

1998-A

081353484

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS DE LA SALUD
MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA SALUD AMBIENTAL



"VALORACION DEL EFECTO DEL PROCESO DE
NIXTAMALIZACION Y ELABORACION DE LA TORTILLA
SOBRE LOS NIVELES DE FUMONISINAS"

T E S I S P R O F E S I O N A L

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A
PATRICIA LANDEROS RAMIREZ

ZAPOPAN, JALISCO, DICIEMBRE DE 1999

DIRECTORA

M. C. WALDINA PATRICIA REYES VELAZQUEZ

ASESORES

M. C. RICARDO NUÑO ROMERO
Dr. FRANCISCO TRUJILLO CONTRERAS
Dr. AGUSTIN RAMIREZ ALVAREZ
M. C. MARTHA GEORGINA OROZCO MEDINA

AGRADEZCO

A la Universidad de Guadalajara por brindarme la oportunidad de superarme día con día.

Al Dr. Agustín Ramírez Álvarez, Jefe del Departamento de Salud Pública del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias por todo su apoyo.

A la M. C. Waldina Patricia Reyes Velázquez por la dirección y valiosa ayuda en la realización del presente trabajo, así como por su amistad

Al M. C Ricardo Nuño Romero, Dr. Francisco Trujillo Contreras, M. C. Martha Georgina Orozco Medina, M. C. Javier García Velasco, Ma. Cruz Arriaga Ruíz, Asesores y miembros del Jurado, por sus valiosas observaciones y aportaciones que contribuyeron a enriquecer este trabajo.

A todos los maestros de la Maestría en Ciencias de la Salud Ambiental por su invaluable enseñanza, de manera especial a la M. C. Guadalupe Garibay Chávez.

A la Q. F. B. Yolanda López Illán y a la Q. F. B Cecilia Jiménez Plascencia por su amistad y apoyo.

*Con dedicatoria especial a
mis hijos: Andrea Y Edgardo
y a mi esposo Gilberto.*

*A mi hermana Caty,
por su gran apoyo y amistad
brindados en todo momento.*

*A la memoria de mi mamá
Hermelinda Ramírez.*

CONTENIDO

Agradecimientos	III
Dedicatorias	IV
Abreviaturas	V
Lista de Cuadros	VI
Lista de Figuras	VII
I RESUMEN	VIII
II INTRODUCCION	1
III JUSTIFICACION	4
IV MARCO TEORICO	7
4.1 El maíz y su importancia	7
4.2 Contaminación del maíz	10
4.3 Taxonomía y biología de <i>F. moniliforme</i>	12
4.4 Presentación de <i>F. moniliforme</i> en el maíz	14
4.5 Características de las fumonisinas	16
4.6 Presentación de Fumonisinas en el maíz y sus productos	17
4.7 Enfermedades relacionadas con las fumonisinas.....	19
4.8 Mecanismo de toxicidad de las fumonisinas	24
4.9 Posibles mecanismos de las fumonisinas como inductores de cáncer	28
4.10 Efecto de los procesos sobre la estabilidad de las fumonisinas.....	29
4.11 Proceso de nixtamalización y elaboración de la tortilla ..	30
4.12 Metodología analítica para la detección de fumonisinas.	35
V OBJETIVOS	37
5.1 Objetivo general	
5.2 Objetivos específicos	
VI MATERIAL Y METODO	38
6.1 Localización del Area de Estudio	38
6.2 Muestreo.....	38
6.3 Fase de Campo.....	40
6.4 Fase de Laboratorio.....	43
6.5 Materiales y Reactivos.....	43
6.6 Equipo.....	43
6.7 Técnica.....	44

6.8 Fase de Gabinete	47
VII RESULTADOS Y DISCUSION	48
7.1 Condiciones ambientales en el almacén del maíz	48
7.2 Proceso de nixtamalización y elaboración de la tortilla..	51
7.3 Detección de Fumonisinias	55
VIII CONCLUSIONES	63
IX BIBLIOGRAFIA	65
X ANEXOS	72

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Descripción	Página
1	Principales hongos y sus toxinas	12
2	Taxonomía de <i>Fusarium moniliforme</i>	14
3	Variables independientes en el proceso de nixtamalización y elaboración de la tortilla	40
4	Humedad relativa y temperatura de almacenamiento del maíz registradas en los diferentes molinos	48
5	Temperaturas y tiempos en el proceso de nixtamalización.....	52
6	Temperatura de la masa en los diferentes molinos	53
7	Condiciones de tiempo y temperatura durante la elaboración de la tortilla	54
8	Porcentaje de humedad registrada en los productos en la elaboración de la tortilla	54
9	Niveles de fumonisinas (ppm) en el maíz	57
10	Niveles promedio de fumonisinas detectados en los diferentes productos del proceso de nixtamalización y elaboración de la tortilla, en los molinos del sector Reforma de la ciudad de Guadalajara.....	60
11	Porcentaje de reducción en los niveles de fumonisinas en nixtamal, masa y tortilla respecto al maíz.....	61

LISTA DE FIGURAS

Figura	Descripción	Pág.
1	Estructura del grano de maíz	9
2	<i>Fusarium moniliforme</i>	13
3	Estructura química de las fumonisinas y su peso molecular (PM)	17
4	Metabolismo normal de esfingolípidos en células sanas de mamíferos	27
5	Alteración del metabolismo de esfingolípidos en células de mamíferos expuestas a fumonisinas	27
6	Localización del área de estudio.....	39
7	Recolección, procesamiento y análisis de muestras	41
8	Flujograma del proceso de nixtamalización y elaboración de la tortilla	42
9	Determinación de fumonisinas por el método de cromatografía por inmunoafinidad con detección fluorométrica.....	44
10	Temperatura ambiente (°C) registrada en los molinos del sector Reforma de la ciudad de Guadalajara	49
11	Porcentaje de humedad relativa (H.R) registrada en los molinos del sector Reforma de la ciudad de Guadalajara....	50
12	Niveles de fumonisinas encontrados en los diferentes productos durante el proceso de elaboración de la tortilla..	56
13	Niveles promedio de fumonisinas encontrados en los productos durante el proceso de elaboración de la tortilla..	58
14	Comportamiento de las fumonisinas durante el proceso de nixtamalización y elaboración de la tortilla en los cuatro molinos estudiados del sector Reforma de la ciudad de Guadalajara.....	59

RESUMEN

En México, el maíz representa un alimento básico para la población, por lo que su inocuidad es importante. Las fumonisinas son micotoxinas producidas por *Fusarium moniliforme* y pueden presentarse en cereales como el maíz, son las responsables de la leucoencefalomalacia equina, del edema pulmonar porcino, tienen efecto carcinogénico y hepatotóxico en ratas y se encuentran estrechamente relacionadas con el cáncer esofágico en humanos en ciertas regiones de Sudáfrica, India y China.

La nixtamalización, procesamiento tradicional del maíz para la producción de masa para tortilla, ha sido sugerido para descontaminar el maíz con fumonisinas, por lo que el objetivo del presente estudio fue valorar el efecto del proceso de nixtamalización y elaboración de la tortilla sobre los niveles de fumonisinas, para lo cual se seleccionaron aleatoriamente cuatro molinos del Sector Reforma de la Cd. de Guadalajara, obteniéndose muestras de maíz, nixtamal, masa y tortilla, las cuales se analizaron mediante el método de Cromatografía por Inmunoafinidad con detección Fluorométrica.

Los resultados se analizaron estadísticamente mediante contrastes ortogonales y análisis de varianza. Todas las muestras presentaron contaminación por fumonisinas, encontrándose valores promedio de 5.79 ppm, 1.47 ppm, 2.95 ppm y 1.41 ppm en maíz, nixtamal, masa y tortilla respectivamente, los niveles en el maíz fueron estadísticamente diferentes ($p < 0.01$) a los otros productos. El efecto del procesamiento alcalino permitió la reducción de los niveles de fumonisinas en el nixtamal en un 74.8% respecto a los niveles en el maíz, mientras que la reducción de fumonisinas en la tortilla con relación a lo encontrado en la masa fue de 52.2%. En conclusión se determinó que el proceso de nixtamalización y elaboración de la tortilla es eficaz en la reducción del contenido de fumonisinas en la tortilla, sin embargo las investigaciones actuales reportan hidrolizados de fumonisinas producto de la nixtamalización que pueden permanecer tóxicos en la matriz del alimento, lo cual debe ser estudiado en nuestro país.

II INTRODUCCION

La salud ambiental según la Organización Mundial de la Salud (OMS), forma parte de la salud pública y se ocupa de las formas de vida, las sustancias, las fuerzas y condiciones del entorno del hombre, que pueden ejercer una influencia sobre su salud y bienestar, de acuerdo a lo anterior las áreas que involucran su estudio y desarrollo son muy variadas puesto que la salud del hombre depende de innumerables factores ambientales con los que continuamente está interaccionando para el desarrollo de sus funciones y actividades cotidianas en cada una de las esferas en las que se conduce (Garibay, 1997)

Una de las áreas que competen a la salud ambiental y que repercute directamente en la salud del hombre es la Toxicología Alimentaria, ésta según Concon citado por Repetto (1995), es la rama de la Toxicología dedicada al estudio de la naturaleza, las fuentes y la formación de sustancias tóxicas en los alimentos, así como los efectos nocivos, los mecanismos y manifestaciones de estos efectos y la prevención de intoxicaciones mediante el establecimiento de los límites de seguridad de las sustancias.

De acuerdo a sus orígenes, los tóxicos alimentarios se pueden clasificar en cuatro grandes grupos: 1) Constituyentes tóxicos naturales; 2) Contaminantes biológicos (bacterias, hongos) y químicos; 3) Aditivos alimentarios y 4) Sustancias derivadas (Repetto, 1995)

En los países subdesarrollados se han presentado serios problemas de salud debido a ciertos factores entre los que destacan las enfermedades de transmisión alimentaria (ETAs) y la creciente contaminación de los alimentos. Entre las ETAs cabe mencionar a las infecciones entéricas, intoxicaciones de origen alimenticio, las parasitosis y las micotoxicosis alimentarias, éstas últimas ocasionadas por toxinas producidas por diversos hongos.

La importancia de los cereales y en especial del maíz, en la nutrición de millones de personas en todo el mundo es ampliamente reconocida. Debido a su ingesta relativamente elevada es los países en desarrollo, no se les puede considerar solo una fuente de energía, sino que además suministran cantidades notables de proteínas (FAO, 1993)

México al igual que otros países de América Latina, es una cultura del maíz, gran parte de las actividades individuales y sociales de sus habitantes dependen de esta planta. El maíz está presente en la mesa de los mexicanos en todas las épocas del año y en formas tan diversas como amplias son las necesidades (Pérez, 1996)

En la actualidad se conocen un gran número de micotoxinas, sobresaliendo por su importancia en la salud humana y animal, las aflatoxinas y las fumonisinas, ambas reconocidas por el Organismo Internacional de Investigaciones contra el Cáncer, como potentes agentes cancerígenos. Las fumonisinas son producidas principalmente por *Fusarium moniliforme* y *Fusarium proliferatum*, los cuales se presentan en el maíz destinado para consumo humano y animal en todo el mundo. Recientes investigaciones han demostrado que estas toxinas son responsables de la leucoencefalomalacia equina y del edema pulmonar porcino (Thiel *et al.*, 1991; Osweiller *et al.*, 1992)

Fusarium moniliforme, es un hongo que puede crecer y producir toxinas en diversos cereales incluyendo el maíz, trigo, arroz, sorgo y avena, que al ser ingeridos por el hombre o animales pueden provocar enfermedad e inclusive la muerte (Nelson *et al.*, 1992)

En algunas regiones de Sudáfrica, Irán y China, las fumonisinas han sido relacionadas con la alta incidencia de cáncer esofágico humano. El riesgo de toxicidad y el mecanismo de carcinogenicidad de las toxinas se encuentra bajo estudio (Riley *et al.*, 1994a)

La nixtamalización, procedimiento tradicional al que somete al maíz para la producción de masa para tortilla, con hidróxido de calcio y calor, se ha considerado como un proceso que reduce los niveles de micotoxinas (Sydenham *et al.*, 1991)

El presente trabajo de investigación valoró el efecto de las condiciones ambientales (temperatura y humedad relativa) y del proceso de nixtamalización y elaboración de la tortilla sobre los niveles de fumonisinas en el maíz y sus productos. La trascendencia del mismo radica en conocer la dinámica del tóxico presente en el maíz, a través del proceso antes mencionado e identificar cual de las fases es más eficiente en la reducción de las micotoxinas.

III JUSTIFICACION

La Toxicología se ha convertido en una disciplina indispensable para los profesionales relacionados de alguna manera con el vastísimo campo de la Salud, como parte de esta disciplina la toxicología alimentaria, pretende conocer los factores y condiciones que definen la toxicidad, riesgo y seguridad de las sustancias que se encuentran en los alimentos y la naturaleza de la respuesta del consumidor (Repetto, 1995)

La presencia de micotoxinas en los alimentos es un problema grave en todo el mundo, al consumir alimentos contaminados, éstos inducen a la presentación de problemas agudos, crónicos y subcrónicos, dependiendo de la concentración, duración de la exposición, la edad y estado nutricional. Siendo más prevalentes en países o regiones donde los granos y semillas son almacenados con alto contenido de humedad, tal es el caso de algunos países latinoamericanos, donde el maíz ha constituido por mucho tiempo la base de la dieta del hombre (Barragán, 1996)

Las micotoxinas más comunes que además se encuentran distribuidas en todo el mundo son producidas por los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*, este último tiene gran capacidad para crecer en un amplio rango de substratos, incluyendo el maíz. *Fusarium moniliforme* es una especie de gran interés en las investigaciones actuales, por ser considerado productor de toxinas potencialmente cancerígenas, como lo son las fusarinas y las fumonisinas (Norred y Voss, 1994; Bullerman y Tsai, 1994).

A nivel mundial, después de los insectos, los hongos son los principales causantes de la disminución de calidad de los cereales almacenados (González, 1995). Se han estudiado estos microorganismos desde el punto de vista bioquímico y microbiológico ya que sus efectos repercuten en la calidad y valor nutritivo de estos cereales, además de representar un riesgo a la salud pública y animal mediante la producción de toxinas, las cuales pueden causar lesiones hepáticas, renales, teratogénicas y mutagénicas (Task, 1989)

El maíz tiene un alto valor nutritivo y es rico en gluten, las evidencias indican que el consumo del maíz como principal alimento ha sido constante a partir del momento en que se inició la sedentarización de lo que hoy es México. Por otro lado, el maíz por el tiempo de almacenamiento y el grado de humedad en que se conserva, está expuesto a la contaminación de hongos productores de micotoxinas como las fumonisinas y éste al ser ingerido por las personas puede producir efectos tóxicos, causando problemas de salud pública (Valle, 1991)

El maíz representa cerca de la mitad del volumen total de alimentos que se consumen cada año en nuestro país. Este cereal se consume principalmente en forma de tortillas y ha generado una industria que aún cuando se encuentra en miles de pequeños establecimientos, es de enorme importancia. Con el consumo de maíz, la población mexicana satisface entre el 60 y 75% de sus necesidades de energía, el 60% de las proteínas y el 87% de calcio total de la dieta cuando se le consume en forma de tortilla (Pérez, 1996)

La industrialización de otros productos de maíz nixtamalizado constituye una alternativa redituable para la industria. Las tortillas de maíz ya no son únicas del mercado mexicano, principalmente a través del mercado de los Estados Unidos, los productos de maíz nixtamalizado se encuentran en diversas regiones del mundo incluyendo Europa, Asia, Africa y Australia (Almeida y Rooney, 1996)

En la actualidad el cáncer es una de las causas más importantes de mortalidad en el mundo; aunque el cáncer de esófago no figura entre las principales, cabe señalar que en algunas regiones de Sudáfrica, Irán y en el Norte de China se ha asociado la alta incidencia del cáncer esofágico humano con el consumo de maíz altamente contaminado con fumonisinas (Norred y Voss, 1994)

Aunque se han realizado varios estudios de efectos de los procesamientos del maíz sobre la estabilidad de las fumonisinas, está disponible una cantidad limitada de información. Hasta ahora las fumonisinas se han considerado un compuesto estable al calor (Alberts *et al.*, 1990)

La nixtamalización, que es un proceso tradicional del maíz para la producción de masa para tortilla, es también un método que ha resultado eficaz para reducir el nivel de fumonisinas (Sydenham *et al.*, 1991). La nixtamalización mejora el valor nutritivo del maíz, sin embargo en estudios recientes se han detectado hidrolizados de fumonisinas que pueden interactuar con los nutrientes para aumentar el efecto cancerígeno de *Fusarium moniliforme* y *Fusarium proliferatum* en el maíz (Hendrich *et al.*, 1993)

En Guadalajara como en todo el país, el maíz y los productos derivados de éste (principalmente la tortilla), son elementos fundamentales en la dieta, por lo que es importante valorar que tan eficaz resulta el proceso de nixtamalización y elaboración de la tortilla para disminuir el nivel de fumonisinas y por ende el riesgo a la salud que representa la ingestión de dichos alimentos contaminados con estas toxinas, ya que en un estudio previo (Reyes *et al.*, 1997) donde se valoró el nivel de fumonisinas en masa y tortilla en la Zona Metropolitana de Guadalajara, se encontraron valores promedio en tortillas de: 1.277 ppm, 0.883 ppm, 1.0 ppm, y 1.396 ppm en los sectores Libertad, Hidalgo, Juárez y Reforma respectivamente, encontrándose mayor contaminación con fumonisinas en los sectores Reforma y Libertad.

El desarrollo del presente estudio permitió dar respuesta a las siguientes preguntas:

1. ¿ Que influencia tienen la temperatura y la humedad relativa en el almacenamiento del maíz en relación a los niveles de fumonisinas?
2. ¿ El proceso de nixtamalización y elaboración de la tortilla, disminuyen el nivel de fumonisinas?
3. ¿ Los niveles de fumonisinas encontrados en los diferentes productos en la elaboración de la tortilla, comparados con los niveles encontrados en otros estudios, representan un riesgo para la salud humana?

