



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

"CUANTIFICACIÓN DE FUMONISINA B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>) EN MAÍZ DE VALOR ACRECENTADO, A TRAVÉS DE CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN (CLAR)"

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO DE ALIMENTOS

PRESENTA

MIGUEL MAGALLANES CASTILLO

MEXICO, D.F.

AÑO 2002



EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUÍMICA  
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**JURADO ASIGNADO:**

**Presidente**

Prof. Ernestina Cervera Flores

**Vocal**

Prof. Francisca Iturbe Chinas

**Secretario**

Prof. Hilda Elizabeth Calderón Villagómez

**1er. Suplente**

Prof. Inés Miranda Martínez

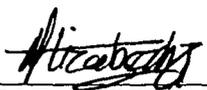
**2do. Suplente**

Prof. Alfredo Salazar Zazueta

*Sitio donde se desarrolló el tema:*

Laboratorio 201 de Tecnologías más limpias, Edificio "B", Laboratorio 301 del PIQAYQA, Edificio "E", Laboratorio 4-A de Tecnología de Alimentos, Edificio "A", Facultad de Química, UNAM.

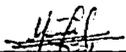
Asesor del Tema

  
M. en C. HILDA E. CALDERÓN VILLAGÓMEZ

Supervisor Técnico

  
Dra. MARTHA P. GARCÍA CAMACHO

Sustentante

  
MIGUEL MAGALLANES CASTILLO

## **AGRADECIMIENTOS**

**A la Universidad Nacional Autónoma de México**, especialmente a la **Facultad de Química**: por permitirme conocer, ser y descubrir un mundo de conocimiento.

**A la M. en C. Hilda Calderón Villagómez**: por toda su confianza, apoyo, fé y dedicación, sin las cuales no hubiese sido posible la culminación de la presente.

**A la Dra. Carmen Durán de Bazúa**: por las facilidades otorgadas y por la infraestructura física de los laboratorios 201 de Tecnologías Limpias y 301 del conjunto E.

**Al Dr. Daniel P. Jeffers y al Ing. Locadio Martínez**: por las facilidades en la adquisición de las muestras de maíz y sobre todo, por la valiosa información que nos proporcionaron.

**A la Dra. Martha Patricia García Camacho** por sus valiosos comentarios.....

**A la M. en C. Marisela Bernal**: por toda la supervisión, manejo y apoyo en la parte técnica del Cromatógrafo de Líquidos.

**A la M. en C. Idalia Flores**: por su valiosa asesoría en la parte estadística y de manejo de datos.

**Al proyecto PAPIME claves RE201998, 172019** : para la compra de reactivos

## **DEDICATORIAS**

**A mis queridos padres Antonia y Miguel:** por su amor, confianza, esfuerzo y sobre todo apoyo en los momentos más difíciles. Los quiero mucho.

**A mis hermanos Joel, Norma y Elena:** por sus consejos, apoyo, comprensión y, particularmente a Norma por ese toque de tenacidad, empuje y compañerismo tan único. ¡ Gracias !.

**A "Bebeto":** un ser tan enigmático que me hizo reflexionar mucho sobre andanzas en mi cotidiana vida. ¡ Que Dios te bendiga !.

**A todos mis compañeros de la carrera:** especialmente al grupo 15 SADAPI y de manera particular a mis amigas "las Flores" (Alejandra, Carmen y Maru) y a Vanessa Cabra por haber sido un sólido grupo en su momento.

A todas aquellas personas que contribuyeron directa e indirectamente en la culminación de este trabajo.

**Piensa en mí**  
(*R. Blades*)

Si tu ilusión se hizo pedazos  
por el inevitable abrazo de una adversidad,  
si la ansiedad ante un fracaso  
te hace sentir que ya no hay caso para continuar.  
Cuando te falte la confianza  
o cuando pierdas la esperanza que te hizo tratar  
recuerda que eso es pasajero  
pero mi amor es verdadero y no se marchará.

Piensa en mí.

Quando te ahogue la amargura  
cuando te domine la duda y pierdas la paz,  
cuando parezca que no hay cura para el dolor que te tortura  
no olvides jamás,  
que en este mundo todo cuesta  
y aunque paguemos nuestra deuda con llanto y dolor  
el que no busca nada encuentra  
y sólo ganan los que apuestan a su corazón.  
No habrá muralla que nos pueda detener  
ni habrá tristeza que nos pueda desolar,  
por muy amargo que haya sido nuestro ayer  
siempre hay futuro para la felicidad.  
Nunca es demasiado tarde para ser feliz.  
Piensa en mí.

