub> (HFB<sub>1</sub>), sin embargo es posible que otros productos de descomposición como complejos de FB-calcio jueguen un papel importante en la toxicidad del maíz nixtamalizado.

Meredith *et al.* (1999) encontraron niveles promedio de HFB<sub>1</sub> de 26.1 ± 38.5 µg/g en tortillas procedentes de Santa María de Jesús y de 5.7 ± 9.4 µg/g en Patzicia, ambos en Guatemala. No hubo hidrolizados en el nixtamal.

La incompleta remoción del pericarpio ocasionada por un proceso incompleto de nixtamalización, principal sitio donde se localizan las fumonisinas, pudiera ser la causa de las diferencias en la detección de FB<sub>1</sub> e HFB<sub>1</sub> en productos nixtamalizados como la masa y tortilla. Además de los procesos de extrusión utilizados para la fabricación de nixtamal, pueden también influir, ya que se retiene pericarpio en el producto final (tortilla), por lo que Dombrink-Kurtzman y



Dvorak, (1999) sugieren monitorear el grado de remoción del pericarpio como un posible indicador de la cantidad de fumonisina retenida.

Los estudios de detección de fumonisinas y sus hidrolizados en masa, tortilla y maíz amarillo enlatado conducidos por Hopmans y Murphy (1993) permitieron concluir que aunque la toxicidad de los hidrolizados no está comprendida ampliamente, su transformación metabólica llega a ser un importante factor que contribuye en el riesgo de exposición a fumonisinas.

Respecto a los niveles de  $FB_2$  detectados en maíz y en productos nixtamalizados, se tienen pocos estudios. En esta investigación se encontraron bajos niveles de  $FB_2$  en maíz, masa y tortilla, el máximo valor encontrado fue  $0.244 \mu\text{g/g}$ . Thakur y Smith (1996) reportan niveles promedio de  $1.092 \mu\text{g/g}$  en maíz, mientras que los niveles reportados por Hopmans y Murphy (1993) en maíz y subproductos tienen un rango de  $0-0.414 \mu\text{g/g}$  de  $FB_2$ .

De manera similar se tienen escasos reportes sobre la detección de  $HFB_2$ , atribuyéndose como causa a deficiencias en la metodología utilizada, encontrándose solo niveles traza de  $HFB_2$  en este estudio.

De acuerdo con la cantidad de  $FB_1$ ,  $FB_2$  e  $HFB_1$  presentes en tortillas de la ZMG, la contaminación por fumonisinas en maíz puede ser considerada de riesgo para la salud de humanos y animales. Debido a que existen pocos estudios que relacionen el consumo de maíz contaminado con las enfermedades de humanos, es difícil especular sobre sus daños a la salud, sin embargo es claro que parte de la población ingiere niveles considerados tóxicos para algunos animales.

Puesto que las fumonisinas tienen efectos promotores de cáncer en animales y humanos en África y China, es importante determinar si en México existe asociación del consumo de fumonisinas en cantidades que representen un riesgo de promoción de cáncer.

La región de Transkei Sudáfrica tiene alta incidencia de cáncer esofágico humano, y su maíz, considerado alimento básico de la población, está altamente contaminado con fumonisinas. Thiel *et al.* (1992) indica que el consumo diario de maíz, en esta región, se estima en 460 g por adulto de 70 kg en comparación con un consumo de no más de 4 g por persona en Suiza y un estimado de 7g en Alemania e Inglaterra. Asumiendo el promedio del peso de un adulto de 70 kg y un promedio de contaminación por fumonisinas de 1.7  $\mu\text{g/g}$  en maíz sano en áreas de alta incidencia de cáncer esofágico en Transkei y de 0.5  $\mu\text{g/g}$  en Europa es posible calcular un consumo diario para estas poblaciones de 11.2  $\mu\text{g/kg}$  de peso vivo/día en Transkei, de 0.03  $\mu\text{g/kg}$  de peso vivo/día en Suiza y de 0.05  $\mu\text{g/kg}$  de peso vivo/día en Alemania e Inglaterra (Shephard *et al.*, 1996). En el presente estudio se obtuvieron 4.364  $\mu\text{g/g}$  de FB<sub>1</sub>, 0.051  $\mu\text{g/g}$  de FB<sub>2</sub> y 0.874  $\mu\text{g/g}$  de HFB<sub>1</sub> en tortilla, los cuales se consumen simultáneamente, dando un total de 5.289  $\mu\text{g/g}$ , que es un nivel sumamente alto, considerando un consumo de tortilla por persona de 300 g diarios, sin tomar en cuenta otros derivados y bebidas de maíz de consumo frecuente en México.

Gelderblom *et al.* (1996) estimaron, en un estudio de cáncer en ratas a partir de dosis bajas durante periodos de 24 meses, un nivel de efectos no observados (NOEL) con un consumo diario tolerable (TDI=NOEL/1000) de fumonisinas de 0.8  $\mu\text{g/kg}$  de peso vivo/día, por lo que en comunidades del norte de Europa las fumonisinas no representan un riesgo a la salud. Sin embargo, en Transkei, las comunidades rurales que dependen del consumo de maíz de cultivo casero, se encuentran con alto riesgo aun con maíz sano, sin considerar el consumo adicional de bebidas fermentadas procedentes de maíz altamente contaminado o de maíz mohoso que sustituya a maíz sano.

Como parte de las estrategias para el control de fumonisinas, en Estados Unidos, en alimentos de humanos y suplementos para animales, la FDA junto con el Instituto de Seguridad de Alimentos y Aplicaciones en Nutrición (Organismo Mundial de la Salud) y el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos

proporcionaron una guía de niveles que recomiendan los límites máximos de fumonisinas para alimentos de humanos y animales\*, los cuales se obtienen cuando se utilizan buenas prácticas agrícolas y de manufactura. La FDA considera con base en estos niveles recomendados como límites máximos de tolerancia a fumonisinas, se puede reducir la exposición y el riesgo de sufrir daños en la salud de animales y humanos.

Los niveles que presenta la guía publicada el 6 de junio de 2000, incluye a las fumonisinas B<sub>1</sub> + B<sub>2</sub> + B<sub>3</sub>. Se recomienda que los productos de maíz desgerminado para consumo humano como son las hojuelas, y la harina, con un contenido mayor a 5% de grasa no excedan una cantidad de 2 µg/g de fumonisinas, y con niveles de grasa ≤ de 2.25%, una cantidad de fumonisina máxima de 4 µg/g. En equinos y conejos el límite máximo de tolerancia es de 5 µg/g en menos del 20% de su dieta; en cerdos el límite es de 20 µg/g en menos del 50% de su dieta, y en rumiantes lactantes y pollos de engorda el límite es de 30 µg/g en menos del 50% de su dieta.

El presente trabajo representa un esfuerzo por conocer los niveles de fumonisinas en maíz y sus derivados y los posibles riesgos que la ingestión de estos alimentos representan a la salud de animales y humana.

---

\* FDA/CFSA; Draft Guidance for Industry: Fumonisin Levels in Human Foods and Animal Feed. <http://vm.cfsan.fda.gov//Edms/fumongui.html>

## X. CONCLUSIONES

1. Se presentó alta incidencia de *Fusarium verticillioides* en el maíz de Ameca y Huejotitán, Jalisco, independientemente de la variedad del maíz, del daño visual de las mazorcas y de las condiciones climatológicas que prevalecieron en la época de cultivo.
2. La contaminación por fumonisinas se presentó en el 100% de las muestras de maíz en ambas localidades, encontrándose niveles significativamente mayores ( $p < 0.05$ ) en Huejotitán, Municipio de Jocotepec, Jalisco.
3. El estudio de relación entre daño visual de las mazorcas y el desarrollo de unidades formadoras de colonias fue significativo en Ameca lo cual indicó que a mayor daño en mazorcas mayor desarrollo de UFCg<sup>-1</sup>, efecto no observado en Huejotitán posiblemente por la gran variabilidad de valores encontrado.
4. La relación entre el daño visual de las mazorcas y los niveles de fumonisinas en maíz no fue estadísticamente significativa, se detectó alta concentración tanto en maíz aparentemente sano como dañado.
5. El 93.7% de las cepas de *Fusarium verticillioides* aisladas en el maíz fueron productoras de fumonisinas, y el 80% de las cepas se consideran de alta capacidad productiva de fumonisinas.
6. Existe contaminación por fumonisinas en el 100% de las muestras de masa y tortillas que se expenden en la zona metropolitana de Guadalajara, encontrándose los mayores niveles en los sectores Libertad y Reforma.
7. El proceso de nixtamalización no reúne las condiciones apropiadas de temperatura y tiempo durante el cocimiento, siendo poco eficiente sobre la reducción de los niveles de fumonisinas.
8. Se encontraron hidrolizados de fumonisinas en maíz y altas cantidades de ellos en masa y tortilla, lo que indica el riesgo de exposición en consumidores.