IV MARCO TEORICO

4.1 El Maíz y su Importancia

El maíz (*Zea mays*), es uno de los cereales más importantes del mundo, suministra elementos nutritivos a los seres humanos y a los animales. El maíz, es el único cereal importante nativo del hemisferio occidental y originario de México. 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 (González, 1995)

El maíz es una de las plantas más útiles al hombre. Una de sus principales características es su gran adaptación, ya que se cultiva desde el Ecuador a diferentes latitudes norte a sur; desde el nivel del mar, hasta más de 3,200 msnm; en suelos y climas muy variables y con una tecnología muy diversa. Las principales regiones en el mundo con mejor productividad son: El cinturón o faja maicera en Estados Unidos con localización principal en Iowa e Illinois, Cuenca del Danubio en Europa, extendiéndose desde el Sudoeste de Alemania hacia el Mar Negro, las llanuras del Río Po, en el Norte de Italia, las llanuras del Norte de China, Noreste de Argentina, Sudeste de Brasil, América Central, Noroeste de América del Sur y México. Se adapta mejor a suelos húmedos y fértiles, en regiones subtropicales templadas y en regiones tropicales altas, con temperaturas altas durante el día y bajas durante la noche (Reyes, 1990)

Entre los países con mayor volumen de producción en maíz se encuentran: Estados Unidos, China, Brasil, México y Argentina. En México, representa el 43% de la superficie cultivada; por su volumen de producción, área cultivada y valor de producción, es el cultivo más importante (Reyes, 1990)

En 1998, la producción maicera en la República Mexicana se concentró en Jalisco, Estado de México, Chiapas y Michoacán, que tradicionalmente aportan el 78% de la producción nacional cada año (González, 1998)

Las siembras de maíz en México ocupan una superficie de casi ocho millones de hectáreas con una producción aproximada de 14 millones de toneladas (Rodríguez, 1994), representa aproximadamente el 50% del volumen total del alimento de consumo en México y proporciona a la población la mitad de las calorías requeridas. Del maíz total utilizado 59.5 % se consume en tortillas, un 4.7 % es procesado por la industria almidonera y el 35.8 % se destina a otros usos como: alimento animal, semillas, etc (González, 1995)

En México el 72% del total de producción de maíz se destina para consumo humano mientras que en Estados Unidos es aproximadamente el 10% (Rooney y Serna, 1987)

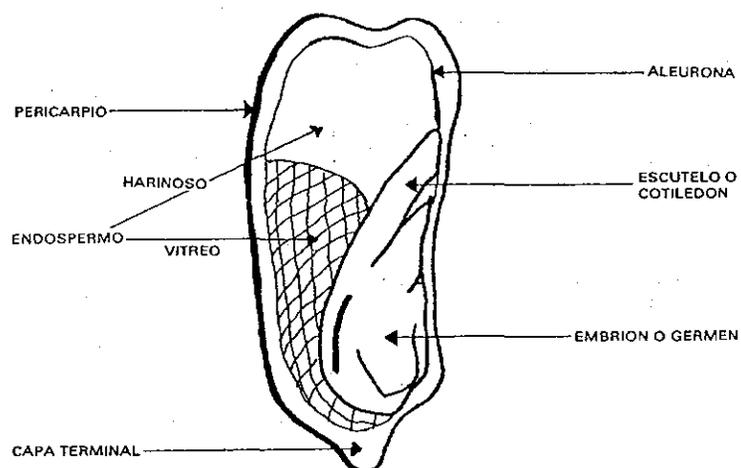
El consumo per cápita se calcula en 300 g/día que aportan el 56 % de las calorías y el 47 % de las proteínas en la alimentación del mexicano, en las áreas rurales estos porcentajes son del 76 % y 56 % respectivamente (González, 1995)

El maíz y sus derivados contienen casi todos los nutrimentos en mayor o menor cantidad, y su composición cambia según la variedad y otros factores ambientales. Los tipos de maíz que se producen en México reportan una composición promedio del 70% de hidratos de carbono, 8% de proteínas, 4% de grasa, 4 % de minerales y 3% de celulosa. Existen sin embargo, grandes variaciones en el contenido y calidad de la proteína entre los diferentes tipos de maíz (Pérez, 1996)

El fruto de la planta del maíz se llama comercialmente grano, botánicamente es un cariósido y agrícolamente se le conoce como semilla. En la figura 1 se indica el diagrama de un grano de maíz y el nombre de sus partes:

- Pericarpio: Cubierta del fruto, se conoce como testa, ollejo o cáscara.
- Aleurona: Capa de células del endospermo, de naturaleza proteica.
- Endospermo: Tejido de reserva de la semilla que alimenta al embrión durante la germinación. Es la parte de mayor volumen. Dos regiones bien diferenciadas hay en el endospermo suave o harinoso y el duro o endospermo vítreo. La proporción depende de la variedad.
- Escutelo o cotiledón: Parte del embrión.
- Embrión o germen: Planta en miniatura con la estructura para originar una nueva planta, al germinar la semilla.
- Capa terminal: Parte que se une al olote, con una estructura esponjosa, adaptada para la rápida absorción de humedad. Entre esta capa y la base del germen se encuentra un tejido negro conocido como capa hilar, la cual funciona como un mecanismo sellante durante la maduración del grano (la formación de la capa negra indica un grano maduro) (Reyes, 1990)

Figura 1. Estructura del grano de maíz



4.2 Contaminación del Maíz

Durante el cultivo del maíz se presentan diversos factores que afectan su calidad, entre los principales se encuentran los insectos y hongos, de estos últimos algunos pueden causar germinación prematura y pudrición de las mazorcas.

La contaminación por hongos productores de micotoxinas en los cultivos de cereales y consecuentemente en los granos destinados a nutrición humana y animal es un problema a nivel mundial, que indudablemente se ha hecho más evidente con el mejoramiento de las técnicas analíticas que han permitido identificar a un número cada vez mayor de estas sustancias. Los cereales contaminados con micotoxinas utilizados en nutrición animal, pueden causar no solo pérdidas económicas a los productores agropecuarios, sino también un riesgo en la salud humana por la generación de residuos potencialmente tóxicos transmitidos a través de la formación de toxinas en productos de origen animal que se obtienen de las explotaciones pecuarias (Medina y Muñoz, 1993)

La formación de micotoxinas en productos alimenticios depende de la cepa específica del hongo y es influenciada por factores ambientales como la temperatura y humedad, por lo tanto la contaminación puede variar según las condiciones geográficas. Por lo general, las micotoxicosis en el campo son el resultado de la interacción de dos o más toxinas, sin embargo una de ellas puede ser la de mayor prevalencia e impacto (González, 1995)

Los factores que propician el crecimiento de mohos en los alimentos son numerosos, entre los principales se encuentran el contenido de agua, la humedad relativa del medio, la temperatura ambiente, la especificidad de determinados substratos, los elementos que componen los alimentos como el contenido en grasas o en nitrógeno y la competencia entre los distintos microorganismos (Derache, 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 considerados de campo que se presentan frecuentemente en el maíz son *Alternaria*, *Cladosporium*, *Helminthosporium*, *Aspergillus* y *Fusarium*, siendo este último considerado tanto de campo como de almacén (González, 1995)

Las micotoxinas son metabolitos secundarios de hongos filamentosos que se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza y contaminan una extensa variedad de alimentos (Coulombe, 1993), pueden causar enfermedad e inclusive la muerte al ingerirlos el hombre y los animales. Estas sustancias permanecen en los alimentos aun después de que el hongo muere, y son relativamente estables bajo condiciones usuales de cocimiento y procesamiento de los alimentos (González, 1995)

Los hongos invaden productos agrícolas y alimentos derivados de ellos, en los cuales secretan sus metabolitos tóxicos. De acuerdo al órgano que atacan las micotoxinas o las manifestaciones patológicas que causa, pueden distinguirse en carcinogénicas, mutagénicas, hepatotóxicas, nefrotóxicas, neurotóxicas y toxicidad dermal (Task, 1989)

En el cuadro No. 1 Se muestran las principales micotoxinas y el efecto que producen en las diferentes especies animales.

Una de las especies de *Fusarium* de distribución mundial y de gran capacidad para crecer en una amplio rango de substratos es *Fusarium moniliforme* (Figura 2), el cual es de gran interés en las investigaciones actuales, por ser considerado productor de toxinas potencialmente carcinogénicas, como las fusarinas y fumonisinas (Norred y Voss, 1994)

Cuadro No. 1 Principales hongos y sus toxinas

Toxina	Hongo	Tipo de Toxicidad	Ataca a:
Aflatoxinas B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂	<i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus parasiticus.</i>	Hepatotóxica (carcinógeno)	Pavos Gallinas Hombre
Ocratoxinas	<i>Aspergillus ochraceus.</i>	Hepatotóxica Abortiva	Pollos Cerdos
Rubratoxina	<i>Penicillium rubrum</i>	Hemorrágica (renal y hepática)	Pavos Hombre
Fusarina F-2	<i>Fusarium roseum</i>	Estrogénica y abortiva Inmunodepresora	Bovinos Cerdos
Fusarina T-2	<i>Fusarium trincitum</i>	Gastrotóxica Neurotóxica Carcinógeno	Hombre
Zearalenona	<i>Fusarium graminearum</i>	Estrogénica Abortiva	Cerdos Bovinos
Fumonisina B-1	<i>Fusarium moniliforme</i>	Carcinógeno Neurotóxica Hepatotóxica	Equinos Cerdos Hombre

Fuente: Porras, 1979.

4.3 Taxonomía y Biología de *Fusarium moniliforme*

Fusarium moniliforme J. Sheldon pertenece a la sección Liseola del género *Fusarium* estado perfecto de *Gibberella fujikuroi*, del cual se han aislado 6 diferentes poblaciones denominadas A a la F; estas poblaciones están ampliamente distribuidas en todo el mundo y son encontradas en los cereales de las regiones templadas, encontrándose principalmente en el maíz la población A y en el sorgo la F (Nelson, 1992) . El cuadro 2 muestra la Taxonomía de *F. moniliforme*.

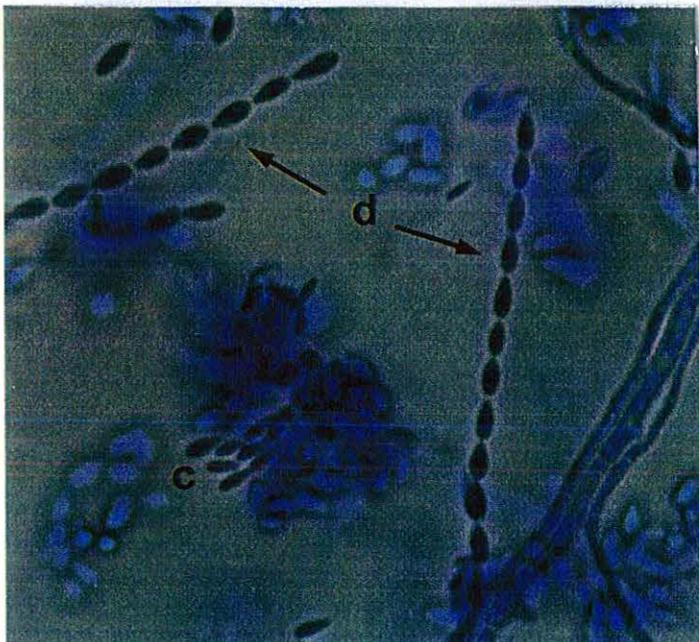
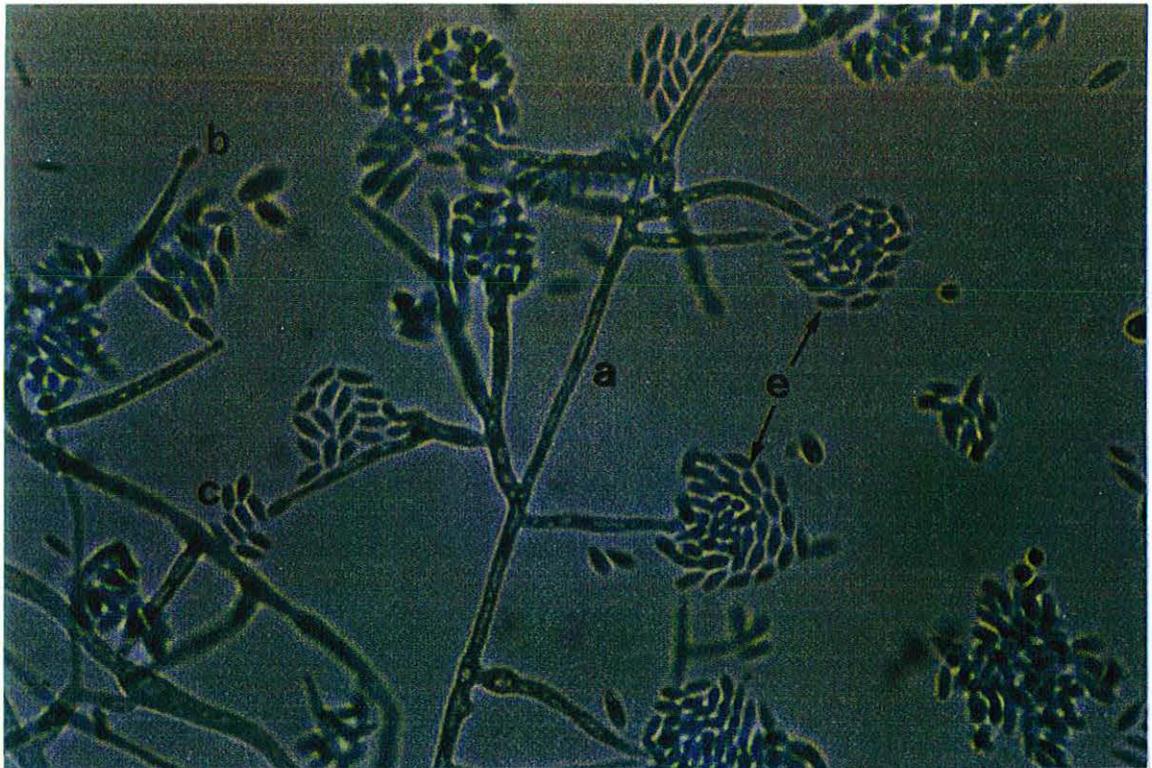


Figura 2. *Fusarium moniliforme*: (a) características del micelio, (b) conidióforos (monofiálides), (c) microconidios individuales, (d) microconidios en cadena, (e) microconidios en falsas cabezas (500 X)

La distribución de *F. moniliforme* es amplia, así como su importancia económica, entre sus hospedantes figuran el maíz, el arroz, la caña de azúcar y el plátano, a los que ocasiona ahogamiento, pudriciones u otras anormalidades (Bullerman y Draughon, 1994) además es común aislarlo de diversos cereales incluyendo el trigo, sorgo y avena. También se presenta con menor frecuencia en otros alimentos como el frijol, cacahuete, pepino, soya y remolacha, también se presenta en productos no alimenticios como el algodón y lino (Leslie *et al.*, 1992)

Cuadro 2. Taxonomía de *Fusarium moniliforme*

Reino :	Fungi
División:	Eumycotina
Clase :	Deuteromycetes (Hongos imperfectos o asexuales)
Orden :	Moniliales
Familia :	Moniliaceae
Género :	Fusarium
Sección :	Liseola
Especie :	Moniliforme

Fuente: Rodríguez, 1994

4.4 Presentación de *F. moniliforme* en el Maíz

El hongo se presenta principalmente en cereales forrajeros en regiones calurosas. Puede existir en el maíz en forma endofítica y permanecer en la planta y en el grano asintomáticamente, esta expresión está relacionada con la naturaleza genética del hongo, cultivo del maíz y condiciones ambientales (Nelson, 1992)

El principal aspecto de la enfermedad en el maíz por *F. moniliforme* es podredumbre de la mazorca, tallo y raíz, pudiendo variar el grado de infección de acuerdo a la vía de entrada del hongo, lo cual puede ocurrir a través de los estilos de la mazorca o por esporas a través del viento, resultando en una infección

temprana de los granos, otra posible vía de entrada es a través de orificios causados por gusanos o insectos en el pericarpio del grano (Bacon y Nelson, 1994)

Además de la infección local, la planta de maíz puede llegar a ser infectada sistémicamente a partir de las semillas contaminadas, por lo que la infección se presenta durante o inmediatamente después de la germinación de la semilla, entrando el hongo en la región de la placa cotiledonaria cuando el tallo brota (germinación) o cuando la plúmula emerge del coléptilo, el hongo crece en el parénquima del tallo y es durante la floración cuando el micelio del hongo se ramifica a toda la planta. Se ha encontrado también en las raíces primarias (Norred y Voss, 1994)

El hongo se localiza en el pedúnculo del grano de maíz como pequeñas hifas, sin embargo en granos asociados con toxicidad animal, usualmente se encuentra como una extensiva masa de hifas esporulando que colonizan la mayor parte interna del grano, incluyendo el gérmen. El hongo usualmente infecta en un período de 2 semanas (Riley *et al.*, 1993a)

El daño de la mazorca y el grano pueden ocurrir a su vez por la infección sistémica de la planta o bien por una combinación de infección local y sistémica (Bacon y Nelson, 1994)

Fusarium moniliforme puede sobrevivir en el suelo como hifas engrosadas dentro de fragmentos de maíz enterrados a 30 cms de profundidad, con una humedad de 5 a 30% y temperatura de 5 a 10° C durante 12 meses (Nelson *et al.*, 1992)

González (1995) menciona que hongos del género *Fusarium* pueden crecer a una humedad relativa de 65 a 85% y a una temperatura de 20 a 25°C.

Los estudios de laboratorio han establecido que el rango óptimo de temperatura para el crecimiento de *F. moniliforme* es de 22.5 a 27.5°C con un máximo de 32 a

35°C y una temperatura mínima de 2.5 a 5°C. Las investigaciones concluidas sobre el crecimiento de este hongo bajo condiciones de almacenamiento son limitadas y éstas no determinan la producción de toxinas en el almacenamiento. Los granos de maíz con contenidos de humedad de 18.4 a 23% fueron óptimos para el crecimiento bajo condiciones de almacenamiento mientras que el crecimiento fue inhibido a 28% de humedad. El crecimiento de este hongo en almacén es probablemente complejo ya que hay una interacción entre la humedad, los niveles de oxígeno (O₂) y bióxido de carbono (CO₂). Por lo tanto este hongo puede crecer bajo condiciones de almacenamiento de 0% de O₂ y 60% de CO₂ a 26°C, sin embargo bajo condiciones similares a 12°C, su crecimiento es reducido, lo cual sugiere que su crecimiento en almacén es anaerobio. Por otra parte el porcentaje de infección de *F. moniliforme* en el grano de maíz se incrementa significativamente ($p < 0.05$) en maíz cosechado con un contenido de humedad promedio inicial de 12.4 % y almacenado por ocho meses (Bacon y Nelson, 1994)

Entre los principales metabolitos producidos por el hongo, se encuentran el ácido giberélico, regulador de crecimiento de la planta; moniliformina, potencialmente tóxico y de alta mortalidad; ácido fusárico y fusarin C (fusarinas) ambas potencialmente mutagénicas y las fumonisinas (Cawood *et al*, 1991), siendo estas últimas las de mayor interés por su impacto a la salud humana y animal.