## XI. BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, H.K.,** Gelderblom, W.C.A., Cawood, M.E, and Shier, W.T. 1993. Biological activities of fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*, in jimsonweed (*Datura stramonium L.*) and mammalian cell cultures. *Toxicon.*, 31:345-353.
- Agrios, J.** 1985. *Fitopatología*. Primera edición. Ed. Limusa. 382-412.
- Alberts, J.F.,** Gelderblom, W.C.A., Thiel, P.G. and Marasas, W.F.O. 1993. Evaluation of the extraction and purification procedures of the maleyl derivatization HPLC technique for the quantification of the fumonisina B<sub>1</sub> mycotoxins in corn cultures. *Mycotoxin Res.*, 8:2-12.
- Alberts, J.F.,** Gelderblom, W.C.A., Thiel, P.G., Marasas, W.F.O. Schalkwyk, D.J. and Behrend, Y. 1990. Effects of temperature and incubation period on production of Fumonisin B<sub>1</sub> by *Fusarium moniliforme*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56:1729-1733.
- Azcona, O.J.,** Abouzied, M. M., Plattner, D.R. and Pestka J.J, 1992. Production of monoclonal antibodies to the mycotoxins Fumonisin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> and B<sub>3</sub>. *J. Agric. Food Chem.*, 40 :531-534.
- Barragán, B. E.** 1996. Análisis de peligros potenciales e identificación de puntos críticos de control durante el proceso para la elaboración de la tortilla, respecto a la contaminación por cepas aflatoxigénicas de *Aspergillus* spp. Tesis de Maestría de Ciencias de la Salud. CUCS, Ude G. 85 pp.
- Bartolini, R.** 1990. Plagas, enfermedades y fisiopatías del maíz. *En: El Maíz*. Mundi Prensa. Madrid, España. 237-266.
- 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.
- Bezuidenhout, S.C.** and Gelderblom, W.C.A. 1988. Structure elucidation of fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. *J. Chem. Soc. Commun.*, 4 :743-745.
- Bjeldanes, L.F.** and Thomson, S.V. 1979. Mutagenic activity of *Fusarium moniliforme* isolates in the *Salmonella typhimurium* assay. *Appl. Environ. Microbiol.*, 27:1118-1121.
- Booth, C.** 1971. The genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey, England. 237. *In: Shephard, G.S., Sydenham, E.W., Thiel, P.G. and Gelderblom, W.C.A.* 1990. Quantitative determination of fumonisins B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> by

- high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Liq. Chrom.*, 13(10):2077-2087.
- Bordson, G.**, Meerdink, G., Bauer, K. and Tumbleson, M. 1993. Effects of drying temperature on fumonisin recovery from feeds. *J. AOAC Int.*, 78: 1183-1188.
- Bothast, R.J.**, Bennett, G.A. and Richard, S.L. 1992. Fate of fumonisin B1 in natural contaminated corn during ethanol production. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58: 233-236.
- Bullerman, LL.B.** and Draughon, F.A. 1994. *Fusarium moniliforme* and Fumonisin Symposium. *J. Food Prot.*, 57 (6): 513.
- Bullerman, LL.B.** and Northolt, M.D. 1982. Prevention of mold growth and toxin production through control of environmental conditions. *J. Food Prot.*, 45(6): 519-526.
- Bullerman, LL.B.** and 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.
- Burgess, L.W.** and Liddell, C.M. 1983. Laboratory Manual for *Fusarium* Research. *Fusarium Research Laboratory. Department of Plant Pathology and Agricultural Entomology. The University of Sydney.* 162.
- Carvajal, M.** 1987. Premature germination of maize and the related mycotoxin. *In: Aflatoxin in maize: A proceeding of the Workshop.* Zuber, M.S., Lillehoj, E.B. and Renfro, B.L. Eds. CIMMYT. El Batán, Estado de México. 71-73.
- Castelo, M.M.**, Sumner, S.S. and Bullerman, M.B. 1998. Occurrence of fumonisins in corn – based Food Products, *J. Food Prot.*, 61 (6): 704-707.
- Cavaglieri, L.**, Etcheverry, M. y Chulze, S. 1997. Control biológico sobre *Fusarium moniliforme*, uso potencial de *Bacillus subtilis*. Memorias. II Congreso Latinoamericano de Micotoxicología, Maracay, Venezuela. 14 al 18 de julio de 1997. 122.
- Cepeda, M.**, Castrejón, A. y Arroyo, C.L. 1994. Efecto de *Fusarium moniliforme* (Sheld.) Zinder and Hansen sobre el rendimiento de 21 genotipos de maíz. Memorias del XXI Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología. Del 20 al 22 julio de 1994. Cuernavaca, Morelos, México. 100.
- Cohen, S.M.** and Ellwein, L.B. 1990. Cell proliferation in carcinogenesis. *Science*, 249:1007-1011.

- Cole, R.J.,** Kirksey, J. W., Cutler, H.G., Doupnik, B.L. and Peckham, J.C. 1973. Toxin from *Fusarium moniliforme*: effects on plants and animals. *Science*, 179:1324-1326.
- Colvin, B.M.,** Cooley, A.J. and Beaver, R.W. 1993. Fumonisin toxicosis in swine : Clinical and pathologic findings. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 5 :232-241. *In:* Norred, W.P. and Voss, K.A. 1994. Toxicity and role of fumonisins in animal diseases and human esophageal cancer. *J. Food Prot.*, 57(6) :522-527.
- Colvin, B.M.** and Harrison, L.R. 1992. Fumonisin-induced pulmonary edema and hydrothorax in swine. *Mycopathologia*, 117:79-82.
- Cooke, W.B.** 1962. Species of *Fusarium* isolated from a waste stabilization pond system. *Mycopath. Mycol. Appl.* 18:225-233.
- Chang, Y.S.,** Zhang, C.L., Zhao, P.Z. and Deng, Z.L.1991. Human aortic proteoglycans of subjects from districts of high and low prevalence of atherosclerosis in China. *Atherosclerosis*, 31:9-15.
- Chu, Q.,** Cook, M.B., Wu, W. and Smalley, E.B. 1988. Immune and bone properties of chick consuming corn contaminated with a *Fusarium* that induces dyschondroplasia. *Avian Dis.*, 32:132-136.
- Chulze, S.N.,** Ramírez, M.L., Farnochi, M.C., Pascale, M., Visconti, A. and March, G. 1996. *Fusarium* and fumonisin occurrence in Argentinian corn at different ear maturity stages. *J. Agric. Food Chem.*, 44:2797-2801.
- Daniels, B. A.** 1983. Elimination of *F. moniliforme* from corn seed. *Plant Dis.*, 67: 609-611.
- Davis, R.M.,** Kegel, F.R., Sills, W.M. and Farrar, J.J. 1989. *Fusarium* ear rot of corn. *Calif. Agric.*, 43: 4-5.
- De León, C.** 1984. Enfermedades del maíz. Una guía para su identificación en el campo. Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo. Tercera edición. 114.
- Desjardins, A.E.,** Plattner, R.D. and 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.
- Desjardins, A.E.,** Plattner, R.D., Shackelford, D.D., Leslie, J.F. and Nelson, P.E. 1992. Heritability of fumonisin B1 production in *Gibberella fujikoroi* mating population A. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58(9): 2799-2805.

**Doko, M.B.**, Rapior, S., Visconti, A. and Schjøth, J.E. 1995. Incidence and levels of fumonisin contamination in maize genotypes grown in Europe and Africa. *J. Agric. Food Chem.*, 43: 429-434.

**Doko, M.B.** and Visconti, A. 1993. Fumonisin contamination of corn and corn based foods in Italy. United Kingdom Workshop on Occurrence and significance of mycotoxins. April 21-23. London. *In: Bullerman, L.L.B. and Draughon F.A.* 1994. *Fusarium moniliforme* and Fumonisin Symposium. *J. Food Prot.*, 57 (6): 513.

**Dombrink-Kurtzman, M.A.** and Dvorak, T.J. 1999. Fumonisin content in masa and tortillas from Mexico. *J. Agric. Food Chem.*, 47:622-627.

**Dupuy, J.**, Le Bars, P., Boudra, H. and Le Bars J. 1993. Thermostability of fumonisin B1 a mycotoxin from *Fusarium moniliforme* in corn. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 2864-2867.

**Eiker, A.** 1976. Non-parasitic mycoflora of the phylloplane and litter of *Panicum coloratum*. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 67:275-281.

**Engelhardt, J.A.**, Carlton, W.W. and Tuite, J.F. 1989. Toxicity of *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans* for chicks, duckling and turkey poults. *Avian Dis.*, 33: 357-360.

**Figuroa, J.D.C.**, González, H.J., Arambula, V.G. y Morales, S.E. 1997. Tecnologías ecológicas para la producción de tortilla. *Avance y Perspectiva.* 16:363-374.

**Flood, J.**, Mepsted, R. and Copper R.M. 1990. Contamination of oil palm pollen and seeds by *Fusarium* spp. *Mycol. Res.*, 94:708-709.

**Food and Drug Administration.** 2000. Fumonisin levels in human foods and animal feeds. Guidance for Industry. U.S. Department of Health and Human Services. <http://vm.cfsan.fda.gov/Edms/fumongui.html>

**Galindo, J.** 1983. Evidencia adicional para confirmar a *Fusarium moniliforme* como causa de la germinación prematura del maíz. Informe de Actividades 1979-1983. Convenio de Colaboración Académica. Colegio de Postgraduados. Universidad Nacional Autónoma de México. 4-8.

**Galindo, J.** and Romero, S. 1982. *Fusarium moniliforme* as the cause of preharvest sprouting in maize in Mexico. III International Symposium on Preharvest Sprouting in cereals. Winnipeg, Canada.

**García, T.M.** 1995. Confirmación química y estudio epizootológico de fumonisina B<sub>1</sub> en maíz de Oaxaca causante de Leucoencefalomalacia Equina. Tesis de Licenciatura de Fac. de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la U.N.A.M. 18-24.



**Gelderblom, W.C.A.,** Snyman, S.D., Lebepe-Mazur, S., Smuts, C.M., Marasas, W.F.O. and Huber, W. 1996. Fumonisin in food. Jackson, L. (Ed.) Plenum Press, New York, N.Y. In: Shepard, G.S. et al., 1996. Survey of fumonisin contamination of corn and corn-based products. *J. AOAC Int.* 79(3): 671-687.

**Gelderblom, W.C.A.,** Cawood, M. E., Snyman, S.D. Vleggaar, R. and Marasas, W.F.O. 1993. Structure-activity relationships of fumonisins in short-term carcinogenesis and cytotoxicity assays. *Food Chem. Toxicol.* In: Norred, W.P. and Voss, K.A. 1994. Toxicity and role of fumonisins in animal diseases and human esophageal cancer. *J. Food Prot.*, 57(6) :522-527.

**Gelderblom, W.C.A.,** Jaskrewiez, K., Marasas, W.F.O., Thiel, P.G., Horak, R.M., Vleggaar, R. and Kriek, N.P.J. 1988. Fumonisin- novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54 :1806-1811.

**Gelderblom, W.C.A.,** Kriek, N.P.J., Marasas, W.F.O. and Thiel, P.G. 1991. Toxicity and carcinogenicity of the *Fusarium moniliforme* metabolite, fumonisin B1 in rats. *Carcinogenesis*, 12:1247-1251.

**Gelderblom, W.C.A.,** Thiel, P.G., Jaskrewiez, K. and Marasas, W.F.O. 1986. Investigations on the carcinogenicity of fusarin C-a mutagenic metabolite of *F. moniliforme*. *Carcinogenesis*, 7:1899-1901.

**González, A.V.** 1995. El maíz y su conservación. Ed. Trillas, México. 214-251.

**González, S.,** Leyva, G. Y Villaseñor, M. 1987. Evaluación de técnicas y fechas de inoculación de *Fusarium moniliforme* S. Y H. causante de la pudrición de la mazorca y el germinado prematuro del maíz. Memorias del XIV Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología. Del 15 al 17 de julio de 1987. Morelia, Michoacán, México. 105.

**Guzmán de Peña, D.,** Trudel, L. and Wogan, G.N. 1995. Corn "nixtamalización" and the fate of radiolabelled Aflatoxin B<sub>1</sub> in the tortilla making process. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 55:858-864.

**Hanada, K. M.,** Kiso, H., Hasegawa, A., Fujita, S., Ogawa, T. and Akamatsu, Y. 1992. Sphingolipids are essential for the growth of Chinese hamster ovary cells. Restoration of the growth of a mutant defective in sphingoid base biosynthesis with exogenous sphingolipids. *J. Biol. Chem.*, 267: 23527-23533.

**Harris, C.C.** 1991. Chemical and physical carcinogenesis: advances and perspectives for the 1990s. *Cancer Res.*, 51:5023-5044.

**Harrison, L.R.,** Colvin, B.M., Greene, J.T., Newman, L.E. and Cole, R.J. 1990. Pulmonary edema and hydrothorax in swine produced by fumonisin B<sub>1</sub>, a toxic metabolite of *Fusarium moniliforme*. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 2:217-221.

- Haschek, W.M.**, Kim, H.-Y, Motelin, G.K., Stair, E.L. and Beasley, W.J. 1992. Characterization of fumonisin toxicity in orally and intravenously dosed swine. *Mycopathologia*, 117:83-96.
- Haschek, W.M.**, Kim, H.-Y, Motelin, G.K., Stair, E.L. Beasley, W.J., Chamberlain, W.J. and Riley, R.T. 1993. Pure fumonisin B<sub>1</sub>, as well as fumonisin-contaminated feed, alters swine serum and tissue sphinganine and sphingosine levels, biomarkers of exposure. *Toxicologist*, 13:232-236.
- Hendrich, A.**, Miller, K.M., Wilson, T.M. and 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.
- Herrera, T. y Ulloa, M.** 1990. El reino de los hongos. *Micología básica y aplicada*. UNAM y Fondo de Cultura Económica, México. 552.
- Holliday, P.** 1989. *Fungus diseases of tropical crops*. Cambridge University Press. Great Britain. 203-215.
- Hopmans, E. C.** and Murphy, P.A. 1993. Detection of fumonisins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub> and hydrolyzed fumonisin B<sub>1</sub> in corn containing foods. *J. Agric. Food Chem.*, 41:1655-1658.
- Jackson, M.A.** and Bennett, G.A. 1990. Production of fumonisin B<sub>1</sub> by *Fusarium moniliforme* NRRL 13616 in submerged culture. *Appl. Environ. Microbiol*, 56:2296-2298.
- Jackson, L.S.**, Hlywka, J.J., Senthil, K.R. and Bullerman L.I. B. 1996. Effects of thermal processing on the stability of fumonisins. *Adv. Exp. Med. Biol.* 392:345-353.
- Jugenheimer, R.W.** 1981. *Maíz. Variedades mejoradas, métodos de cultivo y producción de semillas*. Ed. Limusa México. 225-234
- Katta, S.K.** 1994. Effect of handling and storage on popcorn quality related to mold content and expansion volume. M.S. Thesis. University of Nebraska, Lincoln, N.E. In: Bullerman, L.L.B. and 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.
- Kellerman, T.S.**, Marasas, W.F.O., Thiel, P.G., Gelderblom, W.C.A. and Cawood, M.A. 1990. Leucoencephalomalacia in two horses induced by oral dosing of fumonisin B<sub>1</sub>. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, 57:269-275.
- Keller, S.E.** and Sullivan, T.M. 1998. Identification of a variant of *Fusarium proliferatum* that hydrolyzes fumonisin B<sub>1</sub>. *J. Agric. Food Chem.* 46:2823-2826.