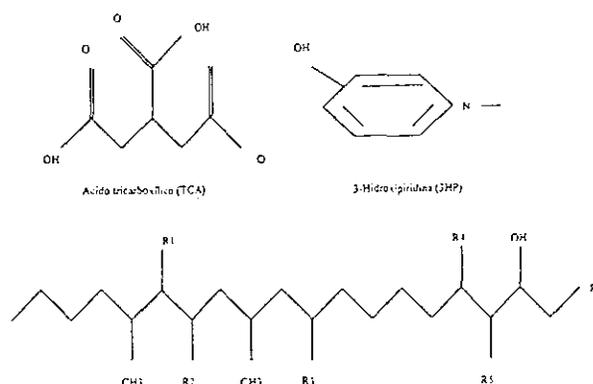
4.5 Características de las fumonisinas

Las fumonisinas fueron caracterizadas químicamente como diésteres de propano-1,2,3-ácido tricarbóxico y/o 2-acetilamino o 2-amino-12,16-dimetil-3,5,10,14,15-pentahidroxicosano (Bezuidenhout y Gelderblom, 1988). En la figura 3 se muestra la estructura química de los diferentes tipos de fumonisinas que se han aislado y su peso molecular (Musser y Plattner, 1997)

Las fumonisinas FB₁, FB₂ y FB₃ se encuentran en el maíz cosechado en proporciones consistentes, presentes en contaminaciones naturales en una relación

de 3 a 1 para la FB₁; FB₂ y de 12 a 1 entre la FB₁ y la FB₃. De éstas, la FB₁ se considera la de mayor toxicidad (Bullerman y Draughon, 1994)

Figura 3. Estructura química de las fumonisinas y su peso molecular (PM)



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

Musser, S.T., y Plattner, R.D., 1997

4.6 Presentación de las Fumonisinias en el Maíz y sus Productos

Desde su descubrimiento, las fumonisinas se han aislado del maíz y de alimentos derivados de éste en países como Estados Unidos, Canadá, China, Egipto, Argentina, Nepal, Perú y Brasil, esta distribución geográfica sugiere que la

contaminación por *F. moniliforme* y sus micotoxinas se encuentran en todo el mundo (Bacon y Nelson, 1994)

En países como Estados Unidos, Canadá, Europa, América del Sur y Africa, donde se han detectado fumonisinas en maíz y en sus productos, los estudios muestran niveles elevados en el grano entero, maíz molido y harina de maíz, mientras que en productos altamente procesados como las hojuelas de maíz y cereales (corn flakes y corn pops) tienden a ser negativos o a tener bajos niveles de fumonisinas. Los totopos también tienden a ser negativos para fumonisinas, en tanto que las tortillas y las palomitas de maíz pueden tener bajos niveles de contaminación, estos datos se deben de interpretar con precaución, ya que representan el producto de escasos estudios (Bullerman y Tsai, 1994)

En 1992, en el estado de Nuevo León, México, se realizó un estudio donde se recolectaron muestras de maíz blanco destinado para consumo humano, los resultados encontrados detectaron alta incidencia de cepas de *F. moniliforme*, con alta capacidad productora de fumonisinas, lo que sugiere potencial contaminación del maíz mexicano y sus productos (Desjardins *et al.*, 1994)

En una localidad del estado de Jalisco, se encontró la presencia de *F. moniliforme* en el 80 % de las muestras de maíz analizadas, con un porcentaje del 93% de cepas aisladas con capacidad productora de fumonisinas (en laboratorio) en un rango de 750-2,280 ppm (Reyes, 1997)

Debido a la presentación generalizada de *F. moniliforme* en el maíz, se realizó un estudio en expendios de tortilla en la Zona Metropolitana de Guadalajara donde se analizaron muestras de masa y tortilla y se procedió a la detección de fumonisinas, todas las muestras resultaron positivas aunque los niveles en promedio no fueron muy altos (masa 1.63 ppm y tortilla 1.13 ppm) los niveles mayores de fumonisinas se encontraron en los sectores Reforma y Libertad (Reyes *et al.*, 1997)

En general las fumonisinas pueden presentarse bajo condiciones de campo propicias para el parasitismo de este hongo, e incrementarse bajo condiciones inapropiadas de almacenamiento. Estos datos sugieren que las fumonisinas se producen tanto en campo como en almacén (Bacon y Nelson, 1994)

4.7 Enfermedades relacionadas con las Fumonisinias

Los síndromes observados varían considerablemente de acuerdo a la especie afectada entre los que se incluyen lesiones en cerebro en equinos, edema pulmonar en cerdos; nefrotoxicidad, hepatotoxicidad y carcinoma hepatocelular en ratas de laboratorio. Existen evidencias que sugieren que *F. moniliforme* y las fumonisinas pueden ser responsables del cáncer esofágico en humanos en ciertas áreas del mundo donde el maíz mohoso se consume frecuentemente. Los estudios están actualmente dirigidos a determinar el riesgo de exposición a las fumonisinas y a establecer acción de regulación para su control (Norred y Voss, 1994)

Existen enfermedades que se han asociado con el consumo de alimentos contaminados con fumonisinas tales como el Síndrome de leucoencefalomalacia en equinos (ELEM), la cual se caracteriza por la presencia de lesiones necróticas licuefactivas en la materia blanca del cerebro (Thiel *et al.*, 1991)

La ELEM es una enfermedad generalmente fatal que se conoce desde principios de siglo, es causada por el consumo de maíz mohoso, los síntomas empiezan con letargia, inapetencia y posteriormente, después de algunos días se presentan convulsiones y la muerte. Otros signos de intoxicación son: elevada cantidad de enzimas séricas que indican daño hepático y alteración de la relación de esfingonina:esfingosina en plasma, lo cual puede ser un signo temprano de toxicidad por fumonisinas. El examen histopatológico de animales intoxicados

revela con frecuencia lesiones hepáticas, renales y cerebrales (Norred y Voss, 1994)

Se han reportado estudios donde altas dosis de las toxinas inducen hepatotoxicidad fatal asociada a lesiones cerebrales leves, mientras que, bajas dosis causan hepatotoxicidad moderada y severas lesiones cerebrales, estas evidencias sugieren que los caballos que consumen alimento contaminado con niveles bajos de fumonisinas B₁, tales como 8 ppm tienen el riesgo de desarrollar el Síndrome de leucoencefalomalacia equina (Thiel *et al.*, 1991)

Puesto que aún no existen normas oficiales disponibles con respecto a los niveles de riesgo de las fumonisinas en alimentos, el Comité de Micotoxinas de la Asociación Americana de Laboratorios de Diagnóstico Veterinario recomiendan que el alimento para caballos no exceda de 5 ppm.

En 1989-1990, se reportó un brote de edema pulmonar en cerdos (PPE) en diferentes partes de los Estados Unidos de Norteamérica, y las evidencias indicaron que la fumonisina B₁ era la responsable de esta enfermedad (Osweiller *et al.*, 1992)

El PPE es una enfermedad mortal que se caracteriza porque en la necropsia los cerdos presentan edema pulmonar severo e hidrotórax (acumulación de líquido seroso no inflamatorio en la cavidad pleural). En 1989, en Georgia y algunos estados del Oeste de Estados Unidos, ocurrió un brote de esta enfermedad y después de analizar las posibles causas se asoció esta enfermedad con el consumo de maíz contaminado con *F. moniliforme* (Norred y Voss, 1994)

La implicación de las toxinas de *F. moniliforme* en brotes de aves de corral ha sido un tema controversial. La presencia de este hongo en maíz se ha creído que es una

condición no asociada con toxicidad en aves de corral. Sin embargo en estudios en los cuales se alimentó con maíz mohoso a aves, indicaron que pueden producir efectos adversos, tales como depresión de la ganancia de peso y anomalías en el esqueleto. De las aves estudiadas, los patos fueron más sensibles que los pollos y los pavos, pero las tres especies sufrieron daños en el corazón e hígado además de necrosis, en pollos también se reportó inmunosupresión (Norred y Voss, 1994)

En las primeras investigaciones se estableció que el hígado era el principal órgano blanco de *F. moniliforme* en muchas especies incluyendo las ratas, estudios posteriores confirmaron que este hongo es también hepatotóxico en los ratones (Norred y Voss, 1994)

El potencial cancerígeno de la fumonisina B₁ ha sido demostrado en ratas de laboratorio. En el hombre, no se ha podido determinar de forma concluyente que las fumonisinas son responsables de la alta incidencia de cáncer esofágico en algunas áreas del Sur de Africa (Transkei), pero todo hace pensar que su presencia puede ser particularmente responsable (Riley *et al.*, 1993a)

Estudios epidemiológicos indican que el grado de contaminación de *Fusarium moniliforme* en el maíz en algunas regiones de China, está estrechamente relacionado con la alta incidencia de cáncer esofágico (Chu y Li, 1994)

En algunas áreas del mundo, particularmente en Irán y Norte de China, donde el alcohol y el tabaco no se consumen en exceso, parecen jugar un papel más significativo diversos factores ambientales y déficit dietéticos. En estas áreas se han implicado:

- La contaminación microbiana de la comida y del agua
- Bajo contenido en molibdeno del suelo y de los vegetales cultivados en el mismo

- Dieta rica en maíz y trigo y pobre en verduras, frutas y proteínas animales, lo que predispone al déficit de zinc y
- El consumo de vegetales en vinagre, los cuales se contaminan profusamente con ciertos hongos durante el proceso de preparación.

Estos factores combinados dan lugar a la síntesis de cantidades mayores de nitrosaminas o sus precursores (sustancias conocidas como inductores de tumores en muchos órganos "diana") (Cotran, 1990). Investigaciones realizadas en China sugieren que *Fusarium moniliforme* es capaz de formar nitrosaminas tales como la N-metilbenzilitrosamina, la cual puede inducir cáncer esofágico en animales de laboratorio (CHU y Li, 1994)

Estudios epidemiológicos correlacionan altos niveles de fumonisinas en maíz con la alta incidencia de cáncer esofágico en humanos, considerándose que la incidencia "normal" es de 5 casos por cada 100,000 habitantes, en Transkei Sudáfrica, región donde el alimento básico de la población es el maíz, incluyendo una bebida fermentada no alcohólica, el rango de cáncer esofágico es de 50 – 200 casos y los niveles de fumonisinas se encuentran entre 10.2 ppm en maíz sano y de 140.5 ppm en maíz mohoso (Yoshizawa *et al.*, 1994; Chu y Li, 1994 y Sydenham *et al.*, 1990b)

Mientras que otros factores como el tabaquismo, el consumo de alcohol y otros componentes ambientales y dietéticos, podrían estar involucrados en la etiología del cáncer esofágico humano, estudios recientes han dado apoyo a la hipótesis de que las fumonisinas pueden ser al menos en parte responsables (Norred y Voss, 1994)

Se realizó el cálculo de la ingestión diaria de fumonisinas en humanos con base en las investigaciones efectuadas en ratas y equinos en Sudáfrica, encontrándose un consumo de 0.014 ppm a partir de maíz sano y de 0.44 ppm en maíz mohoso,

con base a la ingestión diaria de 460 g de maíz/persona de 70 kg, lo que se considera de alto riesgo de exposición (Thiel *et al.*, 1992)

En otras investigaciones realizadas en Transkei, Sudáfrica por Norred y Voss en 1994, se encontró que el maíz proveniente de dicha área contenía altos niveles de fumonisina B₁ (44 ppm), valores mayores a los detectados en el maíz comercial (<10 ppm). Otros estudios compararon la contaminación de algunas especies de *Fusarium* y los niveles de fumonisinas en muestras de maíz mohoso y en maíz aparentemente sano, tanto en áreas de alta incidencia como en áreas de baja incidencia de cáncer esofágico, encontrándose que en áreas de alta incidencia de cáncer, *F. moniliforme* fue el hongo predominante, además tanto el maíz mohoso como el aparentemente sano tuvieron altos niveles de fumonisinas. Además Norred y Voss (1994) hicieron un estudio retrospectivo en muestras de maíz recolectadas durante 1976 a 1989 en Transkei, y encontraron niveles de fumonisinas mayores a los detectados en las muestras de maíz de áreas de baja incidencia de CEH. Ambos estudios implican a las fumonisinas como agentes responsables del cáncer esofágico humano sin embargo son necesarios estudios epidemiológicos.

El cáncer esofágico también se presenta con mayor incidencia que la normal en algunas regiones de China, Irán y Charleston en Carolina del Sur E.U.A, aunque la implicación de *F. moniliforme* no ha sido bien establecida (Norred y Voss, 1994)

Aunque el carcinoma epidermoide del esófago tiene una distribución mundial, su incidencia varía considerablemente, no sólo de unos países a otros sino ocasionalmente también dentro del mismo país. Así se han encontrado áreas con una incidencia particularmente alta en el norte de China, Irán, URSS y Africa del Sur. En Estados Unidos, un país con una baja incidencia de cáncer de esófago, éste afecta a 2.8 individuos por cada 100,000 habitantes al año y es

predominantemente una enfermedad de varones adultos en una proporción de 4:1 en relación a mujeres (Cotran *et al.*, 1990)

En Estados Unidos, los carcinomas de esófago representan aproximadamente el 10% de todos los tipos de cáncer del tubo digestivo. Son asintomáticos durante una gran parte de su desarrollo y por tanto, con frecuencia se descubren demasiado tarde para permitir su curación. En Estados Unidos la mayoría ocurre en mayores de 50 años de edad, raras veces se afectan los niños (Cotran *et al.*, 1990)

Los carcinomas constituyen la gran mayoría de los tumores esofágicos malignos. Se clasifican según el tipo celular; los carcinomas epidermoides constituyen el 80 a 85% de los cánceres de esófago, los adenocarcinomas representan el 5 a 10% y el resto corresponde a tumores indiferenciados u otros más raros.

Se piensa que el carcinoma epidermoide del esófago tiene un origen multifactorial, siendo algunos factores altamente significativos. Son importantes en su patogenia: 1) El consumo de alimentos contaminados con ciertos hongos, por ejemplo *Aspergillus* y *Fusarium*, y las dietas ricas en nitritos y nitrosaminas; 2) El déficit nutricional crónico de ciertas vitaminas, por ejemplo, las vitaminas A, C y miembros del complejo B; 3) La presencia de esofagitis y estasis esofágico; 4) El abuso crónico de alcohol y de tabaco y 5) La predisposición racial o genética (Cotran *et al.*, 1990)

4.8 Mecanismo de Toxicidad de las Fumonisinias

Hasta la fecha se desconoce el mecanismo por el cual las fumonisinias inducen los síndromes de leucoencefalomalacia equina, edema pulmonar porcino y nefrotoxicidad/hepatotoxicidad y carcinoma hepatocelular en ratas. Considerables trabajos se han desarrollado para tratar de entender el grado de responsabilidad de las fumonisinias 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)

Alteración del metabolismo de esfingolípidos

a) Evidencias *In vitro*

En animales el término "biosíntesis de esfingolípidos de *novo*" 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-acilesfingosina) (Figura 4) (Riley *et al.*, 1994a)

En la ruta biosintética de *novo* la enzima esfingonina N-aciltransferasa (ceramida sintetasa) es inhibida por las fumonisinas y las toxinas AAL (toxinas del hongo *Alternaria alternata*) (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 dihidroceramida. La misma enzima tiene la habilidad para reaccilar esfingosina, la cual es generada por la hidrólisis de complejos esfingolípidos (Riley *et al.*, 1994a)

La esfingosina es un aminoalcohol de larga cadena insaturada y es la base esfingoide más frecuente de los esfingolípidos de mamíferos. La esfingonina es similar a la esfingosina excepto porque en ésta no se presenta doble ligadura en el enlace 4 (base esfingoide saturada) (Riley *et al.*, 1994a)

Diversas investigaciones han demostrado que el metabolismo normal de esfingolípidos se ve alterado por las fumonisinas de la siguiente manera:

Inhibición de la biosíntesis de *ново* de esfingosina, b) Acumulación de esfingonina libre, c) Depleción del complejo esfingolípido, d) Incremento de los productos de degradación por el catabolismo de las bases esfingoides, incremento de productos lipídicos derivados del aumento de productos de degradación de las bases esfingoides y e) Incremento de esfingosina libre (Figura 5) (Wang *et al.*, 1991; Merrill *et al.*, 1993; Yoo *et al.*, 1992)

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 *ново* de esfingolípidos, ambos grupos esfingoides se encuentran siempre en concentraciones bajas en células sanas. Por lo que elevadas concentraciones pueden afectar el crecimiento celular (Merril Jr., 1991; Merrill *et al.*, 1993), lo que ha sido asociado con defectos genéticos en la biosíntesis de esfingolípidos.

b) Evidencias *In vivo*

Debido a que en cultivos celulares la relación de esfingosina libre con esfingonina libre demostró ser un marcador dimensional de la alteración en el metabolismo de esfingolípidos por las fumonisinas, se pensó que la alteración en el metabolismo de esfingolípidos en el hígado (u otros órganos) de animales que consumen fumonisinas o alimentos contaminados con la micotoxina, pudiera ser detectada por el incremento de la relación esfingonina:esfingosina libres en el suero. Esta hipótesis fue probada en una serie de estudios utilizando suero y tejidos obtenidos de ponies, cerdos, pollos y ratas. Wang *et al.*, en 1992 realizó un estudio con muestras de suero de ponies alimentados con material que contenía FB₁, observándose incremento en la relación de los grupos esfingoides libres. El complejo esfingolípido disminuyó en suero, observándose decremento en dicha relación al retirar el consumo de alimento contaminado.

METABOLISMO NORMAL DE ESFINGOLIPIDOS

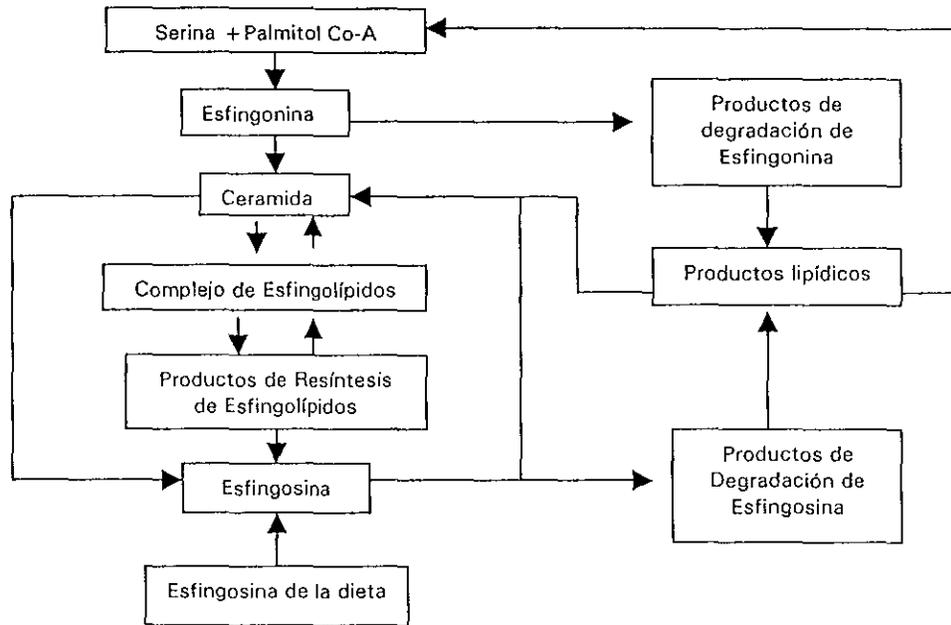


Figura 4. Metabolismo de esfingolípidos en células sanas de mamíferos (no se presentan productos intermedios para simplificar la presentación) (Riley et al, 1994)

ALTERACION DEL METABOLISMO DE ESFINGOLIPIDOS

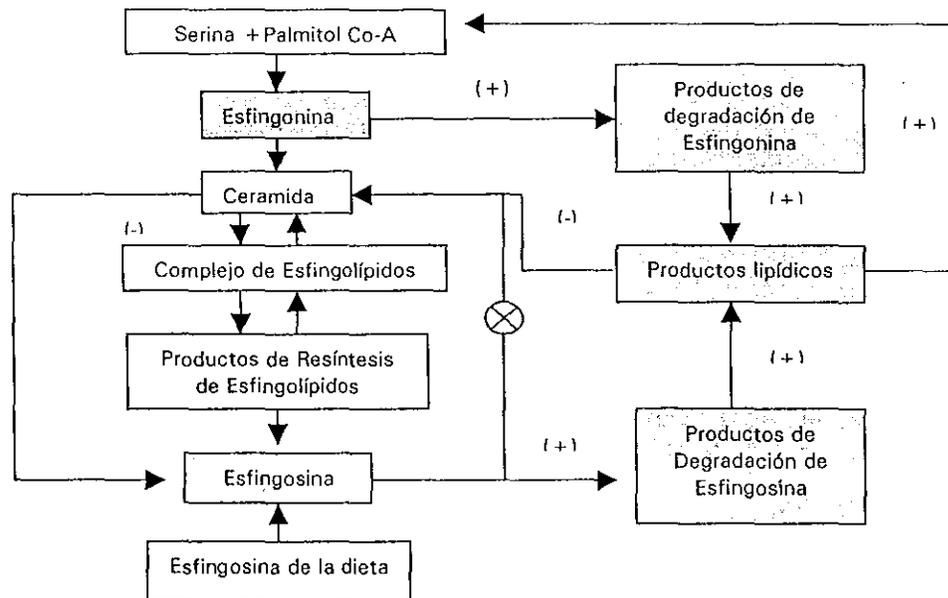


Figura 5. Alteración del metabolismo de esfingolípidos en células de mamíferos expuestas a fumonisinas. El blanco bioquímico primario de inhibición de la esfingosina (esfingosina) N- aciltransferasa, se indica con "X". El resultado de la alteración en el metabolismo de esfingolípidos se aprecia por el aumento (+) o decremento (-) y los cuadros sombreados.