- Kmet, J. and Mahboubi, E.** 1972. Esophageal cancer in the Caspian Litoral of Iran. Initial studies. *Science*, 175:846-853.
- Kriek, N. P. J., Kellerman, T.S. and Marasas, W.F.O.** 1981. A comparative study of the toxicity of *Fusarium moniliforme* to horses, primates, pigs, sheep and rats. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, 48:129-131.
- Leslie, J.F., Plattner, R.D., Desjardins, A.E. and Klittich, C.R.J.** 1992. Fumonisin B<sub>1</sub> production by strains from different mating populations of *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium* section *Liseola*). *Phytopathology*, 82:341-345.
- Li, M., Lu, S., Wang, M. and Tian, G.** 1980. Experimental studies on the carcinogenicity of fungus contaminated food from Lixian County. *In: Sydenham, E.W., Shephard, G.S., Thiel, P.G., Marasas, W. F.O. and Stockenstrom, S.* 1991. Fumonisin contamination of commercial corn-based human foodstuffs. *J. Agric. Food Chem.*, 39 :2014-2018.
- Marasas, W.F.O., Kellerman, T.S., Gelderblom, W.C.A., Coetzer, J.A.W. and Thiel, P.G.** 1988. Leukoencephalomalacia in a horse induced by fumonisin B<sub>1</sub>, isolated from *Fusarium moniliforme*. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, 55:197-203.
- Marasas, W.F.O., Kriek, N.P.J., Wiggins, V.M., Steyn, P.S., Towers, D.K. and Hastie, T.J.** 1979. Incidence, geographic distribution and toxigenicity of *Fusarium* species in South African corn. *Phytopathology*, 69:1181-1185.
- Marasas, W.F.O., Thiel, P.G., Rabie, C.J., Nelson, P.E. and Toussoun, T.A.** 1986. Moniliformin production in *Fusarium* section *Liseola*. *Mycologia*, 78:242-247.
- Marasas, W.F.O., Wehner, F.C. and Van Schalkwyk, D.J.** 1981. Mycoflora of corn produced in human esophageal cancer areas in Transkei, South Africa. *Phytopathology*, 71: 792-796.
- Marijanovic, D.R., Holt, P., Norred, W.P., Bacon, C.W., Voss, K.A., Stancel, P.C. and Ragland, P.** 1991. Immunosuppressive effects of *Fusarium moniliforme* corn cultures in chickens. *Poultry Sci.*, 70: 1895-1901.
- Márquez, O.J.** 1985. Germinación prematura del maíz (*Zea mays L.*) en la zona centro de Puebla. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Chapingo. Chapingo, Estado de México.
- Meredith, F.I., Torres, O.R., Saenz de Tejada, S. Riley, R.T. and Merrill A.H. Jr.** 1999. Fumonisin B<sub>1</sub> and hydrolysed fumonisin B<sub>1</sub> (AP<sub>1</sub>) in tortillas and nixtamalized corn (*Zea mayzs L.*) from two different geographic locations in Guatemala. *J. Food Prot.* 62(10): 1218-1222.
- Merrill, A.H., Jr.** 1991. Cell regulation by sphingosine and more complex sphingolipids. *J. Bioenerg. Biomemb.*, 23:83-104.

- Merrill, A.H.**, Echten, G., Wang, E. and Sandhoff, K. 1993. Fumonisin B<sub>1</sub> inhibits sphingosine (sphingonine) N-acyltransferase and de novo sphingolipid biosynthesis in cultured neurons *in situ*. J.Biol. Chem., 268:27299-27306.
- Miller, J.D.** 1993. Production of fumonisins in liquid culture. 106<sup>th</sup> Annu. Assoc. Off. Anal. Chem. Meet., Cincinnati, Ohio, USA. 106.
- Moreno, M.E.** 1988. Manual para la identificación de hongos en granos y sus derivados. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 17-38, 78-83.
- Murphy, P.A.**, Rice, L.G. and Ross, F. 1993. Fumonisin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> and B<sub>3</sub> content of Iowa, Wisconsin and Illinois corn and corn screenings. J. Agric. Food Chem., 41 :263-266.
- Musser, S.T.** and Plattner, R.D. 1997. Fumonisin composition in cultures of *Fusarium moniliforme*, *Fusarium proliferatum* and *Fusarium nygami*. J. Agric. Food Chem., 45:1169-1173.
- Navarrete, R.** 1986. Factores ambientales y biológicos que influyen en el desarrollo de la enfermedad "Germinación prematura del maíz", causada por *Fusarium moniliforme* Sh. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. Montecillo, México. 97.
- Nelson, P.E.** 1992a. Taxonomy and biology of *Fusarium moniliforme*. Mycopathologia, 117:29-36.
- Nelson, P.E.**, Desjardins, A.E. and Plattner, R.D. 1993. Fumonisins mycotoxins produced by *Fusarium* species: Biology, chemistry and significance. Annu. Rev. Phytopathol., 31: 233-252.
- Nelson, P.E.**, Dignani, M.C. and Anaissie, E.J. 1994. Taxonomy, biology and clinical aspects of *Fusarium* Species. Clin. Microbiol. Rev., 7(4) :479-504.
- Nelson, P.E.**, Juba, J.H., Ross, P.F. and Rice, L.G. 1992 b. Fumonisin production by *Fusarium* species on solid substrates . J. AOAC International, 77:522-525.
- Nelson, P.E.**, Plattner, R.D., Schackelford, D.D. and Desjardins, A.E. 1991. Production of fumonisins by *Fusarium moniliforme* strains from various substrates and geographic areas. Appl. Environ. Microbiol., 57: 2410-2412.
- Nelson, P.E.**, Plattner, R.D., Shackelford, D.D. and Desjardins, A.E. 1992c. Fumonisin B<sub>1</sub> production by *Fusarium* species other than *Fusarium moniliforme* in section Liseola and by some related species. Appl. Environ. Microbiol., 58(3) :984-989.

**Nelson, P.E.,** Toussoun, T.A., and Marasas, W.F.O. 1983. *Fusarium species*. An illustrated Manual for Identification. The Pennsylvania State University, USA. 128-131.

**Norred, W.P.,** Voss, K.A., Bacon, C.W. and Riley, R.T. 1991. Effectiveness of ammonia treatment in detoxification of fumonisin-contaminated corn. Food Chem. Toxicol. 29:815-819.

**Norred, W.P.,** Plattner, R.D., Vesonder, R.F., Bacon, C.W. and Voss, K.A. 1992. Effects of selected secondary metabolites of *Fusarium moniliforme* on unscheduled synthesis of DNA by rat primary hepatocytes. Food Chem. Toxicol., 30:233-237.

**Norred, W.P.** and Voss, K.A. 1994. Toxicity and role of fumonisins in animal diseases and human esophageal cancer. J. Food Prot., 57(6): 522-527.

**Ortiz-Cereceres, J.** 1983. Algunos aspectos agronómicos y genotécnicos de la germinación prematura en maíz. Informe de actividades 1979-1983. Convenio de Colaboración Académica. Colegio de Postgraduados- Universidad Nacional Autónoma de México. 19-25.

**Osweiler, G.D.,** Ross, P.F., Wilson, T.M., Nelson, P.E. and Witte, S.T. 1992. Characterization of an epizootic of pulmonary edema in swine associated with fumonisin in corn screenings. J. Vet. Diagn. Invest., 4:53-59.

**Paredes, L.O.** and Saharopulos, M.E. 1982. Scanning electron microscopy of limed corn kernels for tortilla making. J. Food Technol., 17:687-692.

**Park, D.L.,** Lopez, G.R., Trujillo, P.S. and Price, R.L. 1996. Reduction of risks associated with fumonisin contamination in corn. Adv. Exp. Med. Biol. 392: 335-344.

**Peña, S.D.** y Durán de Bazúa, M.C. 1990. Efecto tóxico de aflatoxinas en la dieta. Ciencia y desarrollo, Vol. XVI (94): 61-70.

**Pittet, A.,** Parisod, V. and Schellenberg, M. 1992. Occurrence of Fumonisin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> in corn based products from the swiss market. J. Agric. Food Chem., 40:1352-1354.

**Pont, G.J.,** Jordana, P., Campanera, R. y Arroyo, R. 1989. El problema de la contaminación fúngica en la industria de piensos. LUCTA. 2ª. Ed. Barcelona, España. 21-37.

**Rheeder, J.P.,** Marasas, W.F.O., Thiel, P.G., Sydenham, E.W., Shephard, G.S. and Vanschalkwyk, T. 1992. *Fusarium moniliforme* and fumonisins in corn in relation to human esophageal cancer in Transkei. Phytopathology, 82:353-357.

**Rice, G.L.** and Frank, P.R. 1994. Methods for detection and quantitation of fumonisins in corn, cereal products and animal excreta. *J.Food Prot.*, 5 (6): 536-540.

**Riley, R.T.**, An, N.Y., Showker, J.L., Yoo, H.S., Norred, W.P., Chamberlain, W.J., Wang, E. and Merrill, A.H. 1993a. Alteration of tissue and serum sphinganine to sphingosine ratio: An early biomarker in pigs of exposure to fumonisin-containing feeds. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 118:105-112.

**Riley, R.T.**, Hinton, D.M., Chamberlain, W.J., Bacon, C.W., Wang, E., Merrill, A.H. and Voss, K.A. 1994a. Dietary Fumonisin B<sub>1</sub> induces disruption of sphingolipid metabolism in Sprague Dawley rats : A new mechanism of nephrotoxicity. *J. Nutr.*, 124 :594-603.

**Riley, R.T.**, Voss, K.A., Soo Yool, H., Gelderblom, W.C.A. and Merrill, A.H. 1994b. Mechanism of Fumonisin toxicity and carcinogenesis. *J.Food Prot.*, 57(6) :528-535.

**Riley, R.T.**, Norred, W.P. and Bacon, Ch.W. 1993b. Fungal toxins in foods. *Recent Concerns. Annu. Rev. Nutr.*, 13:167-189.

**Rodríguez, S.R.S.** 1994. Estudio preliminar de correlaciones entre el desarrollo de colonias de *Fusarium moniliforme in vitro*, escala visual del daño en mazorca y contenido de fumonisinas en el cultivo de maíz (*Zea mayz L.*) Tesis de Licenciatura Ing. Agrícola de U.A.G. 7-21.

**Ross, P.F.**, Nelson, P.E., Owens, D.L., Rice L.G., Nelson, H.A. and Wilson T.M. 1994. Fumonisin B<sub>2</sub> in cultured *Fusarium proliferatum* M-6104, causes equine leukoencephalomalacia. *J. Vet. Diagn. Invest.* (In press). In: Riley, R.T., Voss, K.A., Soo Yool, H., Gelderblom, W.C.A. and Merrill, A.H. 1994b. Mechanism of Fumonisin toxicity and carcinogenesis. *J.Food Prot.*, 57(6) :528-535.

**Ross, P.F.**, Nelson, P.E., Richard, J.L., Osweiler, G.D., Rice, L.G., Plattner, R.D. and Wilson, T.M. 1990. Production of Fumonisins by *Fusarium moniliforme* isolates associated with equine leukoencephalomalacia and pulmonary edema syndrome in swine. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56 :3225-3226.

**Ross, P.F.**, Rice, L.G., Plattner, R.D., Osweiler, G.D. and Wilson, T.M. 1991. Concentrations of fumonisin B<sub>1</sub> in feeds associated with animal health problems. *Mycopathologia*, 114:129-135.

**Rothinghaus, E.G.**, Coathey, E.C. and Minor, C.H. 1992. A rapid sensitive thin layer chromatography procedure for detection of fumonisin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub>. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 40 :326-329.

- Sala, N., Sanchis, V., Vilaro, P., Viladrich, R., Torres, M., Viñas, I. and Canela, R.** 1994. Fumonisin producing capacity of *Fusarium* strains isolated from cereals in Spain. *J. Food Prot.*, 10 :915-917.
- Sánchez, E., Albores, M. Galindo, J. y Ortíz-Cereceres, J.** 1983. Informe de actividades 1979-1983. Convenio de colaboración Académica. Colegio de Postgraduados. Universidad Nacional Autónoma de México. 22 pp.
- Sánchez, S.M.R.** 1987. Estudio anatomopatológico de tres casos de Leucoencefalomalacia en Equinos. Tesis de Licenciatura de la Fac. de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la U.N.A.M. 16-25.
- Schroeder, P.M. , Crane, H.M., Xia, J., Liotta, D.C. and Merrill, A.M.** 1994. Disruption of sphingolipid metabolism and stimulation of DNA synthesis by fumonisin B<sub>1</sub>. *J. Biol. Chem.*, 269(5):3475-3481.
- Scott, P.M.** 1993. Fumonisins. *International J. Food Microbiol.*, 18: 257-270.
- Scott, P.M. and Lawrence, G.A.** 1992. Stability and problems in recovery of fumonisins added to corn-based foods. *J. AOAC International*, 75:829-834.
- Segal, I., Reinach, S.G. and Beer, M.** 1988. Factors associated with esophageal cancer in Soweto, South Africa. *Br. J. Cancer*, 56: 681-686.
- Serna-Saldivar, S.O., Gómez, M.H. and Rooney, L.W.** 1990. Technology, chemistry and nutritional value of alkaline cooked corn products. *In: Advances in cereal Science and Technology*; Pomeranz, Y., Ed. American Association of Cereal Chemists: St. Paul, MN., 10: 243-307.
- Shephard, G.S., Sydenham, E.W., Thiel, P.G. and Gelderblom, W.C.A.** 1990. Quantitative determination of fumonisins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Liq. Chromatogr.* 13(10):2077-2087.
- Shephard, G.S., Thiel, P.G., Sydenham, E.W., Vleggaar, R. and Alberts, J.F.** 1994. Determination of the mycotoxin fumonisin B<sub>1</sub> and identification of its partially hydrolyzed metabolites in the feces of non human primates. *Food and Chemical Toxicology*, 32:23-29.
- Shephard, G.S., Thiel, P.G., Stockenström, S. and Sydenham, E.W.** 1996. Worldwide survey of fumonisin contamination of corn and corn based products. *J. AOAC Int.*, 79(3): 671-687.
- Shier, W.T., Abbas, H.K. and Mirocha, C.J.** 1991. Toxicity of mycotoxins fumonisin B<sub>1</sub> and FB<sub>2</sub> and *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici* toxin (AAL) in cultured mammalian cells. *Mycopathologia*, 116:97-104.