Basados en estudios realizados en cerdos, se hicieron las siguientes conclusiones: a) la alteración de la biosíntesis de esfingolípidos en hígado, pulmones y riñones ocurre a bajas concentraciones de fumonisinas; b) la elevación de esfingonina libre, de la relación de los grupos esfingoides y la deplesi3n del complejo esfingolípido ocurre antes de que se presenten cambios bioquímicos en suero que indican que el daño tisular es elevado y c) la FB₁ pura y dietas de maíz contaminadas naturalmente con fumonisinas, ambas alteran biosíntesis de esfingolípidos principalmente en hígado, pulmones y riñones (Haschek *et al.*, 1993)

La alteración en la regulaci3n del complejo esfingolípido, como la esfingomielina resulta en la formaci3n de mensajeros secundarios de lípidos, estos mensajeros secundarios y los sistemas efectores (ejemplo ceramida y productos de degradaci3n de esfingolípidos) han demostrado o hipotetizado que actúan como señales intracelulares para poner en marcha o detener procesos dentro de la célula que incluyen la expresi3n de genes, activaci3n o inactivaci3n de proteínas específicas como la proteína C quinasa y la fosfatasa ácido fosfatídica, apoptosis, la regulaci3n de factores de crecimiento y otros sistemas de señales intracelulares. Todos estos procesos están íntimamente conectados a los procesos de crecimiento, proliferaci3n y diferenciaci3n celular (Riley *et al.*, 1994a)

4.9 Posibles Mecanismos de las Fumonisin3s como Inductores de Cáncer

Existen diversos mecanismos que pudieran explicar el efecto cancerígen0 de las fumonisinas. La carcinogenicidad frecuentemente se define como la presentaci3n de tres fases distintivas: iniciaci3n (cambios genéticos), promoci3n (expansi3n clonal de células iniciadoras) y progresi3n (conversi3n en células malignas) (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 como cancerígenos pudiendo ocasionar el desarrollo de cáncer en los diferentes estados.

Las fumonisinas se consideran agentes no-genotóxicos (Gelderblom *et al.*, 1991) sugiriéndose que el mecanismo de incremento de riesgo de cáncer ocurre por el 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 entender la carcinogenicidad de las fumonisinas.

4.10 Efecto de los Procesos sobre la Estabilidad de las Fumonisinas

Existe limitada información respecto al efecto que tienen los procesos sobre la estabilidad de las fumonisinas. Hasta ahora la FB₁ ha sido considerada como un compuesto estable al calor. Alberts *et al.* (1990) reportó que material cultivado con *F. moniliforme* sometido a ebullición durante 30 minutos seguido de deshidratación a 60°C por 24 horas no presentó cambios o pérdida de los niveles de FB₁.

Recientemente Scott y Lawrence (1992) demostraron que sometiendo el maíz a 190°C, el 40% de la FB₁ y la FB₂ pudieron ser recuperadas mientras que después de 220°C esto no sucedió.

El estudio de los efectos que tienen los procesos sobre las fumonisinas es complicado por la escasez de métodos analíticos adecuados. Además estos

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-alkalino para la elaboración de la tortilla, remueve la FB₁, pero forma productos hidrolizados que permanecen tóxicos (Hendrich *et al.*, 1993), 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.

4.11 Proceso de Nixtamalización y Elaboración de la Tortilla

La nixtamalización es un procedimiento de antigüedad milenaria que logra, a través de la cocción del maíz en agua adicionada con cal, la gelificación de los almidones y otorga a la tortilla su flexibilidad y delicado sabor. El tratamiento del maíz con hidróxido de calcio y calor, es un proceso fundamental para mejorar el valor nutritivo del grano. El propósito del proceso es eliminar el pericarpio, capa exterior del grano que, no sólo es indigesta, sino interfiere en la digestión de otros alimentos consumidos al mismo tiempo (Pérez, 1996)

Los cambios químicos y estructurales del grano durante el proceso afectan las propiedades funcionales (textura, color, frescura, sabor y vida de anaquel) del producto final nixtamalizado (Gómez *et al.*, 1989)

Algunos expertos sugieren que la temperatura mínima para efectuar la nixtamalización sea de 70°C ya que a menor temperatura el grano no se hidrata lo suficiente, quedando duro dando una masa granulosa sin la consistencia adecuada. Asimismo, la temperatura máxima sugerida ha sido de 90°C, pues a mayor temperatura el almidón del grano se gelatiniza, quedando demasiado suave,

obteniéndose una masa flácida y chiclosa que no permite la elaboración de la tortilla (Pérez, 1996)

El efecto más evidente de la nixtamalización sobre la estructura del grano es la pérdida y remoción de la mayor parte del pericarpio. El álcali disuelve fracciones de las paredes celulares facilitando la separación del pericarpio del grano. El pericarpio es el componente principal (3-9%) de la materia seca perdida en la nixtamalización. Algunos autores indican que la degradación de la cutícula y otras capas del pericarpio ocurre aparentemente durante el proceso de cocción y reposo del nixtamal (Gómez *et al.*, 1989)

Durante la nixtamalización ocurren cambios en la composición del maíz, entre ellos se pueden citar los siguientes:

- a) Incremento en el contenido de minerales debido a la introducción de iones calcio
- b) El contenido de grasa se reduce debido básicamente a la hidrólisis alcalina de los ácidos grasos. El ácido linoleico es el que se ve principalmente afectado.
- c) La cantidad de fibra cruda también disminuye, ya que durante la nixtamalización se separa el pericarpio del grano y por el lavado a que es expuesto el nixtamal, se elimina parte de este pericarpio.
- d) El contenido de proteínas disminuye. Esto se debe a la solubilidad e hidrólisis de algunas fracciones proteínicas, principalmente gluteninas, que se pierden en el nejayote (agua de cocimiento producto de la nixtamalización). Sin embargo la calidad de las proteínas que permanece en el nixtamal mejora notablemente, debido a la mayor disponibilidad de aminoácidos en las fracciones peptídicas después de la hidrólisis. Únicamente 10% de proteína se pierde durante el proceso de elaboración de tortilla.
- e) Los hidratos de carbono del endospermo del maíz también sufren modificaciones. Ocurre una gelatinización parcial de los gránulos de almidón lo

que ocasiona el rompimiento de los gránulos y la liberación de las cadenas de almidón (amilosa y amilopectina). Las cadenas así liberadas son expuestas a la acción del medio alcalino, lo que provoca una hidrólisis cuyo nivel depende de qué tan severo sea el tratamiento en cuanto a la temperatura, tiempo de exposición al calor y concentración de cal.

f) Sobre las vitaminas hidrosolubles tiene una acción destructora.

A pesar de existir pérdidas de algunos nutrimentos, el maíz nixtamalizado presenta un mejor valor nutrimental que el maíz crudo (Pérez, 1996)

Después del cocimiento del maíz para convertirlo en nixtamal, se le da un tiempo de reposo (o descanso) lo cual permite la difusión de la humedad dentro del grano para producir granos de nixtamal hidratados homogéneamente, posteriormente el nixtamal es lavado, éste tiene la función de eliminar el pericarpio ya suavizado, el exceso de cal y el agua de cocimiento. El lavado debe ser lo más uniforme posible y llevar el nixtamal a una temperatura aproximada de menos de 35°C con un mínimo uso de agua. Como consecuencia del lavado el pH disminuye, se pierde materia seca y puede mejorarse el color del producto (Pérez, 1996)

Cuando el nixtamal es molido y convertido en masa, el grano es físicamente cortado (molido) por la acción mecánica de las piedras del molino. Se adiciona agua a la masa para reducir el calor de la operación de molienda y para obtener una textura óptima de la masa. Los gránulos de almidón y las proteínas son hidratadas ligeramente por el agua añadida durante la molienda. La molienda también ocasiona que los gránulos de almidón estén sujetos a calor adicional por fricción, ocasionando gelatinización del almidón y daño en el gránulo. La degradación y/o debilitamiento de la pared celular ocasionada por el cocimiento alcalino y excesivo facilitan la molienda lo que da como resultado una distribución uniforme de tamaño de partícula en la masa (Gómez *et al.*, 1989)

La masa está compuesta de varias fracciones grandes (pericarpio, gérmen y piezas de endospermo periféricas), piezas de tamaño intermedio (endospermo córneo) y de fracciones finas (gránulos libres de almidón y partículas solubles). La molienda de maíz crudo o cocinado en ausencia de álcali o con pequeños o excesivos tiempos de cocción, no producen la destrucción apropiada de la estructura del grano que es necesaria para la textura apropiada de la masa (Gómez *et al.*, 1989)

La masa contiene 52 a 54% de humedad, 12 a 15% de endospermo y gérmen, 19 a 31% de gránulos libres de almidón y fragmentos de paredes celulares y 3 a 4% de sólidos dispersos y lípidos libres. Cuando se adiciona agua durante la molienda esto ayuda a la distribución, solubilización y adhesión de los gránulos de almidón, proteína, paredes celulares y lípidos. Algunos de los cohesivos de la masa pueden ser la amilosa y la amilopectina que se han lixiviado de la separación física de los gránulos de almidón gelatinizados (Gómez *et al.*, 1989)

Cuando la masa es convertida a tortilla, los cambios en la microestructura se deben primeramente al calor intenso ($> 240^{\circ}\text{C}$) (Gómez *et al.*, 1989). El horneado de la tortilla tiene las funciones de cocer y secar parcialmente la masa, impartir una apariencia ligeramente tostada y desarrollar la textura final de la tortilla (Pérez, 1996)

La tortilla es expuesta al calor por ambos lados y el almidón es gelatinizado. Sin embargo, debido a la poca disponibilidad del agua y al poco tiempo, el almidón sólo es parcialmente gelatinizado en la tortilla, además algunos investigadores han reportado que el hidróxido de calcio es absorbido por los gránulos de almidón durante el cocimiento de la tortilla (Gómez *et al.*, 1989)

4.11.1 Efecto de la nixtamalización sobre las fumonisinas

La nixtamalización mejora el valor nutritivo del maíz, sin embargo en estudios recientes se han detectado hidrolizados de fumonisinas que pueden interactuar con los nutrientes para aumentar el efecto carcinogénico de *F. moniliforme* y *F. proliferatum* en el maíz (Hendrich *et al.*, 1993)

El alto pH del sistema alcalino parece promover la ionización de los grupos hidroxilo en el almidón, produciendo ligaduras del almidón al calcio (Dombrink-Kurtzman & Dvorak, 1999). Este tratamiento puede hidrolizar a la fumonisinina B₁ (FB₁) original a hidrolizado de fumonisinina B₁ (HFB₁) o aminopentol (AP₁)

La reacción involucra la pérdida de dos moléculas de propano-1,2,3-ácido tricarbóxico (ácido tricarbónico) lo que ocasiona la hidrólisis de FB₁ a aminopentol (AP₁, HFB₁) (Sydenham *et al.*, 1992). Shephard *et al.*, (1994) y Sydenham *et al.*, (1992) reportaron que el tratamiento con hidróxido de calcio en maíz molido y entero conteniendo FB₁, a temperatura ambiente durante 24 horas ocasionó una pérdida considerable de FB₁ y la aparición de AP₁ en la fracción acuosa del calcio, además detectaron FB₁ parcialmente hidrolizada, una mezcla de monoésteres.

El AP₁ y el correspondiente producto hidrolizado de FB₂ (AP₂) fueron más tóxicos que las fumonisinas correspondientes FB₁ y FB₂ en algunos cultivos celulares. Sin embargo el AP₁ no fue iniciador de cáncer en el hígado de ratas, aunque la FB₁, FB₂ y la FB₃ lo fueron (Gelderblom *et al.*, 1993), la escasa absorción de los compuestos pudo ser la posible explicación.

4.12 Metodología Analítica para la detección de Fumonisinas

En la actualidad se cuentan con diferentes procedimientos analíticos para la detección de fumonisinas y sus hidrolizados, éstos citan dos métodos de extracción mediante solventes polares (metanol/agua o acetonitrilo/agua), seguido de limpieza mediante columna de intercambio iónico (SAX) o vía columna C₁₈ de fase de reversa (Sep-Pak Waters Associates, Milford, MA). El método de columna C₁₈ es más rápido que el de columna de intercambio iónico, sin embargo este último produce fracciones más limpias y por lo tanto tiene límites de detección más bajos. Además la recuperación de fumonisinas es mayor del 80% (Stack y Eppley, 1992)

Para la detección de estas toxinas mediante cromatografía de líquidos o cromatografía de capa fina se requiere derivatización con agentes fluorescentes como Fluorescamina, OPA (o-phthaldialdehído) o el NAD (2,3 dicarboxialdehído naftaleno), mientras que para cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM) se requiere la hidrólisis de bases, a fin de remover los grupos de ácidos tricarbóxicos y la derivatización de grupos amino para aumentar la volatilización. La ventaja del método de CG-MS, es que combina la cuantificación de la fumonisina con la confirmación estructural, desafortunadamente se requiere de tiempo considerable para su análisis y de equipo costoso (Riley *et al.*, 1993a)

El método más usual para la detección de fumonisinas en alimentos es mediante cromatografía de líquidos, el cual utiliza o-phthaldialdehído como agente derivatizante y puede separar las FB₁, FB₂ y FB₃ en 16 minutos mediante un sistema de solventes y permite un límite de detección de 50 ppb (Rice y Frank, 1994; Sydenham *et al.*, 1992)

La cromatografía de capa fina tiende a separar e identificar eventualmente las fumonisinas pero es de escasa sensibilidad, siendo el límite de detección de 50 ppm (Rothinghaus *et al.*, 1992)

Recientes descubrimientos sobre la tecnología de anticuerpos monoclonales y policlonales, particularmente en el terreno de las micotoxinas han hecho posible detecciones rápidas y confiables a bajo costo (Azcona *et al.*, 1992)

Entre los métodos que utilizan anticuerpos se incluyen las técnicas inmunoenzimáticas (Agri-Screen y Veratox de Noegen), las cuales se basan en la técnica de ensayo inmunoabsorbente mediante enzima ligada (ELISA) y el método de Cromatografía por inmunoafinidad con detección fluorométrica (Ware *et al.*, 1994)

La técnica de ELISA consiste en poner en contacto el anticuerpo específico de la toxina en la superficie de una microcelda con la toxina extractada de la muestra, se mezcla con una solución de conjugado (toxina marcada químicamente o conjugada con una enzima), donde compiten por los sitios de acoplamiento y después de un período de incubación, la toxina y el conjugado libres son lavados para posteriormente agregar un sustrato y obtener el cambio de color por efecto del conjugado, a mayor conjugado ligado a anticuerpos de la toxina mayor coloración (Tejeda *et al.*, 1994)

Stack y Eppley en 1992 analizaron la presencia de fumonisinas en tortilla utilizando columnas para extracción y limpieza C₁₈ fase de reversa y derivatización con o-phthaldialdehído y 2-mercaptoetanol, obteniendo un porcentaje de recuperación de 86.5% para la FB₁ y de 82.6% para el HFB₁.

El método de Cromatografía por inmunoafinidad con detección fluorométrica, después de una etapa de extracción de las fumonisinas con metanol:agua, utiliza columnas de Fumonitest (VICAM, 1997) las cuales contienen anticuerpos específicos para dichas micotoxinas; con este método fluorométrico es necesario derivatizar con o-phthaldialdehído y 2-mercaptoetanol y se obtiene un porcentaje de recuperación > 80% (Scott y Trucksess, 1997)

V OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Valorar el efecto de las condiciones ambientales y del proceso de nixtamalización y elaboración de la tortilla sobre los niveles de contaminación por fumonisinas en el maíz y sus productos.

5.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Estimar la influencia de las condiciones ambientales (temperatura y humedad relativa) presentes en el almacén de los molinos de nixtamal localizados en el sector Reforma de la ciudad de Guadalajara sobre los niveles de fumonisinas en el maíz.
2. Determinar el efecto de la nixtamalización sobre los niveles de fumonisinas, presentes en el nixtamal, masa y tortilla.
3. Evaluar el efecto térmico del proceso de elaboración de la tortilla sobre los niveles de fumonisinas, presentes en el producto terminado.

VI MATERIAL Y METODO

Esta investigación es un estudio de tipo observacional descriptivo y se realizó de mayo a julio de 1998 en el sector Reforma de la ciudad de Guadalajara, considerado en un estudio previo uno de los sectores con mayor contaminación de fumonisinas en masa y tortillas (Reyes *et al.*, 1997)

6.1 Localización del Area de Estudio

El sector Reforma se encuentra ubicado al oriente de la ciudad de Guadalajara, y corresponde a la anterior división de la ciudad (sectores: Hidalgo, Libertad, Juárez y Reforma), este sector colinda al norte con el sector Libertad (Calle Gigantes), al sur y al este con el Municipio de Tlaquepaque (calles Niños Héroe y República del Salvador), y al oeste con los sectores Hidalgo (Calzada independencia) y Juárez (Calzada Gobernador Luis G. Curiel) (Figura 6)

6.2 Muestreo

De acuerdo a informes proporcionados por la Cámara Nacional de la Industria de Producción de la Masa y la Tortilla (CNIMT), Delegación Regional en el Estado de Jalisco el número total de molinos de nixtamal en el sector Reforma (Población en estudio) que cuentan también con el proceso de elaboración de la tortilla (comercialización) es de 36.

Tomando en cuenta el número total de molinos del sector Reforma que son 36, y de acuerdo a los criterios de inclusión y de exclusión que posteriormente se detallan en este capítulo, se tomó por conveniencia el 10% de la población para determinar el tamaño de muestra que fue de 4 molinos, éstos se escogieron al azar con base en la tabla de números aleatorios (Daniel, 1996) y se hizo una investigación puntual. En cada molino se tomaron muestras de maíz, nixtamal, masa y tortilla con tres repeticiones cada una.

El estudio se llevó a cabo en tres fases: Fase de Campo, Fase de Laboratorio y Fase de Gabinete (Figura 7)

6.3 Fase de Campo

En esta primera fase se visitaron los molinos de nixtamal para recoger muestras de maíz, nixtamal, masa y tortilla, además se registraron algunos parámetros (variables independientes) (Cuadro 3) durante el proceso de nixtamalización y elaboración de la tortilla (Figura 8), con la finalidad de valorar su efecto sobre los niveles de fumonisinas en los diferentes productos.

Cuadro 3. Variables independientes, en el proceso de nixtamalización y elaboración de la tortilla.

MAIZ	NIXTAMAL	MASA	TORTILLA
Tiempo de almacenamiento	Tiempo de cocción y tiempo de reposo		Tiempo de cocción
Temperatura ambiental	Temperatura de cocción	Temperatura	Temperatura de cocción
Humedad Relativa			

Figura 7. Recolección, procesamiento y análisis de muestras

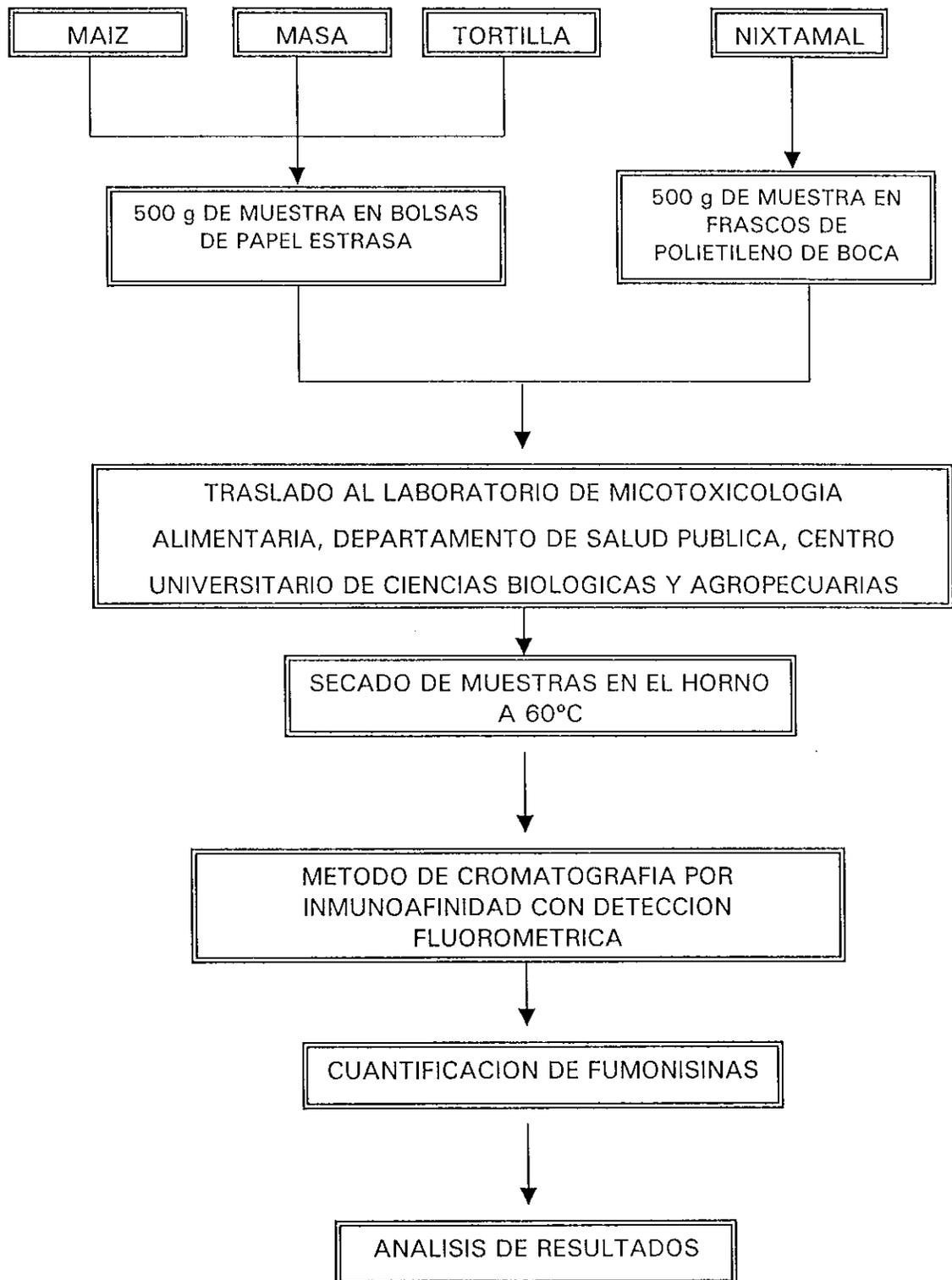
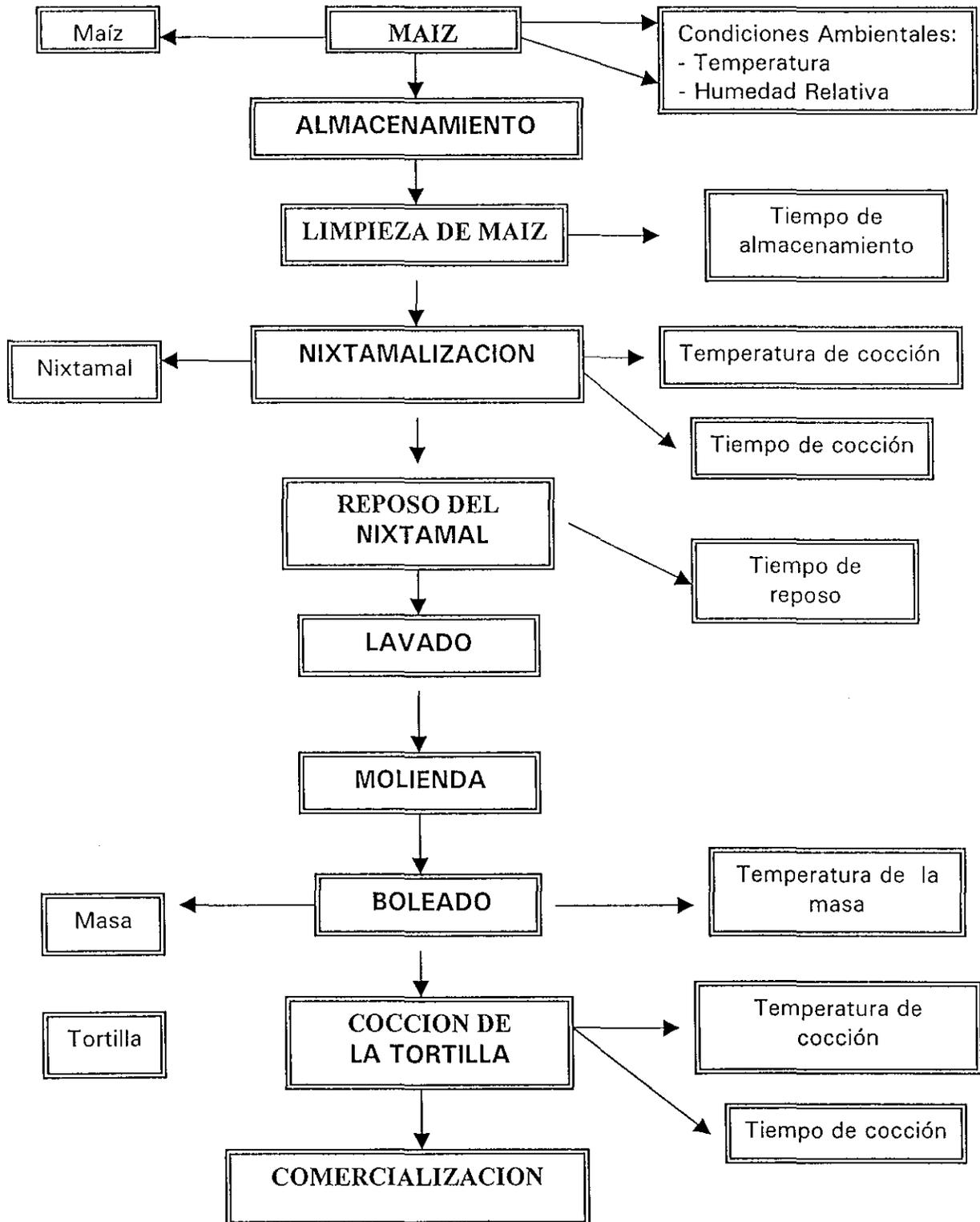


Figura 8
Flujograma del proceso de nixtamalización y elaboración de la tortilla



6.4 Fase de Laboratorio

Las muestras de maíz, nixtamal, masa y tortillas que se recogieron durante la fase de campo se trasladaron al Laboratorio de Micotoxicología Alimentaria del Departamento de Salud Pública del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA), donde se realizó la determinación del nivel de fumonisinas mediante el método de cromatografía por inmunoafinidad en detección fluorométrica con límite de detección de 0.1 ppm (Figura 9) (Ware *et al.*, 1994)

6.5 Materiales y Reactivos

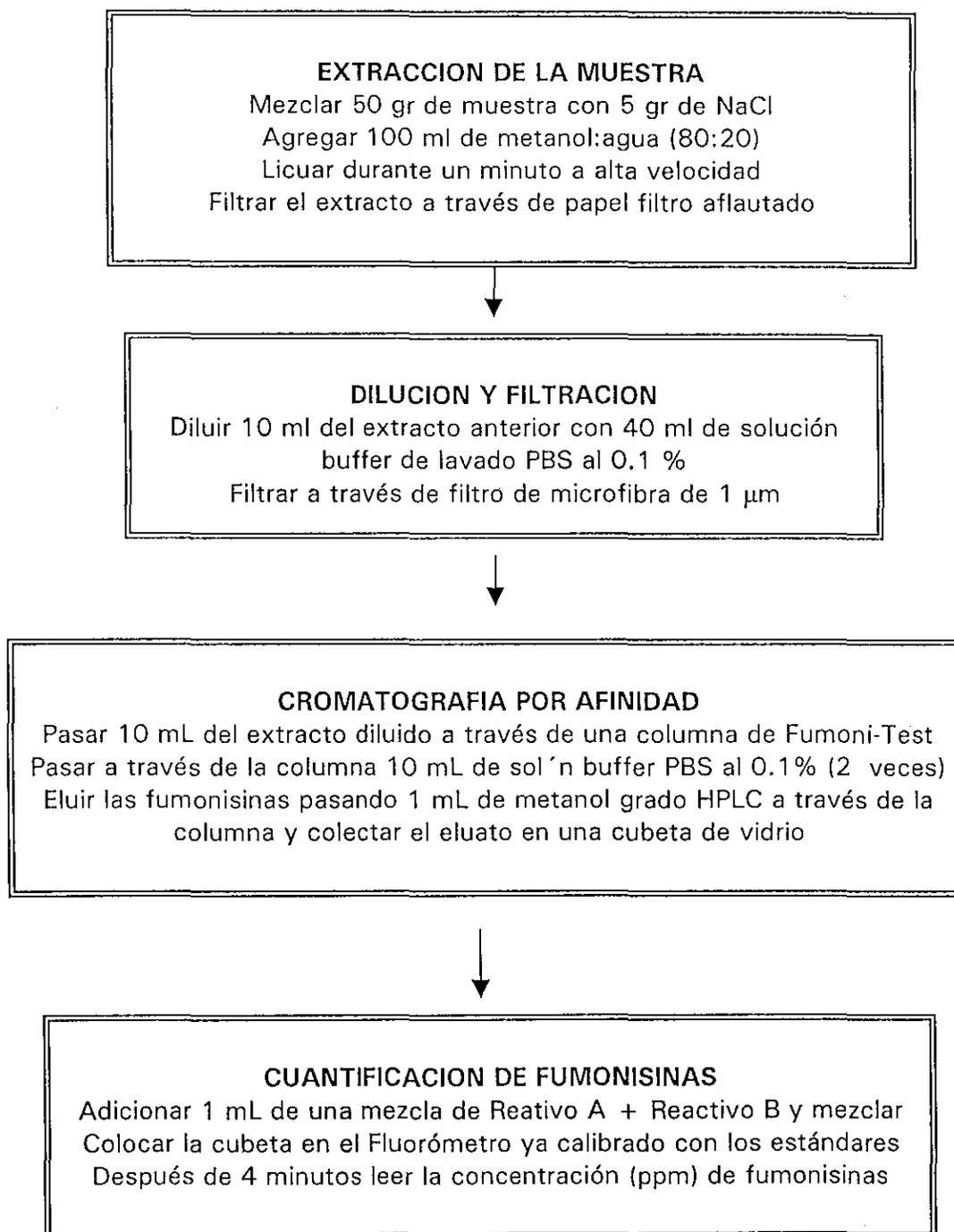
Se utilizó material de vidrio de laboratorio (vasos de precipitado de 250 mL y de 100 mL, pipetas de 1, 5 y 10 mL, embudos de plástico, tubos fluorométricos (cubetas de vidrio), probetas de 50 y 100 mL y matraces aforados de 1000 mL), papel filtro Whatman No. 1, filtros de fibra de vidrio de 1 μ m y los siguientes reactivos:

- Agua bidestilada
- Columnas de Fumoni-Test (preparadas con anticuerpos específicos)
- Cloruro de Sodio (NaCl)
- Estándares para calibrar el equipo (1 y 17 ppm, # de serie 33060 de Laboratorios VICAM)
- Metanol (grado reactivo)
- Metanol (grado HPLC)
- Solución buffer PBS al 0.1% (Solución de fosfatos)
- Reactivo A (o-phthaldialdehído)
- Reactivo B (2-mercaptoetanol)

6.6 Equipo

- Fluorómetro Serie 4, marca VICAM
- Licuadora con baja y alta velocidad, con vaso de acero inoxidable.

Figura 9. Determinación de fumonisinas por el método de cromatografía por inmunoafinidad con detección fluorométrica



6.7 Técnica

El fundamento de la técnica para la determinación de fumonisinas por cromatografía por inmunoafinidad con detección fluorométrica es el siguiente: las muestras se mezclan con una solución de extracción y se filtran. El extracto se pasa a través de una columna de inmunoafinidad de Fumoni-Test, la cual contiene anticuerpos específicos para las fumonisinas. En esta etapa las fumonisinas se unen a los anticuerpos en la columna. La columna es entonces lavada para quitar las impurezas. Al pasar una solución eluente (metanol grado HPLC) a través de la columna, las fumonisinas son removidas de los anticuerpos. Por último, la concentración (ppm) de fumonisinas es determinada por fluorometría (Ware *et al.*, 1994)

El procedimiento para la determinación de fumonisinas consistió en lo siguiente:

1.0 Extracción de la muestra:

- 1.1 Se colocan 50 g de muestra (previamente molida) y 5 g de cloruro de sodio en una jarra para licuadora
- 1.2 Se agregan 100 mL de metanol (grado reactivo) al 80%
- 1.3 Licuar durante 1 minuto a alta velocidad
- 1.4 Filtrar a través de papel filtro Whatman No. 1 y coleccionar el extracto en un vaso de precipitado

2.0 Dilución y filtración del extracto:

- 2.1 Diluir 10 mL del extracto anterior con 40 mL de solución buffer de fosfatos (PBS) al 0.1% y mezclar
- 2.2 Filtrar a través de un filtro de fibra de vidrio de 1 μm .

3.0 Cromatografía por afinidad con columnas Fumoni-Test (con anticuerpos específicos para las fumonisinas):

- 3.1 Pasar 10 mL del extracto diluido y filtrado (10 mL equivalen a 1 g de la muestra) a través de una columna de Fumoni-Test.

- 3.2 Después de que el extracto haya pasado completamente a través de la columna, pasar 10 mL de solución buffer de fosfatos (PBS) al 0.1% (2 veces)
- 3.3 Eluir las fumonisinas pasando 1 mL de metanol (grado HPLC) por la columna y coleccionar el eluato en una cubeta de vidrio (tubos fluorométricos)
- 3.4 Agregar 1 mL de una mezcla de reactivo A y reactivo B (15 mL de reactivo A más 20 μ L de reactivo B) y mezclar, colocar la cubeta en el fluorómetro ya calibrado con los estándares y después de 4 minutos leer la concentración (ppm) de fumonisinas (Ware *et al.*, 1994)

Este método fue validado por VICAM (1997) mediante el procedimiento con HPLC (Cromatografía de líquidos de alta resolución) con las siguientes características:

- Límite de detección: 0.016 ppm (16 ppb) para el total de las fumonisinas y 0.010 ppm (10 ppb) para la FB₁, 0.004 ppm (4 ppb) para la FB₂ y 0.002 ppm (2 ppb) para la FB₃.
- El porcentaje de recuperación es >80% para un rango de 0.016 a 10 ppm de fumonisinas.
- La precisión para el total de fumonisinas es \leq 11% para un rango de 0.25 a 10 ppm.
- La correlación entre los métodos de Fluorimetría y HPLC mediante el análisis por regresión lineal es de $r = 0.996$

Además también se hizo la validación de dicho método por Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masas (GC/MS) (Anexo 1)

6.8 Fase de Gabinete

Durante esta fase se hizo el procesamiento de los datos recolectados en la fase de campo y la fase de laboratorio (Análisis Estadístico de la información), así como también la interpretación de los resultados. De acuerdo a los resultados obtenidos (nivel de fumonisinas encontrados en los diferentes productos) se relacionaron con los encontrados en otros estudios para establecer el posible riesgo de exposición a fumonisinas.

Criterios utilizados para realizar esta investigación:

De Inclusión

- Se muestrearon los molinos que cuentan con el proceso de nixtamalización y elaboración de la tortilla (comercialización).
- Molinos de nixtamal ubicados en el sector Reforma de la ciudad de Guadalajara.

De Exclusión

- Molinos que en su proceso incluyan harina de maíz.
- Molinos que se encuentran fuera del sector Reforma de la ciudad de Guadalajara
- Molinos que no cuentan con todo el proceso desde la nixtamalización hasta la comercialización de la tortilla.

6.8.1 Análisis Estadístico de la Información (Anexo 2)

- Estadísticas descriptivas de la variable principal (nivel de fumonisinas) y las variables auxiliares (Cuadro 3)
- Comparación de los niveles de fumonisinas y análisis de varianza en los diferentes productos y contrastes ortogonales.
- Evaluación de la reducción de fumonisinas por cada proceso.

VII RESULTADOS Y DISCUSION

Tomando como base que el proceso de nixtamalización y elaboración de la tortilla se lleva a cabo con el método tradicional, se determinó incluir 4 molinos que representan el 10% del total, aleatoriamente seleccionados del padrón proporcionado por la CNIMT, estos molinos fueron identificados durante el estudio como A, B, C y D por motivos de confidencialidad.