- Shier, W.T., Abbas, H.K. and Badria, F.A.** 1995. Complete structures of the sphingosine analog mycotoxins fumonisin B<sub>1</sub> and AAL toxin T<sub>A</sub>: absolute configuration of the side chains. *Tetrahedron Letters*. 36:15-71-1574.
- Smith, E.R. and Merrill, A.H. Jr.** 1993. Altering *de novo* sphingolipid biosynthesis affects phospholipid profiles in J774 macrophages. *FASEB J.* 7:A173 (Abstract). *In:* Riley, R.T., Voss, K.A., Soo Yool, H., Gelderblom, W.C.A. and Merrill, A.H. 1994b. Mechanism of Fumonisin toxicity and carcinogenesis. *J. Food Prot.*, 57(6) :528-535.
- Snedecor, G.W. y Cochran, W.G.** 1997. *Métodos Estadísticos*. CECSA. México. 321-407.
- Stack, M.E.** 1998. Analysis of fumonisin B<sub>1</sub> and its hydrolysis product in tortillas. *J. AOAC. Int.*, 81:737-740.
- Stack, M.E. and Eppley, R.M.** 1992. Liquid chromatographic determination of fumonisins B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> in corn and corn products. *J. AOAC. Int.*, 75: 834-837.
- Steel, R.G.D. y Torrie, J.H.** 1986. *Bioestadística: Principios y Procedimientos*. Segunda Edición. Ed. McGraw-Hill. México D.F. 466-478.
- Sydenham, E.W., Gelderblom, W.C.A., Thiel, P.G. and Marasas, W.F.O.** 1990a. Evidence for the natural occurrence of fumonisin B<sub>1</sub>, a mycotoxin produced by *Fusarium moniliforme* in corn. *J. Agric. Food Chem.*, 38(1) :285-290.
- Sydenham, E.W., Marasas, W.F.O., Shephard, G.S., Thiel, P.G. and Hirooka, E.Y.** 1992a. Fumonisins concentrations in Brazilian feeds associated with field outbreaks of confirmed and suspected animal mycotoxicoses. *J. Agric. Food Chem.*, 40 :994-997.
- Sydenham, E.W., Shephard, S.G. and Thiel, G.P.** 1992b. Liquid chromatographic determination of fumonisins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> and B<sub>3</sub> in foods and feeds. *J. AOAC International*, 2: 313-318.
- Sydenham, E.W., Shephard, G.S., Thiel, P.G., Marasas, W.F.O. and Stockenström, S.** 1991. Fumonisin contamination of commercial corn-based human foodstuffs. *J. Agric. Food Chem.*, 39 :2014-2018.
- Sydenham, E.W., Shephard, G.S., Thiel, P.G., Marasas, W.F.O., Rheeder, J.P., Peralta Sanhueza, C.E., González, H.H.L. and Resnik, S.L.** 1993. Fumonisins in Argentinian field-trial corn. *J. Agric. Food Chem.*, 41:891-895.
- Sydenham, E.W., Shephard, G.S., Thiel, P.G., Marasas, W. F.O. and Koch, K.R.** 1990b. 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.



**Sydenham, E.W.**, Stockenstrom, S., Thiel, P.G., Shephard, G.S., Koch, K.R. and Marasas, W.F.O. 1995. Potential of alkaline hydrolysis for the removal of fumonisins from contaminated corn. *J. Agric. Food Chem.* 43:1198-1201.

**Tejeda, M.V.**, Marovatsanga, L.T. and Pestka, J.J. 1994. Comparative detection of fumonisin by HPLC, Elisa and Immunocyto-chemical localization in *Fusarium* cultures. *J. Food Prot.* 6 :666-672.

**Thakur, R.A.** and Smith, J.S. 1996. Determination of fumonisins B1 and B2 and their major hydrolysis products in corn, feed and meat, using HPLC. *J. Agric. Food Chem.* 44:1047-1052.

**Thiel, P.G.**, Marasas, W.F.O., Sydenham, E.W., Shephard, G.S., Gelderblom, W.C.A. and Niewwenhuis, J.J. 1991 a. Survey of fumonisin production by *Fusarium* species. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57(4) :1089-1093.

**Thiel, P.G.**, Marasas, W.F.O. and Sydenham, E.W. 1992. The implications of naturally occurring levels of fumonisins in corn for human and animal health. *Mycopathologia*, 117 :3-9.

**Thiel, P.G.**, Sydenham, E.W., Shephard, G.S., Marasas, W.F.O., Nelson, P.E. and Wilson, T.M. 1991 b. Levels of fumonisins B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> in feeds associated with confirmed cases of equine leukoencephalomalacia. *J. Agric. Food Chem.*, 39:109-111.

**Thomas, M.D.** and Buddehagen, I.W. 1992. Incidence and persistence of *Fusarium moniliforme* in symptomless maize kernels and seedlings in Nigeria. *Mycologia*, 77:882-887.

**Ueno, Y.**, Sugiura, A.S., Wang, D-S, Lee, U.S., Hiroka, E.Y., Hara, S., Karki, T. Chen, G. and Yu, S-Z. 1993. A limited survey of fumonisins in corn and corn based products in Asia countries. *Mycotoxin Research*, 9:27-34.

**Viljoen, J.H.**, Marasas, W.F.O. and Thiel, P.G. 1993. Fungal infection and mycotoxin contamination of commercial maize. In: *Cereal Science and Technology-Impact on a Changing South Africa*; Taylor, J.R.N., Randall, P.G., Viljoen, J.H. Eds. CSIR: Pretoria. 837-853.

**Viquez, O.M.**, Castell-Perez, M.E. and Shelby, R.A. 1996. Occurrence of fumonisin B1 in maize grown in Costa Rica. *J. Agric. Food Chem.*, 44:2789-2791.

**Visconti, A.** and Doko, B. 1994. Survey of fumonisin production by *Fusarium* isolated from cereals in Europe. *J. AOAC International*, 77(2) :546-550.

**Voss, K.A.**, Norred, W.P., Plattner, R.D. and Bacon, C.W. 1989. Hepatotoxicity and renal toxicity in rats of corn samples associated with field cases of equine leukoencephalomalacia. *Food Chem. Toxicol.*, 27:89-96.

- Voss, K.A.**, Norred, W.P. and Bacon, C.W. 1992. Subchronic toxicological investigations of *Fusarium moniliforme*-contaminated corn, culture material and ammoniated culture material. *Mycopathologia*, 117 :97-104.
- Wang, E.**, Norred, C.W., Bacon, R.T., Riley, R.T. and Merrill, A.H.Jr. 1991. Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins: Implications for diseases associated by *Fusarium moniliforme*. *J. Biol. Chem.*, 266:14486-14490.
- Wang, E.**, Ross, P.F., Wilson, T.M., Riley, R.T. and Merrill, A.H. 1992. Increases in serum sphingosine and sphinganine and decreases in complex sphingolipids in ponies given feed containing fumonisins, mycotoxins produced by *Fusarium moniliforme*. *J. Nutr.*, 122 :1706-1716.
- Ware, G.M.**, Umrigar, P.P. and Carman, S.S. Jr., 1994. Evaluation of fumonitest immunoaffinity columns. *Analytical Letters*, 27(4): 693-715.
- Weibking, T.S.**, Ledoux, D.R., Bermudez, A.J., Turk, J.R. and Rottinghaw, G.E. 1993. Effects of feeding *Fusarium moniliforme* culture material, containing known levels of fumonisins B<sub>1</sub> on the young broiler chick. *Poultry Sci.*, 72 :456-466.
- Weinstein, B.** 1991. Mitogenesis is only one factor in carcinogenesis. *Science*, 251:387-388.
- Wilson, T.M.** and Marapont, R.R. 1971. Causative fungal agent of leucoencephalomalacia in equine animals. *Vet. Rec.*, 88:484-486.
- Wilson, T.M.**, Ross, P.F., Owens, D.L., Rice, L.G. and Green, S.A. 1990. Fumonisin B<sub>1</sub> levels associated with an epizootic of equine leucoencephalomalacia. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 2:213-216.
- Yang, C.S.** 1980. Research on esophageal cancer in China: A review. *Cancer Res.*, 40:2633-2644.
- Yoo, H-S.**, Norred, W.P., Wang, E., Merrill, A.H., Jr. and Riley, R.T. 1992. Fumonisin inhibition of the *novo* sphingolipid biosynthesis and cytotoxicity are correlated in LLC-PK cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol*, 114: 9-15.
- Yoshizawa, T.**, Yamashita, A. and Luo, Y. 1994. Fumonisin occurrence in corn form high and low risk areas for human esophageal cancer in China. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60(5) :1626-1629.