7.1 Condiciones Ambientales en el Almacén del Maíz

En los molinos incluidos en la presente investigación se recibe el maíz con una periodicidad de 8 días, lapso que se considera como el mayor tiempo de almacenamiento del grano antes de ser procesado.

En los sitios de almacenamiento del maíz se registraron algunas condiciones ambientales (humedad relativa y temperatura), y se determinó el contenido de humedad del grano. En la Figura 10 se presentan las temperaturas máximas y mínimas registradas en cada molino. Durante los días de almacenamiento del maíz se registraron en los molinos las temperaturas máximas de 30 a 35°C y temperaturas mínimas entre 10 y 17°C, en tanto que la humedad relativa fluctuó desde 63 hasta 88% (Figura 11) (Cuadro 4).

Cuadro 4. Humedad relativa y temperatura de almacenamiento del maíz registradas en los diferentes molinos

Molino	Temperatura °C			Humedad Relativa %
	Mínima	Máxima	Promedio	
A	15	30	22.5	72
B	13	35	24	63
C	10	31	20.5	88
D	17	35	26	85

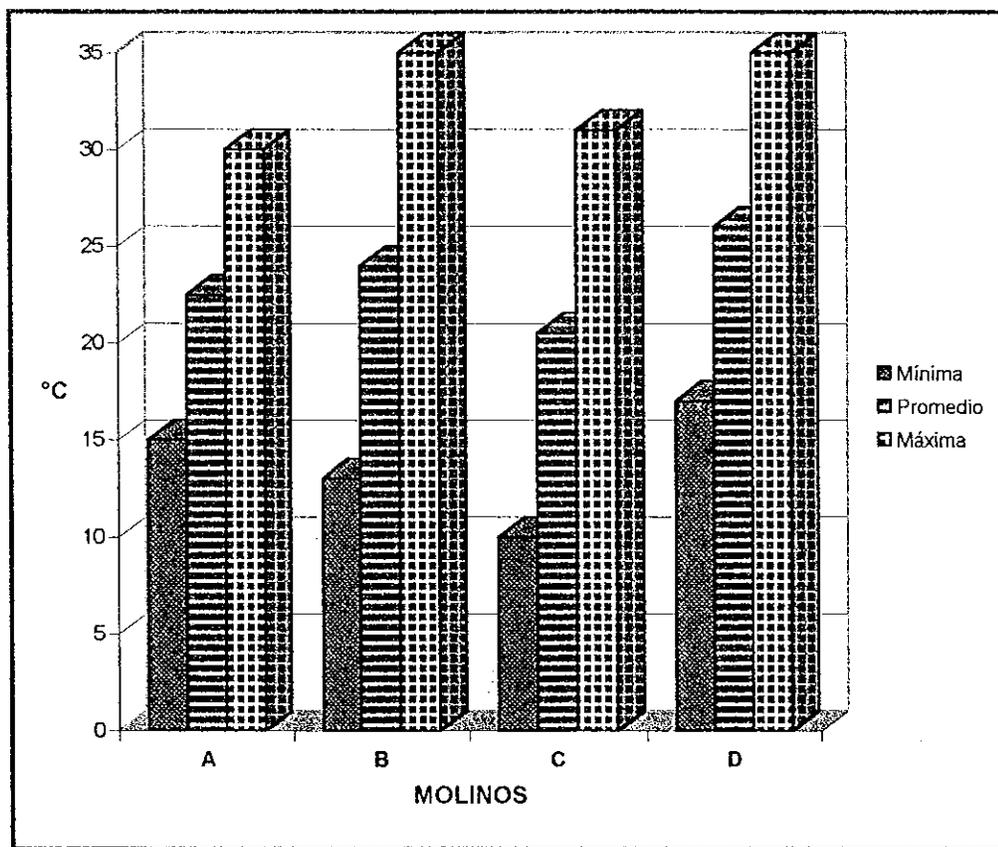


Figura 10. Temperatura ambiente (°C) registrada en los molinos del sector Reforma de la ciudad de Guadalajara

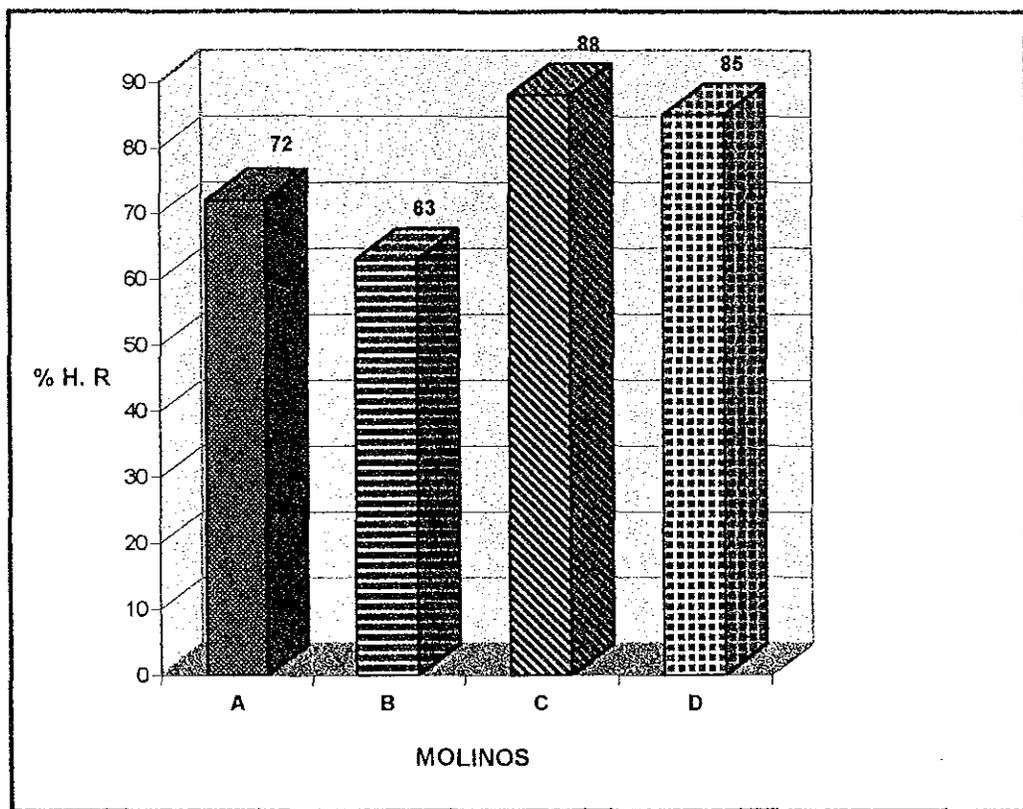


Figura 11. Porcentaje de humedad relativa (H.R) registrada en los molinos del sector Reforma de la ciudad de Guadalajara

Las condiciones ambientales de temperatura y humedad relativa que prevalecieron en el almacén de los molinos en estudio se consideran dentro del rango óptimo para el crecimiento de hongos y la producción de micotoxinas reportados por González (1995) siendo de 20 a 25°C y de 65 a 85% respectivamente, además de que el maíz permaneció almacenado durante 8 días en promedio, tiempo suficiente para la producción de esporas, lo cual puede ocurrir entre 2 y 3 días a 28°C y en 5 días a 20°C según Porras (1979). Las temperaturas ambientales registradas durante el estudio son similares a las reportadas por Barragán (1996) en un estudio desarrollado entre marzo y agosto de 1995.

Aunque las condiciones ambientales de almacenamiento del maíz presentes durante el desarrollo del estudio fueron propicias para la contaminación por *Fusarium moniliforme*, el contenido de humedad del maíz (8 a 9.1%) no es favorable para el crecimiento del hongo, Bacon y Nelson (1994) reportan humedades en el maíz de 18.4 a 23 % adecuadas para el crecimiento de *F. moniliforme* y González (1995) recomienda almacenar el grano con un contenido de humedad menor a 15% para evitar la contaminación.

7.2 Proceso de Nixtamalización y Elaboración de la Tortilla

La nixtamalización según el método tradicional, es un proceso térmico alcalino para la obtención de masa para elaborar tortilla. Consiste en agregar Cal $[Ca(OH)_2]$ al maíz en una proporción de 1 a 2 % y someterlo a cocción. Durante el proceso se registraron temperatura y tiempos de cocción en cada molino, las cuales se presentan en el Cuadro 5, encontrándose un promedio de 79.6°C y un rango de 8.4°C, en tanto que el tiempo de cocción varió de 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 de 10 a 23 horas.

Cuadro 5. Temperaturas y tiempos en el proceso de nixtamalización

Molino	Tiempo de Nixtamalización (minutos)	Temperatura de Nixtamalización (°C)	Tiempo de Reposo del Nixtamal (horas)
A	8	79.1	21
B	13	85.0	23
C	19	77.8	19.5
D	10	76.6	10.5
Promedio	12.5	79.63	18.5
% C.V	38.36	4.68	29.85

Una vez concluido el tiempo de reposo del nixtamal, 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.

Durante la nixtamalización, el tiempo de reposo así como la temperatura y tiempo de cocción registrados fueron 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 en todos los molinos, estas etapas permitieron lograr una reducción significativa de los niveles de contaminación por fumonisinas.

El producto que se obtiene de 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 de 2.4°C (Cuadro 6). Posteriormente se pesaron porciones de masa de 20 kilogramos y se dejaron en reposo sobre mesas a temperatura ambiente.

Cuadro 6. Temperatura de la masa en los diferentes molinos.

Molino	Temperatura de la Masa (°C)
A	59.9
B	57.6
C	57.7
D	56.3
Promedio	57.8
% C.V	2.58

Las temperaturas observadas en esta investigación son semejantes a las reportadas por Barragán (1996) de 54.9°C en promedio y a las encontradas por Almeida y Rooney (1996) de 50 a 75°C. Dichas temperaturas son ideales para obtener una buena consistencia de la masa y son el resultado de una adecuada molienda.

La elaboración de la tortilla se realizó sometiendo la masa al cocimiento sobre bandas metálicas que alcanzaron temperaturas de 135 a 260°C, similares a las reportadas por Gómez *et al.* (1989) de 216°C, con un tiempo de cocción de 31 a 44 segundos, alcanzando las tortillas una temperatura promedio de 86.5°C (Cuadro 7)

Jackson *et al.*, (1996) reportaron que parámetros físicos como el tiempo y temperatura de procesamiento son factores críticos que afectan la descomposición de la FB₁, sus resultados sugieren que cuando los alimentos son sometidos a temperaturas de 100 a 125°C, el contenido de FB₁ sufre pequeños cambios, sin embargo si los alimentos alcanzan temperaturas mayores a 150°C durante el proceso pueden bajar sustancialmente el nivel de fumonisinas.

Cuadro 7. Condiciones de tiempo y temperatura durante la elaboración de la tortilla

Molino	Temperatura de la banda en la máquina elaboradora de tortilla (°C)	Tiempo de cocción (segundos)	Temperatura de tortilla °C
A	135	44	86.1
B	260	31	86.8
C	170	35	87.8
D	137	32	85.3
Promedio	175.5	35.5	86.5
% C.V.	33.38	16.66	1.23

El porcentaje de humedad encontrada en los diferentes productos del proceso de elaboración de la tortilla se presenta en el Cuadro 8, registrándose valores promedio de 8.4%, 50.2%, 50.6% y 43.1% en el maíz, nixtamal, masa y tortilla respectivamente.

Cuadro 8. Porcentaje de humedad registrada en los productos en la elaboración de la tortilla.

Molino	% de Humedad			
	Maíz	Nixtamal	Masa	Tortilla
A	9.1	50.2	49.1	44.6
B	8.4	52.8	49.2	43.1
C	8.0	50.1	52.3	43.1
D	8.1	47.5	51.9	41.6
Promedio	8.4	50.2	50.6	43.1
% C.V.	5.9	4.3	3.4	2.8

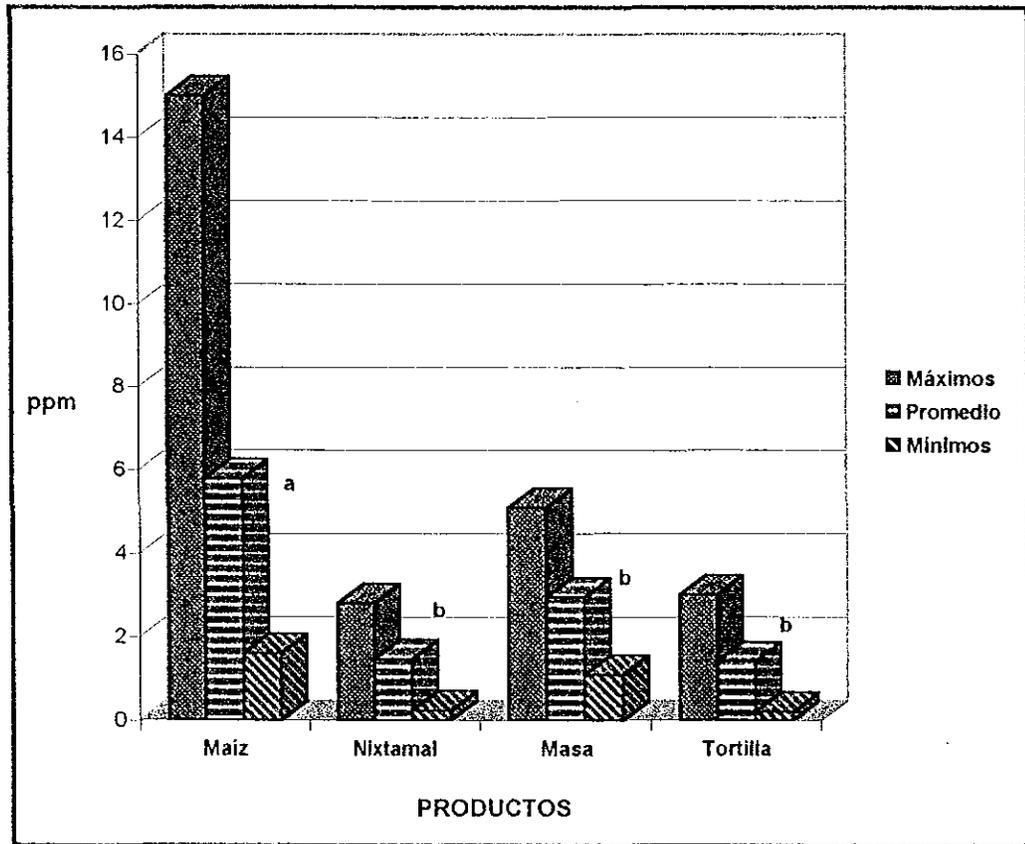
Almeida y Rooney (1996) reportan contenidos de humedad de 45 a 52% y no mayores de 60% en nixtamal y masa respectivamente similares a los registrados en este estudio. Se presenta mayor contenido de humedad en la masa debido a la adición de agua durante la molienda ya que con esto se disminuye la fricción y evita el sobrecalentamiento y produce una masa de textura más suave.

En cuanto al contenido de humedad de la tortilla, Almeida y Rooney (1996) encontraron valores de 38 a 55% y Barragán (1996) reportó humedades en promedio de 41.7%, semejantes a los observados en esta investigación.

7.3 Detección de Fumonisinias

Respecto a la contaminación por fumonisinias en los productos analizados (maíz, nixtamal, masa y tortilla) fue posible detectar niveles de la toxina en el 100% de las muestras, encontrándose mayor contaminación en el maíz, el cual fue estadísticamente diferente ($p < 0.01$) al resto de los productos (Figura 12).

Los niveles de fumonisinias detectados en el maíz se presentan en el cuadro 9, en todos los casos fue posible observar una reducción en los niveles de fumonisinias debida al proceso de nixtamalización y elaboración de la tortilla. El contenido de fumonisinias más alto que se presentó en el maíz en promedio fue de 11.86 ppm en el molino A, en tanto que el más bajo fue de 2.43 ppm 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) ($p < 0.01$).



Las literales indican diferencia estadística ($p < 0.01$)

Figura 12. Niveles de fumonisinas encontrados en los diferentes productos durante el proceso de elaboración de la tortilla

Cuadro 9. Niveles de fumonisinas en el maíz (ppm)

	Molino			
	A	B	C	D
Promedio (ppm)	11.86 ^a	4.3 ^b	4.56 ^b	2.43 ^b
Desviación estándar	3.2	1.73	1.91	0.91
% Coeficiente de variación	26.98	40.35	41.91	37.29
Rango	6.4	3.4	3.8	1.8

Las literales indican diferencia estadística ($p < 0.01$)

El Cuadro 10 presenta el nivel de fumonisinas en todos los productos analizados, apreciándose niveles promedio de 5.79 ppm, 1.47 ppm, 2.95 ppm y 1.41 ppm en el maíz, nixtamal, masa y tortilla respectivamente (Figura 13). 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 ppm en el nixtamal y 0.69 ppm en la tortilla.

Se observó mayor concentración de fumonisinas en masa respecto al nixtamal, encontrándose niveles de hasta 3.96 ppm en el molino A. En todos los molinos se observó el efecto de incremento de fumonisinas, en una proporción de 2:1 en promedio. Dicho efecto se ha observado en investigaciones con aflatoxinas (García *et al.*, 1997) posiblemente debido a la homogenización del nixtamal durante la molienda.

En la Figura 14 se observa el comportamiento de las fumonisinas durante el proceso de nixtamalización y elaboración de la tortilla, mostrándose las concentraciones promedio de estas toxinas y las desviaciones estándar en cada fase del proceso y en cada uno de los molinos estudiados

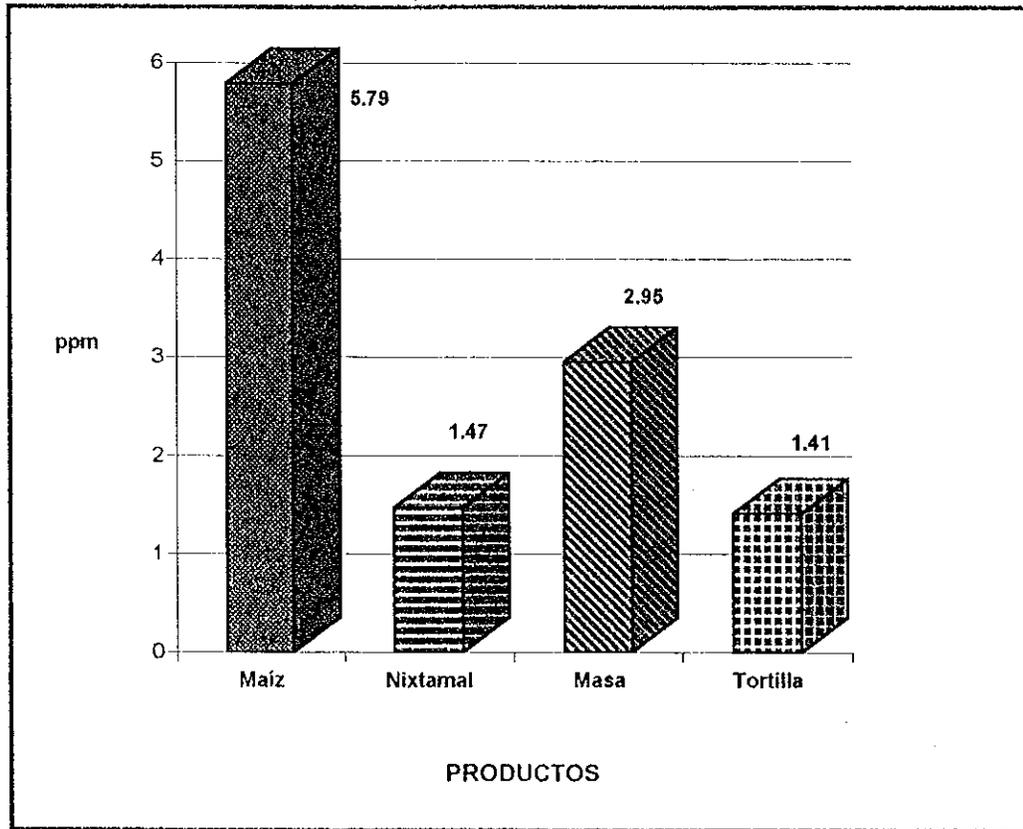
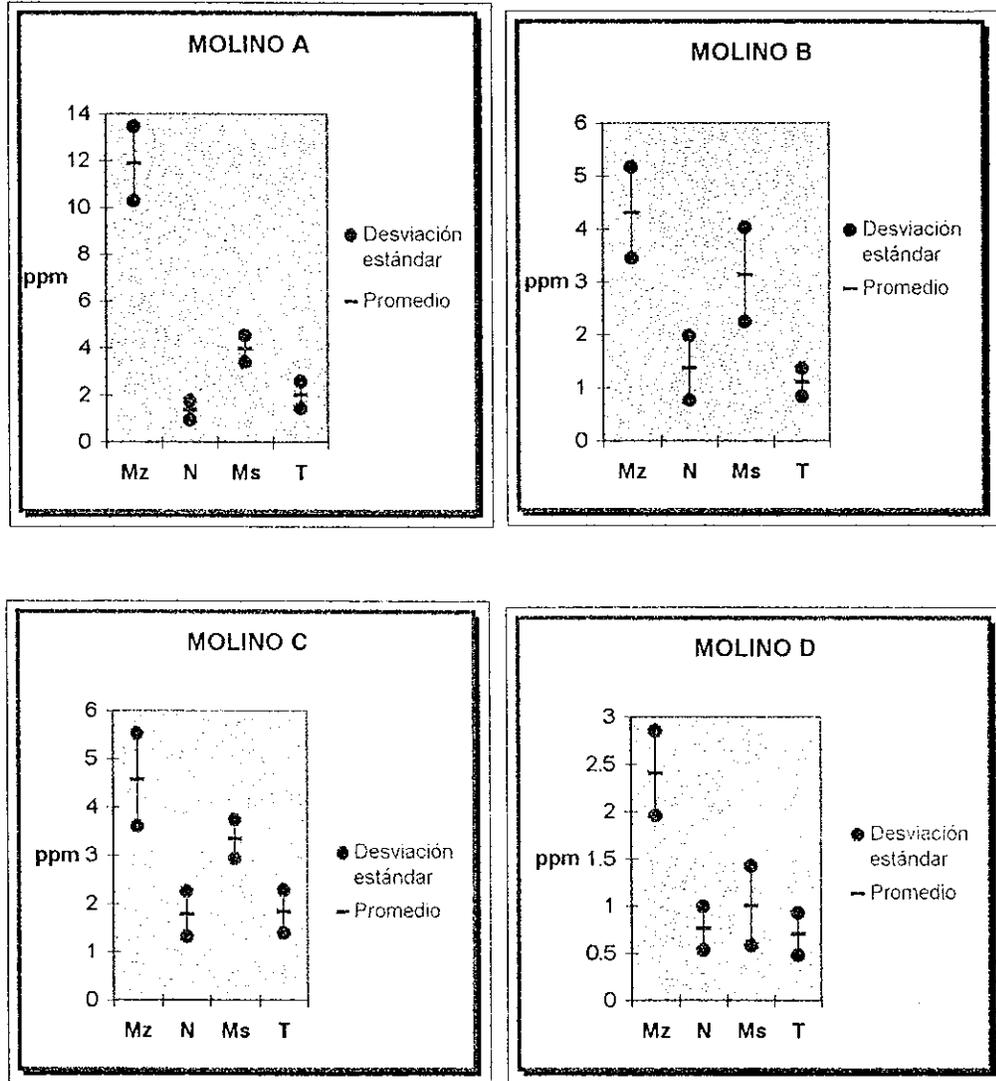


Figura 13. Niveles promedio de fumonisinas encontrados en los productos durante el proceso de elaboración de la tortilla.



Mz: Mafz Ms: Masa
 N: Nixtamal T: Tortilla

Figura 14. Comportamiento de las fumonisinas durante el proceso de nixtamalización y elaboración de la tortilla en los molinos del sector Reforma de la ciudad de Guadalajara

Cuadro 10. Niveles promedio de fumonisinas detectados en los diferentes productos del proceso de nixtamalización y elaboración de la tortilla, en los molinos del sector Reforma de la ciudad de Guadalajara.

Molino	Maíz (ppm)	Nixtamal (ppm)	Masa (ppm)	Tortilla (ppm)
A	11.86 ^a	1.34	3.96	2.01
B	4.3 ^b	1.99	3.13	1.11
C	4.56 ^b	1.78	3.33	1.83
D	2.43 ^b	0.76	1.36	0.69
Promedio	5.79	1.47	2.95	1.41
% C.V	71.8	37.1	37.8	43.8

Las literales indican diferencia estadística ($p < 0.01$)

En esta investigación la contaminación por fumonisinas detectada en el maíz fue en promedio de 5.79 ppm (Cuadro 10). Se desconoce si esta contaminación se originó en campo o se desarrolló en el sitio de almacenamiento. Los niveles de fumonisinas en el maíz determinados previamente a la nixtamalización se consideran altos, ya que las concentraciones detectadas por Ross *et al.* (1991) en maíz aparentemente sano fluctuaron de 1 a 4 ppm.

El porcentaje de reducción de fumonisinas en los productos del proceso fue calculado a partir de los niveles detectados en el maíz, en todos los casos el proceso de nixtamalización redujo significativamente el contenido de la toxina, probándose la diferencia a un nivel de significancia de $p < 0.01$ mediante la técnica de contrastes ortogonales. La reducción en el nixtamal fue de 74.6% en la masa de 49.2% y en la tortilla de 75.6%, respecto a los niveles encontrados en el maíz (Cuadro 11)

Cuadro 11. Porcentaje de reducción en los niveles de fumonisinas en nixtamal, masa y tortilla respecto al maíz.

Producto	Niveles de fumonisinas (ppm)	% de Reducción
Maíz	5.79	
Nixtamal	1.47	74.6
Masa	2.95	49.2
Tortilla	1.41	75.6

Scott (1993) afirma que los procesos térmicos reducen los niveles de fumonisinas, sin embargo otros estudios indican que la reducción puede atribuirse a que la toxina permanece atada a la matriz del alimento y no es detectada por los métodos usuales de medición, lo que se observa con frecuencia en el maíz, ya que una vez que ha sido sometido a calor o procesado, la extracción durante la técnica de cuantificación no recupera la totalidad de las fumonisinas por lo que se detecta una cantidad menor.

Guzmán de Peña (1995) ha señalado que el uso de álcalis fuertes para descontaminar el maíz con micotoxinas es viable ya que ocasionan la reducción parcial o la total eliminación de la toxina en el alimento, entre estos compuestos químicos se encuentra el $\text{Ca}(\text{OH})_2$ utilizado durante el proceso de nixtamalización.

Dumbrink-Kurtzmin y Dvroak (1999) analizaron tres diferentes métodos de detección para la cuantificación de fumonisinas y sus hidrolizados a partir de muestras de harina de maíz nixtamalizado y tortilla, en diferentes ciudades de la República Mexicana, así como de Venezuela, Guatemala y Estados Unidos. La incorporación de EDTA (ácido etilendiaminotetracético) para la extracción de la muestra, permitió reducir el contenido de calcio y mejorar el porcentaje de recuperación de las fumonisinas y sus hidrolizados. Las cantidades de fumonisinas fueron mayores en los productos recolectados en México, estadísticamente

diferentes ($p < 0.01$) comparado con los valores obtenidos de los productos de Estados Unidos. En México los niveles de FB₁ detectados en masa y tortilla se presentaron en un rango de 0.21 a 0.38 ppm con un promedio de 0.16 ppm, resultados procedentes de tres muestras. Sin embargo, en ambos casos los niveles de fumonisinas son menores a los promedios de esta investigación (masa 2.95 ppm y tortilla 1.41 ppm).

El efecto térmico de elaboración de la tortilla permitió la reducción de los niveles de fumonisinas en forma eficiente, calculándose una reducción del 52.2% respecto a los niveles detectados en la masa. Las concentraciones de dicha toxina encontradas en la tortilla son significativamente menores a las registradas en la masa ($p < 0.01$).

Los niveles promedio de fumonisinas que se encontraron en el maíz al ser comparados con los reportados por Rheeder *et al.* (1992) son considerados de riesgo tóxico a la salud, además Norred y Voss (1994) en estudios realizados en Estados Unidos particularmente en Charleston, Carolina del Sur, región de alta incidencia de cáncer esofágico en humanos, reportaron niveles de fumonisinas de 0.17 a 2.4 ppm de la toxina en maíz, mientras que en Transkei Sudáfrica, región de alta incidencia de dicha enfermedad, Sydenham (1990a) determinó los niveles de 6.7 a 10.2 ppm de fumonisinas en maíz aparentemente sano y de 63.2 a 140.5 ppm en maíz mohoso.

Las investigaciones realizadas hasta ahora apoyan la teoría de que *F. moniliforme* y las fumonisinas están relacionados con el cáncer esofágico humano, sin embargo, existen factores como las nitrosaminas y otros factores carcinogénicos que se encuentran involucrados en el incremento de esta enfermedad, además del tabaquismo, el consumo de alcohol, algunas condiciones ambientales y de la dieta pueden estar relacionados con la etiología de la enfermedad sin descartar que las fumonisinas son al menos en parte responsables.

VIII CONCLUSIONES

- Aunque las condiciones ambientales de temperatura (10 a 32.5°C) y de humedad relativa (63 a 88%) registradas en el almacén de los molinos se consideran favorables para el desarrollo de *F. moniliforme*, el contenido de humedad del maíz (8.0–9.1%) no representó un factor de riesgo de contaminación.
- Durante el proceso de nixtamalización y elaboración de tortilla se alcanzaron temperaturas promedio que fluctuaron de 79.6°C (nixtamal), 57.8°C (masa) y 175.5°C (máquina elaboradora de tortilla).
- Se detectó contaminación por fumonisinas en el 100% de las muestras obtenidas en el sector Reforma de la ciudad de Guadalajara, encontrándose niveles promedio de 5.79 ppm en el maíz, 1.47 ppm en el nixtamal, 2.95 ppm en la masa y 1.41 ppm en la tortilla.
- El proceso de nixtamalización redujo significativamente ($p < 0.01$) los niveles de fumonisinas en el nixtamal en 74.8% respecto a los niveles encontrados en el maíz, mientras que el proceso térmico de elaboración de la tortilla permitió la disminución de las fumonisinas en un 52% en la tortilla respecto a los niveles detectados en la masa.
- El proceso de nixtamalización y elaboración de la tortilla se considera efectivo para la reducción de fumonisinas, considerándose los niveles promedio en tortilla (1.41 ppm) de no riesgo tóxico a la salud pública, con base a lo encontrado en otros estudios.

- Debido al alto consumo de tortilla y de productos nixtamalizados en México y en otros países latinoamericanos, es necesario evaluar la producción de hidrolizados de fumonisinas en dichos productos para detectar cualquier riesgo a la salud.
- Con el desarrollo de proyectos de investigación como este, es posible establecer las bases para determinar en que fases del proceso de nixtamalización y elaboración de la tortilla se debe poner especial interés para reducir los niveles de fumonisinas y por ende el riesgo a la salud.
- El campo de la Salud Ambiental tiene dentro de sus áreas de desarrollo un potencial altamente significativo en el área de la Toxicología Alimentaria, los principales aspectos que en este sentido han de impulsarse son aquellos que promuevan acciones tendientes al consumo de alimentos seguros, por lo cual con el desarrollo de esta investigación se intenta apoyar las medidas que hagan del maíz y sus productos (esenciales en la dieta del mexicano) alimentos de consumo más seguros.

IX BIBLIOGRAFIA

- 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 B₁ by *Fusarium moniliforme*. Appl. Environ. Microbiol., 56: 1729-1733
- ALMEIDA, H. D y Rooney, L. W. 1996. Mejoramiento de la calidad de productos nixtamalizados. Centro de Asistencia Técnica. Asociación Americana de Soya. México.
- AZCONA, O. J., Abouzied, M. M., Plattner, R. D., and Pestka, J. J., 1992. Production of monoclonal antibodies to the mycotoxins fumonisins B₁, B₂ and B₃. J. agric. Food Chem., 40:531-534
- 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.
- BARRAGAN, 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 en Ciencias de la Salud Pública. Centro Universitario de Ciencias de la Salud. Universidad de Guadalajara.
- BEZUIDENHOUT, S.C and Gelderblom, W. C. A 1988. Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. J. Chem. Soc. Commun., 4 : 743-745
- BULLERMAN, LL. B and Draughon, F. A. 1994. *Fusarium moniliforme* and fumonisins Symposium. J. food Prot., 57 (6):513-
- BULLERMAN, LI. B., and Tsai W. Y. J., 1994. Incidence and levels of *Fusarium moniliforme* , *Fusarium proliferatum* and fumonisins in corn an corn-based food and feeds. J. Food Prot. 57 (6): 541-546.
- CAWOOD, M.E., Gelderblom, W. C. A., Vieggar, R. B., Thiel, P. G. and Marasas, W. F. O. 1991. Isolation of fumonisin mycotoxins: A quantitative approach. J. Agric. Food Chem. 39: 1958-1962.

- COHEN, S. M and Ellwein, L. B. 1990. Cell proliferation carcinogenesis. Science. 249: 1007-1011.
- COTRAN, R. S., Kumar. V., and Robbins. S. L. 1990. Patología estructural y funcional 4ª edición, Ed. Interamericana. 2: 880-883
- COULOMBE, R.A., 1993. , Biological action of mycotoxins. J. of Dairy Sci. 76:3, 880-891.
- CHU, F.S. and Li G, Y. 1994. Simultaneous occurrence of fumonisin B₁ and other mycotoxins in moldy corn collected from the people´s Republic of China in regions whit high incidence of esophageal cancer. Appl. Environ. Microbiol. 60:847-852.
- DANIEL, W. W. 1996. Bioestadística, base para el análisis de las ciencias de la salud. Ed. Limusa, Grupo Noriega Editores. México D. F.
- DERACHE, R. 1990. Toxicología de los hongos en Toxicología y seguridad de los alimentos. Ed. Omega, S. A. Barcelona, España. p.p. 165-189
- DESJARDINS, A. Plattner, R.D. and Nelson P. E. 1994. Fumonisin production and other traits of *Fusarium moniliforme* strains from maize in Northeast México. Appl. Environ. Microbiol. 1695-1697.
- DOMBRINK-KURTZMAN, M. A and Dvorak, J. 1999. Fumonisin content in masa and tortillas from Mexico. J. Agric. Food Chem. 47: 622-627.
- GARCIA, G., Martínez R., Melgarejo J., y Sánchez. 1997. La nixtamalización como mecanismo de descontaminación de maíz para consumo humano. Memorias del Segundo Congreso Latinoamericano de Micotoxicología. Macaray, Venezuela.
- GARIBAY, Ch. G. 1997. La salud ambiental, retos y perspectivas hacia el siglo XXI. Universidad de Guadalajara.
- 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 carciongenesis and citotoxicity assays. Food Chem. Toxicol.
- GOMEZ, M. H., McDonough, C. M., Rooney, L. W and Waniska, R. D. 1989. Changes in corn and sorghum during nixtamalization and tortilla baking. J. Food Sci. 54 (2): 330-336.

- GONZALEZ, A. U., 1995. Plagas del maíz en El maíz y su conservación. Ed. Trillas. México D.F. p.p. 177-278.
- GONZALEZ, I. J. F. 1998. Maíz. Agro-Síntesis. Ed. Año Dos Mil. S. A. México, D. F.
- GUZMAN DE PEÑA, D., Trudel, L., and Wogan, G. N. 1995. Corn "Nixtamalización" and the fate of radiolabelled Aflatoxin B₁ in the tortilla making process. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 55: 858-864.
- HARRIS, C. C. 1991. Chemical and physical carcinogenesis: advances and perspectives for the 1990s. Cancer Res. 51: 5023-5044.
- 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 B₁ as well as fumonisin-contaminated feed, alters swine serum and tissue sphinganine and sphingosine levels, biomarkers of exposure. Toxicologist., 13:232-236
- HENDRICH, S., Miller K.A., Wilson T.M., and Murphy P.A., 1993. Toxicity of *Fusarium proliferatum* - Fermented nixtamalized corn-based diets feed to rats: effect of nutritional status. J. Agric.Food Chem. 1649-1654.
- JACKSON, L. S., Hlywka, J. J., Sentil, K. R., Bullerman, L. B., and Musser, S. M. 1996. Effects of time, temperature and pH on the stability of fumonisin B₁ in an aqueous model system. J. Agric. Food Chem. 44: 906-912.
- LESLIE, J. F., Plattner, R. D., Desjardins, A. E and Klittich, C. R. 1992. Fumonisin B₁ production by strains from different mating populations of *Gibberella fujikuroi*. Phytopathology, 82: 341-345
- MEDINA, B. J. C., y Muñoz S. J. 1993. Contaminación con Zearalenona y Deoxinivalenol en sorgo y alimentos balanceados en México. Avirama 3:38-43.
- MERRILL, A. H. , Wang, E., Gilchrist, D. G., and Riley, R. T. 1993. Fumonisin and other inhibitors of *de novo* sphingolipid biosynthesis. Adv. Lipid. Rest. 26:215-234.
- MERRILL, A. H. Jr. 1991. Cell regulation by sphingosine and more complex sphingolipids. J. Bioenerg. Biomem. 23:83-104
- MUSSER, S. M and Plattner, R.D. 1997. Fumonisin composition in cultures of *Fusarium moniliforme*, *Fusarium proliferatum*, and *Fusarium nygami*. J. Agric. Food Chem. 45: 1169-1173.