## ANEXO 1

Análisis estadístico de UFC en las variedades de maíz  
UDG-600, UDG-601 y UDG-602 de Ameca, Jalisco

Variedad de maíz		
UDG-600	UDG-601	UDG-602
133.33	3045.45	4200
3123.07	119.23	725
90.9	81.81	83.3
1100	1590.9	52571.42
2461.53	8.42	1214.28
727.27	375	678.57
1561.5	586.46	130.76
444.44	538.46	320
20000	2538.46	2800
27.05	43538.38	3071.42

## Análisis de varianza de un factor

## RESUMEN

Grupos	n	Suma	Promedio	Varianza
UDG-600	10	29669.09	2966.909	36909856.5
UDG-601	10	52422.57	5242.257	182202548
UDG-602	10	65794.75	6579.475	263151100

## ANÁLISIS DE VARIANZA

Fuente	S.C.	G.L.	C.M.	F	Probabilidad	F. Tablas
Tratamientos	66719978.7	2	33359989.3	0.20752134	0.81387988	3.3541312
Error exp.	4340371548	27	160754502			
Total	4407091526	29				

## ANEXO 2

Análisis estadístico de fumonisinas en las variedades de maíz  
UDG-600, UDG-601 y UDG-602 de Ameca, Jalisco

	Variedad de maíz		
	UDG-600	UDG-601	UDG-602
Fumonisinas	3.1	3.3	1.2
(ppm)	3.5	6.2	5.2
	2.5	2.2	8.3
	9	7.2	15
	22	4	6.4
	2.3	5.6	6.7
	2.8	12	4
	11	2.2	7.4
	4.5	16	3.7
	5.9	2.5	9.9

## Análisis de varianza de un factor

## RESUMEN

Grupos	n	Suma	Promedio	Varianza
UDG-600	10	66.6	6.66	37.6382222
UDG-601	10	61.2	6.12	21.1017778
UDG-602	10	67.8	6.78	14.5551111

## ANÁLISIS DE VARIANZA

Fuente	S.C.	G.L.	C.M.	F	Probabilidad	F.Tablas
Tratamientos	2.472	2	1.236	0.05059	0.95075825	3.3541312
Error exp.	659.656	27	24.4317037			
Total	662.128	29				

## ANEXO 3

Análisis estadístico de UFC en Huejotitán,  
municipio de Jocotepec, Jalisco.

## Daño visual de las mazorcas

(UFC g-1)

<2%	2-10%	10-25%
4000	7000	90000
12000	3000	1160000
20000	150000	5000
300	1100	
1400	90000	
80000	12000	
1100	32000	
80000		
3000		

## Análisis de varianza de un factor

## RESUMEN

Grupos	N	Suma	Promedio	Varianza
<2%	9	201800	22422.2222	1105931944
2-10%	7	295100	42157.1429	3231106190
10-25%	3	1255000	418333.333	4.1436E+11

## ANÁLISIS DE VARIANZA

Fuente	S.C.	G.L.	C.M.	F	Probabilidad	F. Tablas
Tratamientos	3.8044E+11	2	1.9022E+11	3.55156285	0.05291684	3.63371555
Error exp.	8.5695E+11	16	5.3559E+10			
Total	1.2374E+12	18				

## ANEXO 4

## Análisis estadístico de UFC en Ameca, Jalisco.

Daño visual de las mazorcas  
(UFC g-1)

<2%	2-10%	25-50%
133.33	3123.07	586.46
90.9	2461.53	43538.38
1100	727.27	52571.42
1561.5	3045.45	678.57
444.44	1590.9	
20000	375	
27.05	2538.46	
119.23	1214.28	
81.81		
8.42		
538.46		
4200		
725		
83.3		
136.76		
320		
2800		
3071.42		

## Análisis de varianza de un factor

## RESUMEN

Grupos	n	Suma	Promedio	Varianza
<2%	18	35441.62	1968.97889	21762763.9
2-10%	8	15075.96	1884.495	1113665.03
25-50%	4	97374.83	24343.7075	763228249

## ANÁLISIS DE VARIANZA

Fuente	S.C.	G.L.	C.M.	F	Probabilidad	F. Tablas
Tratamientos	1739586588	2	869793294	8.80407953	0.00113846	3.3541312
Error exp.	2667447388	27	98794347.7			
Total	4407033976	29				

## ANEXO 5

### Análisis estadístico de los niveles de fumonisinas en el maíz de Huejotitán, municipio de Jocotepec, Jalisco

#### Daño visual de las mazorcas

Fumonisinas (ppm)	<2%	2-10%	10-25%
	9.2	9.2	8.9
	9.7	9.1	10
	11	12	9.1
	8.5	17	
	9.8	8.5	
	9.9	9.1	
	9.6	9	
	12.1		
	12.1		

#### Análisis de varianza de un factor

##### RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>n</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
<2%	9	91.9	10.2111111	1.57611111
2-10%	7	73.9	10.5571429	9.38952381
10-25%	3	28	9.33333333	0.34333333

##### ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Fuente</i>	<i>S.C.</i>	<i>G.L.</i>	<i>C.M.</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>F. Tablas</i>
Tratamientos	3.14730159	2	1.57365079	0.36158893	0.70211684	3.63371555
Error exp.	69.6326984	16	4.35204365			
Total	72.78	18				

## ANEXO 6

Análisis estadístico de los niveles de fumonisinas  
en el maíz de Ameca, Jalisco.

Fumonisinias (ppm)	<2%	2-10%	25-50%
	3.1	3.5	12
	2.5	22	2.5
	9	2.3	15
	2.8	3.3	6.7
	11	7.2	
	4.5	5.6	
	5.9	16	
	6.2	6.4	
	2.2		
	4		
	22		
	1.2		
	5.2		
	8.3		
	4		

## RESUMEN

Grupos	n	Suma	Promedio	Varianza
<2%	18	112.9	6.27222222	23.2785948
2-10%	8	66.3	8.2875	49.0183929
25-50%	4	36.2	9.05	30.8433333

## ANÁLISIS DE VARIANZA

Fuente	S.C.	G.L.	C.M.	F	Probabilidad	F.Tablas
Tratamientos	38.6331389	2	19.3165694	0.62731609	0.54162716	5.48812
Error exp.	831.394861	27	30.7924023			
Total	870.028	29				



## ANEXO 7

Análisis estadístico de la detección de fumonisinas  
en maíz de Huejotitán y Ameca, Jalisco

	Fumonisin (ppm)	
	Ameca	Huejotitán
3.1	22	9.2
2.5	2.3	9.7
9	3.3	11
2.8	7.2	8.5
11	5.6	9.8
4.5	16	9.9
5.9	6.4	9.6
6.2	12	12.1
2.2	2.5	12.1
4	15	9.2
22	6.7	9.1
1.2		12
5.2		17
8.3		8.5
4		9.1
7.4		9
3.7		8.9
9.9		10
3.5		9.1

## Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales

	Ameca	Huejotitán
Media	7.18	10.2
Varianza	30.00096552	4.043333333
Observaciones	30	19
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	40	
Estadístico t	-2.74223917	
P(T<=t) una cola	0.00454161	
Valor crítico de t (una cola)	1.683852133	
P(T<=t) dos colas	0.00908322	
Valor crítico de t (dos colas)	2.021074579	