- NELSON, P.E. 1992. Taxonomy and biology of *Fusarium moniliforme*. Mycopathologia 117:29-36.
- NELSON, P.E., Plattner R.D., Shackelford D.D. and Desjardins A.E. 1992. Fumonisin B₁ production by *Fusarium* species other than *Fusarium moniliforme* in section Liseola and by some related Species. App. Environ. Microbiol. 58 (3):984-989.
- 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
- ORGANIZACION DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACION (FAO). 1993. Composición química y valor nutritivo del maíz en El maíz en la Nutrición Humana. Roma, Italia. p.p 15-32
- OSWEILLER, G. D., Ross, P. F, Wilson., T.M., and 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. Diag. 4: 53-59.
- PEREZ, D. A. 1996. Adición de proteínas de soya al maíz. Centro de Asistencia Técnica, Asoc. Americana de soya. México, D.F.
- PORRAS, E. 1979. Micotoxinas producidas por ciertos Mohos, son carcinógenos y toxinas poderosas. Agricultura de las Américas.
- REPETTO, M. 1995. Estado actual de la toxicología alimentaria en Toxicología avanzada. Ed. Díaz de Santos. Madrid España. p. p. 205-292.
- REYES, C. P. 1990. El maíz y su cultivo. Ed. A. G. T. México D. F.
- REYES, V., Ruelas M., y Udave F.C.G. 1997. Detección de fumonisinas en masa y tortillas que se expenden en la Zona Metropolitana de Guadalajara. Memorias de la XIV Reunión Nacional de Microbiología, Higiene y Toxicología de Alimentos. Guadalajara Jalisco México
- REYES, V.W.P.1997. Producción de fumonisinas por cepas de *Fusarium moniliforme* aisladas de una localidad al sur del Estado de Jalisco. Memorias del Congreso Mexicano de Toxicología, realizado del 20 al 20 de mayo de 1997. UAM. México D.F.
- RHEEDER, J. P., Marasas, W. F. O., Thiel, P. G., Sydenham, E., W., Shephard, G. S., and Vanschalkwyk, P. 1992. *Fusarium moniliforme* and

fumonisin in corn in relation to human esophageal cancer in Transkei. *Phytopath.*, 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., Norred W.P and Bacon Ch. W., 1993a. Fungal toxins in foods: Recent Concerns. *Annu. Rev.Nutr.* 167-189.
- RILEY, R. T., Showker, A., Yoo, H. S., Norred, W. P. Chamberlain, W. J., Wang, E., and Merrill, A. H. 1993b. Alteration of tissue and serum sphinganine to sphingosine ratio: An early biomarker in pigs of exposure to fumonisin-containing feed. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 118: 105-112
- RILEY, R., Voss, K., Soo Y. H., Delderblom, W, C. A and Merrill, A. H. 1994a. Mechanism of fumonisin toxicity and carcinogenesis. *J. Food Prot.* 57 (6): 528-535.
- RILEY, R.T., Hinton, D. M., Chamberlain, W. J., Bacon, C. W., Wang, E., Merrill, A. H and Voss, K. A. 1994b. Dietary fumonisin B₁ induces disruption of sphingolipid metabolism in sprague dawley rats: A new mechanism of nephrotoxicity. *J. Nutr.* 124:594-603.
- ROONEY, L. W., and Serna-Saldivar, S. O. 1997. Food uses of whole corn and dry milled fractions. *In* *Corn: Chemistry and Technology*; Watson, S. A. , Ramstad, P. E., Eds: American Association of cereal Chemists: St. Paul, MN. 399-429
- ROSS, P. F., Rice, L. G., Plattner, R. D., Osweiler, G. D and Wilson, T. M. 1991. Concentrations of fumonisin B₁ in feeds associated with animal health problems. *Mycopathology.* 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 B₁ y B₂. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 40: 326-329
- SCOTT, P. M. 1993. Fumonisin mini-review international. *J. Food Microbiol.* 18: 257-270.
- SCOTT, P. M., and Trucksess, M. W., 1997. Application of immunoaffinity columns to mycotoxin analysis.

- SCOTT, P.M and Lawrence, G. A. 1992. Stability and problems of fumonisins in food. Presented at the 106th Annual Association of Official Analytical Chemists International Meeting. August 31 – September 3. Cincinnati, OH (Abstract)
- SHEPHARD, G. S., Thiel, P. G., Sydenham, E. W., Vleggaar, R., and Alberts, J. F. 1994. Determination of the mycotoxin fumonisin B₁ and identification of its partially hydrolyzed metabolites in the feces of non human primates. Food. Chem. Toxicology
- STACK, M. E and Eppley, R. M. 1992. Liquid chromatographic determination of fumonisin B₁ and B₂ in corn products. J. Assoc. Off Anal. Chem. Int., 75:834-837
- STACK, M. E. 1998. Analysis of fumonisin B₁ and its hydrolysis product in tortillas. J. AOAC Int. 81 (4): 737-740.
- 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.
- SYNDENHAM, E. W., Shephard, S. G and Thiel, G.P. 1992 Liquid chromatographic determination of fumonisins B₁, B₂ and B₃ in foods and feeds. J. AOAC International, 2:313-318
- SYNDENHAM, E. W., Thiel, P. G., Marasas, W. F. O., Shephard, G. S, Schalkwyk, D. J.V., and Koch, K. R. 1990a. Natural occurrence of some *Fusarium* mycotoxins in corn from low and high esophageal cancer prevalence areas of the Transkei, Southern Africa. J. Agric. Chem. 38, 1900-1903.
- SYNDENHAM, E.W., Gelderblom, W.C.A., Thiel P.G and Marasas, W.F.O. 1990b. Evidence for the natural occurrence of fumonisin B₁, a mycotoxin produced by *Fusarium moniliforme* in corn. J. Agric. Food Chem. 38: 285-290.
- TASK Force Report. 1989. Mycotoxins Economic and Health Risks. Council for Agricultural Science and Technology., Iowa No. 116. 11-69.
- TEJEDA, M. V., Marovatsanga, L. T., and Pestka, J. J. 1994. Comparative detection of fumonisin by HPLC, Elisa and Immunocyto-chemical localization in *Fusarium* species. Appl. Environ. Microbiol., 57 (4): 1089-1093

- THIEL, P. G., Marasas W. F. O., Sydenham E. W. 1992. The implications of naturally occurring levels of fumonisins in corn for human and animal health. *Mycopathology*. 117:3-9
- THIEL, P. G., Shephard, G.S., Sydenham, E.W., Marasas, W. F. O., Nelson, P. E and Wilson, T. M. 1991 Levels of fumonisins B₁ and B₂ in feeds associated with confirmed cases of equine leukoencephalomalacia . *J. Agric. Food Chem.* 39:109-111.
- VALLE, V. P. 1991. *Toxicología de los Alimentos*. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud, Programa de Salud Ambiental OPS y OMS. Metepec Edó. de México. México D. F.
- VICAM. 1997. FumoniTest HPLC validation protocol for corn. Related doc: GN-P0023. Doc. #: VP-1011-2
- 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., Carman Jr., A.S. and Kuan, S.S. 1994. Analytical letters, evaluation of fumoni-test immunoaffinity columns, 27 (4): 693-715.
- YOO, H. S., Norred, W. P. Wang, E., Merrill, A. H and Riley, R. T. 1992. Fumonsin inhibition of the novo sphingolipids biosynthesis and cytotoxicity and 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):1626-1630

ANEXO 1

Con el fin de confirmar la presencia de las fumonisinas en las muestras estudiadas de maíz, nixtamal, masa y tortilla, productos del proceso de nixtamalización y elaboración de la tortilla, éstas se analizaron por Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masas (CG/EM) con los siguientes resultados:

En todas las muestras se detectan de forma cualitativa dicha toxina como lo confirman los cromatogramas que se anexan.

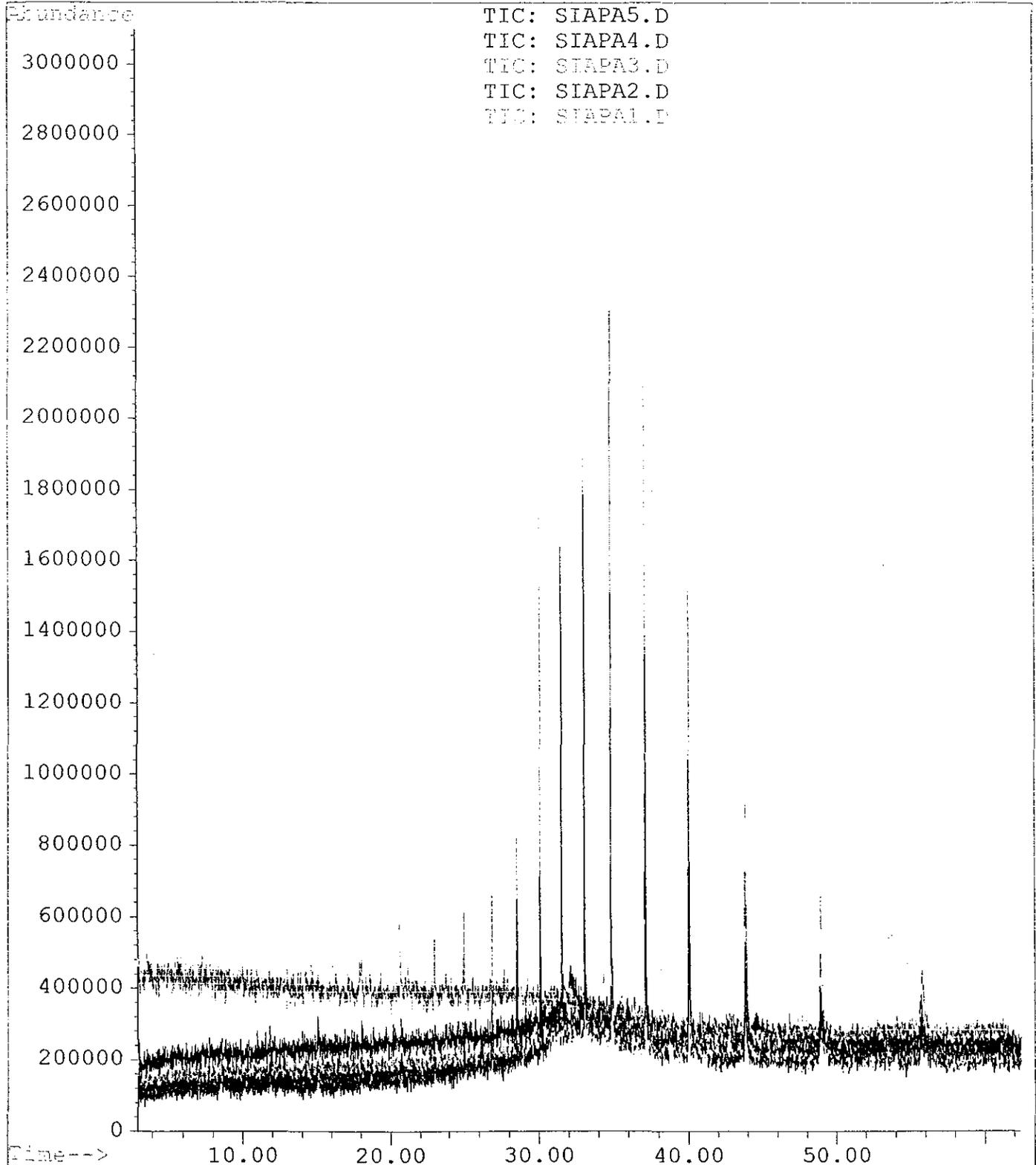
Simbología empleada en los cromatogramas

Muestra Analizada	Clave
Estándar de fumonisina de 5 ppm	SIAPA 1.D
Maíz	SIAPA 2.D
Masa	SIAPA 3.D
Nixtamal	SIAPA 4.D
Tortilla	SIAPA 5.D

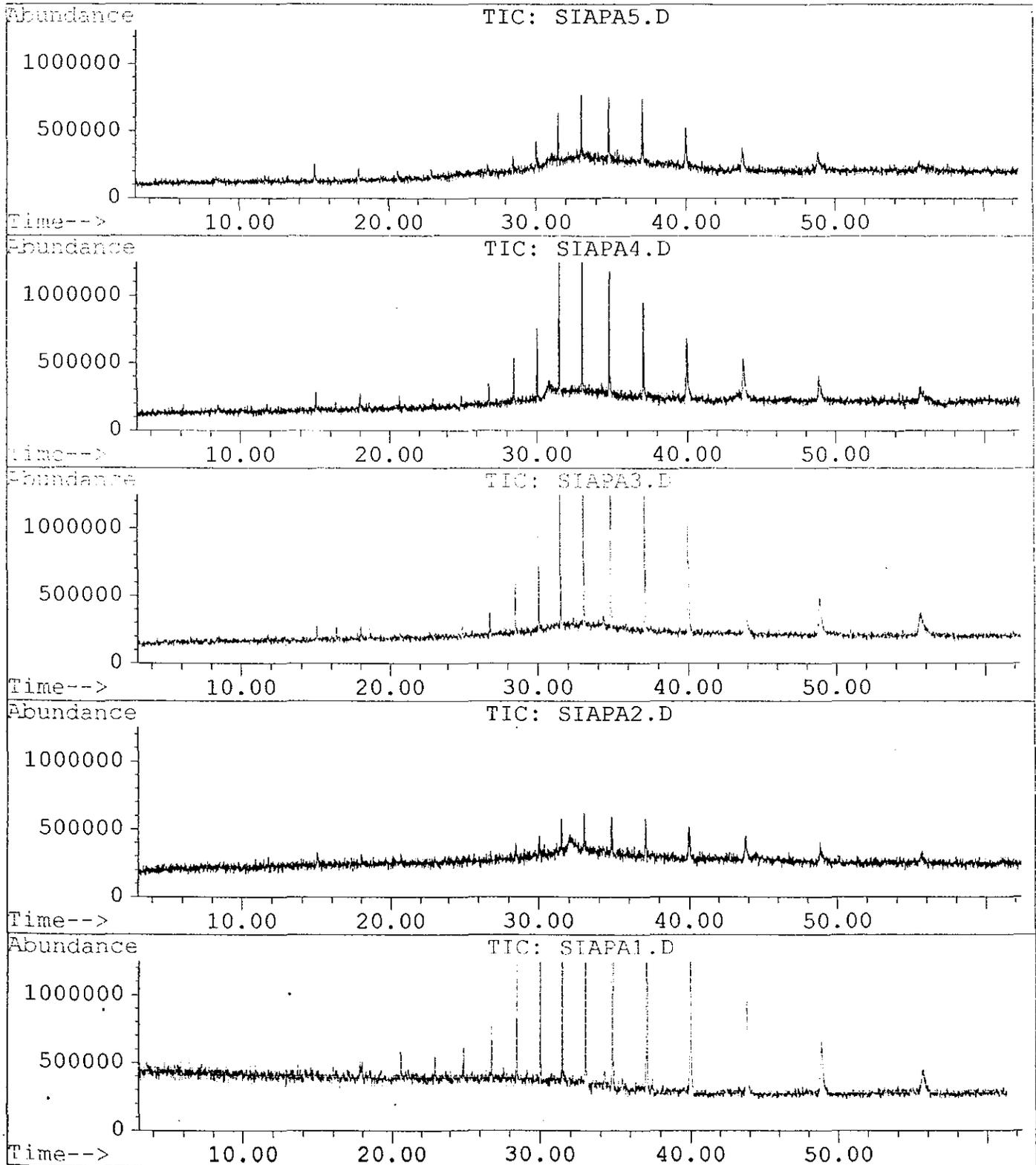
El método de CG/EM se realizó bajo las siguientes condiciones de equipo:

1. Cromatografía de Gases 5890 serie II, columna HP-5 de 30 metros, inyector a 280°C, detector a 290°C, rampa de temperatura de 45°C/2 minutos a 290°C en un rango de 8°C/minuto. El método empleado es para hidrocarburos y solventes extendiendo el tiempo de la determinación hasta 60-61 minutos. Gases: Helio a 30 PSI, Aire estraseco a 54 PSI, presión de cabeza de columna 8 PSI, relación split = 17.7
2. Tipo de Inyección: Directa, con jeringa de 10 µL HP se inyectaron 0.5 µL, inserto de 800 µL.
3. Detector Selectivo de Masas 5971 series HP. Condiciones normales de trabajo modo scan, solvent delay = 3, clibración previa con PFTBA, modo autotune standar.

File : C:\HPCHEM\1\DATA\SIAPA5.D
Operator : Q.F.B. ALMA L. VELAZQUEZ G.
Acquired : 11 Nov 99 7:59 pm using AcqMethod UDG
Instrument : CROMATOGR
Sample Name: MUESTRA DE TORTILLA
Misc Info : INYECCION DIRECTA 0.5µl HP-5 30 MTS 11/11/9
Vial Number: 1



File : C:\HPCHEM\1\DATA\SIAPA5.D
Operator : Q.F.B. ALMA L. VELAZQUEZ G.
Acquired : 11 Nov 99 7:59 pm using AcqMethod UDG
Instrument : CROMATOGR
Sample Name: MUESTRA DE TORTILLA
Misc Info : INYECCION DIRECTA 0.5µl HP-5 30 MTS 11/11/9
Vial Number: 1



ANEXO 2

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Debido a la alta variabilidad en el contenido de fumonisinas del maíz respecto a sus productos derivados se aplicó la prueba de homogeneidad de las varianzas encontrándose que éstas no fueron homogéneas, mediante la prueba de Bartlett. Para realizar adecuadamente las comparaciones entre molinos y entre productos, se utilizó una transformación logarítmica (decimal), mediante la cual se homogeneizaron las varianzas y fue factible aplicar el análisis de varianza, que se presenta en el siguiente cuadro.

Con los datos transformados a logaritmo decimal, se aplicó un análisis de varianza factorial considerando tratamientos como la combinación de productos (maíz, nixtamal, masa y tortilla) y molinos. Se analizó también individualmente como un factor a los molinos, como otro factor a los productos y la interacción entre ambos.

**Análisis de Varianza
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

El análisis de varianza se basa en una partición de la variabilidad de las observaciones en diferentes fuentes (y factores) de variación. En el caso del trabajo que se está analizando el término "Fuente" indica fuente de variación. Grados de libertad, se puede interpretar como la cantidad máxima de comparaciones que pueden realizarse entre un tratamiento o factor contra otros. Suma de cuadrados, es la variabilidad asociada a cada media de tratamiento (o factor) comparada con la media general. Cuadrados Medios, es la división de las sumas de cuadrados por los grados de libertad. F calculada, es la razón que se obtiene al dividir los cuadrados medios entre los cuadrados medios del error experimental lo cual nos indica un valor de F calculada para compararla con los valores de F de tablas. $F_c > F_t$ se rechaza la hipótesis nula, la cual indica igualdad entre medias de tratamientos o factores. F tablas, valor de las Tablas tomado de la distribución de F (n-1) grados de libertad y de probabilidad α .

Hipótesis que se prueban:

Hipótesis nula H_0 : Igualdad entre tratamientos o entre factores.

Hipótesis alternativa H_a : Al menos un tratamiento o un factor es diferente a los demás.

Tabla de Contrastes Ortogonales

Maíz	Nixt.	Masa	Tortilla	Zw	Zw ²	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
- Z_w : Valor de la diferencia detectada en la comparación descrita (para el primer caso se compara el contenido de maíz, contra los otros productos)
- Z_w^2 : Diferencia elevada al cuadrado
- D_w : Número por el cual se debe dividir la diferencia al cuadrado
- $\frac{Z_w^2}{D_w}$: Suma de cuadrado de la comparación
- F_c : Valor de F calculado que se debe comparar con el de Tablas para aceptar o rechazar la hipótesis nula.