## ANEXO 8

### Análisis estadístico de la detección de fumonisinas en la zona metropolitana de Guadalajara

	masa	tortilla		masa	tortilla		
Libertad	0.5	0.9	Reforma	3.4	3.1		
	3.8	1.7		3.1	2		
	2.5	1.7		1.6	1.6		
	2.3	3.3		1.1	0.56		
	2	0.7		1.3	0.9		
	1.1	0.1		0.7	0.9		
	2.2	0.6		1.4	2		
	0.76	0.17		1.1	0.8		
	2.1	1.6		2.6	0.8		
	2.87	2		1.4	1.3		
	Hidalgo	1.6		0.2			
		1.3		0.9			
		1.4		0.8			
1.3		1.1					
1.8		0.9					
1.1		1.2					
1.6		1					
1.8		1.5					
0.73		0.16					
2.43		1.07					
Juárez	0.9	0.5					
	1.3	0.9					
	0.8	1					
	1.8	1.1					
	1	0.5					
	1.3	1.2					
	1.4	2					
	1.6	0.5					
	0.7	1					
	1.6	1.3					

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales

	masa	tortilla
Media	1.63225	1.139
Varianza	0.59417173	0.49692718
Observaciones	40	40
Varianza agrupada	0.54554946	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	78	
Estadístico t	2.98651726	
P(T<=t) una cola	0.00188472	
Valor crítico de t (una cola)	1.66462542	
P(T<=t) dos colas	0.00376944	
Valor crítico de t (dos colas)	1.99084752	

## ANEXO 9

### Análisis estadístico de fumonisinas de masa y tortilla por sectores en la zona metropolitana de Guadalajara

#### Análisis de varianza de un factor

#### Masa

libertad	hidalgo	juarez	reforma
0.5	1.6	0.9	3.4
3.8	1.3	1.3	3.1
2.5	1.4	0.8	1.6
2.3	1.3	1.8	1.1
2	1.8	1	1.3
1.1	1.1	1.3	0.7
2.2	1.6	1.4	1.4
0.76	1.8	1.6	1.1
2.1	0.73	0.7	2.6
2.87	2.43	1.6	1.4

#### RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
libertad	10	20.13	2.013	0.99809
hidalgo	10	15.06	1.506	0.21193778
juarez	10	12.4	1.24	0.14044444
reforma	10	17.7	1.77	0.85344444

#### ANÁLISIS DE VARIANZA

Fuente	S.C.	G.L.	C.M.	F	Probabilidad	F. Tablas
Entre grupos	3.3374475	3	1.1124825	2.01910084	0.12857346	2.86626545
Dentro de los	19.83525	36	0.55097917			
Total	23.1726975	39				

#### Tortilla

libertad	hidalgo	juarez	reforma
0.9	0.2	0.5	3.1
1.7	0.9	0.9	2
1.7	0.8	1	1.6
3.3	1.1	1.1	0.56
0.7	0.9	0.5	0.9
0.1	1.2	1.2	0.9
0.6	1	2	2
0.17	1.5	0.5	0.8
1.6	0.16	1	0.8
2	1.07	1.3	1.3

#### Análisis de varianza de un factor

#### RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
libertad	10	12.77	1.277	0.95795667
hidalgo	10	8.83	0.883	0.17484556
juarez	10	10	1	0.21111111
reforma	10	13.96	1.396	0.62060444

#### ANÁLISIS DE VARIANZA

Fuente	S.C.	G.L.	C.M.	F	Probabilidad	F. Tablas
Entre grupos	1.6995	3	0.5665	1.15346373	0.34087534	2.86626545
Dentro de los	17.68066	36	0.49112944			
Total	19.38016	39				

## ANEXO 10

### Análisis de Varianza del efecto del proceso de nixtamalización. Transformación Logarítmica

Fuente	Grados de Libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F calculada	F tablas	
					0.05	0.01
Tratamientos	15	26.60828	1.773885	5.596912	2.275 **	2.655 **
Molinos	3	8.562136	2.854045	9.005002	2.901 **	4.459 **
Productos	3	15.90011	5.300036	16.72252	2.901 **	4.459 **
Interacción	9	2.146036	0.238448	0.752346	2.189 ns	3.021 ns
Error	32	10.14208	0.31694			
Total	47	36.75036				

\*\* diferencia altamente significativa  
ns diferencia no significativa

### Tabla de Contrastes Ortogonales

Maíz	Nixt.	Masa	Tortilla	Zw	Zw <sup>2</sup>	Dw	$\frac{Zw^2}{Dw}$	fc	ft	
									0.05	0.01
48.5 a	10.01 a	21.3 a	9.38 a							
3	-1	-1	-1	104.8	10985	72	152.5	23.12	4.35	8.1 **
0	-1	2	-1	23.21	538.7	36	14.96	2.267	4.35	8.1 ns
0	1	0	-1	0.63	0.39	12	0.033	0.005	4.35	8.1 ns

\*\* : diferencia altamente significativa  
ns: diferencia no significativa

- a: Totales de fumonisinas para cada uno de los productos
- Zw: Valor de la diferencia detectada en la comparación descrita (para el primer caso se compara el contenido de maíz, contra los otros productos)
- Zw<sup>2</sup>: Diferencia elevada al cuadrado
- Dw: Número por el cual se debe dividir la diferencia al cuadrado
- $\frac{Zw^2}{Dw}$ : Suma de cuadrado de la comparación
- Fc: Valor de F calculado que se debe comparar con el de Tablas para aceptar o rechazar la hipótesis nula.

## ANEXO 11

### Análisis estadístico de la detección de FB<sub>1</sub> y FB<sub>2</sub> mediante Cromatografía de líquidos

#### Detección de FB1

Maíz	Masa	Tortilla
922.49	15640.17	6,851.44
630.6	2621.56	0
16783.55	2059.63	10109.25
658.2	2581.78	0
7718.95	4259.04	9698.64
16557.87	3917.82	0
19867.03	2551.1	12612.8
1148.79	13122.08	0
1024.01	10275.28	0

#### Análisis de varianza de un factor

##### RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Maíz	9	65311	7256.832222	6.8E+07
masa	9	57028	6336.495556	2.7E+07
tortilla	9	39272	4363.57	2.9E+07

##### ANÁLISIS DE VARIANZA

FUENTE	S.C.	G.L.	C.M.	F	Probabilidad	F. Tablas
Entre grupos	39331263.34	2	19665631.67	0.47677	0.62654158	3.402831794
Dentro de los grupos	989947943.8	24	41247830.99			
Total	1029279207	26				

#### Detección de FB2

Maíz	Masa	Tortilla
244.22	62.29	0
239.68	15.98	0
108.83	62.89	0
67.2	0	135.17
181.43	0	0
155.26	102.92	0
105.8	58.27	234.33
99.65	95.73	0
82.31	106.2	86.72

#### Análisis de varianza de un factor

##### RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Maíz	9	1284.4	142.7088889	4384.81
masa	9	504.28	56.03111111	1783.22
tortilla	9	456.22	50.69111111	7196.94

##### ANÁLISIS DE VARIANZA

FUENTE	S.C.	G.L.	C.M.	F	Probabilidad	F. Tablas
Entre grupos	48026.47256	2	24013.23628	5.39019	0.01165532	3.402831794
Dentro de los grupos	106919.8057	24	4454.991903			
Total	154946.2782	26				

## ANEXO 12

### Análisis estadístico de la detección de HFB<sub>1</sub> mediante Cromatografía de líquidos

#### Detección de HFB<sub>1</sub>

Maíz	Masa	Tortilla
70.89	257.22	347.01
38.93	333.99	613.81
46.64	342.67	557.76
64.1	170.93	442.81
92.54	1234.06	756.94
64.4	339.17	1432.62
56.71	578.49	312.97
161.84	515.69	656.57
177.79	941.16	2741.8

#### Análisis de varianza de un factor

##### RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Maíz	9	773.84	85.98222222	2502.13
masa	9	4713.4	523.7088889	122528
tortilla	9	7862.3	873.5877778	600977

##### ANÁLISIS DE VARIANZA

FUENTE	S.C.	G.L.	C.M.	F	Probabilidad	F. Tablas
Entre grupos	2803027.148	2	1401513.574	5.79132	0.00886493	3.402831794
Dentro de los grupos	5808053.647	24	242002.2353			
Total	8611080.796	26				