# INDICE

	PAGINA
<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>I.- INTRODUCCIÓN</b>	<b>3</b>
<b>II.- ANTECEDENTES</b>	<b>5</b>
2.1 Biología de <i>Fusarium</i>	5
2.2 Características microscópicas	6
2.3 Distribución de <i>F. Moniliforme</i>	6
2.3.1 Colonización del maíz en el campo	7
2.3.2 Colonización del maíz durante el almacenamiento	9
2.4 Producción de toxinas	10
2.5 Registro toxicológico	15
2.6 Producción y usos de la toxina	15
2.7 Generalidades del maíz	16
2.7.1 Importancia del maíz en México	17
2.7.2 Producción del maíz en México	18
2.8 Antecedentes en los análisis de fumonisinas	20
2.9 Generalidades de Cromatografía	22
2.10 Espectros de Masas	26
<b>III.- OBJETIVOS</b>	<b>29</b>
<b>IV.- MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>30</b>
4.1 Materiales	30
4.2 Métodos	33
<b>V.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>39</b>
5.1 Resultados de la clasificación del % de daños	39
5.2 Resultados del Análisis Químico Proximal (AQP)	43
5.3 Análisis Estadístico del AQP	47
5.4 Análisis de los Espectros de Masas	59
5.5 Análisis de los Cromatogramas	62
<b>VI.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b>	<b>65</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>68</b>
Anexo 1 Gráficas	69
Anexo 2 Tratamiento del maíz en campo	75
Anexo 3 Técnicas de Análisis del AQP	78
Anexo 4 Cromatogramas	82
<b>VII.- BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>85</b>

## **INDICE DE TABLAS**

	PAGINA
1) Caracterización física del % de daños en el maíz	41
2) Análisis Químico Proximal y Contenido de FB <sub>1</sub> en muestras	45
3) Concentraciones, Áreas y Tiempos de Retención de la Curva de Calibración	58
4) Datos Meteorológicos	76

## **INDICE DE FIGURAS**

	PAGINA
1) Estructura Química de la FB <sub>1</sub>	14
2) Reacción de la FB <sub>1</sub> con Reactivo OPA	26
3) Curva de Calibración	57
4) Espectro de masas de la matriz	59
5) Espectro de masas de la FB <sub>1</sub>	60
6) Espectro de masas de la muestra Amarillo 47	61
7) Espectro de masas de la muestra Blanco 10	61
8) Cromatograma del estándar FB <sub>1</sub> (2 ppm)	62
9) Cromatograma de la muestra Amarillo 47	63
10) Cromatograma de la muestra Blanco 10	63

## **RESUMEN**

Las fumonisinas son un grupo de micotoxinas constituidas por una cadena lineal hidrocarbonada con grupos alcohol y amino, químicamente son diésteres del ácido tricarbálico-1,2,3-propano y del 2-amino-12,16-dimetilpolihidroxicosano. De los siete análogos que han sido identificados, en sólo tres de ellos se ha reportado su incidencia y son consideradas de mayor importancia debido a los daños que ocasionan al contaminar los granos de diversos cereales y por las enfermedades que provocan en humanos y en animales, estos son: fumonisina B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>), fumonisina B<sub>2</sub> (FB<sub>2</sub>) y la fumonisina B<sub>3</sub> (FB<sub>3</sub>). El nombre químico de la Fumonisina B<sub>1</sub> es: Ácido 1,2,3-propanotricarboxílico,1,1'-(1-(12-amino-4,9,11-trihidroxi-2-metiltridecil)-2-(1-metilpentil)-1,2-etanodiol)éster.

Este grupo de toxinas es producido principalmente por hongos del género *Fusarium*, el cual está distribuido en todo el mundo en las zonas tropicales con climas preferentemente cálidos.

La FB<sub>1</sub> es hepatotóxica y hepatocarcinogénica en ratas, promueve leucoencefalomalacia en ganado equino, produce edema pulmonar en cerdos y ha sido asociada con una alta incidencia de cáncer de esófago en humanos, particularmente en Sudáfrica y en la República Popular China.

La finalidad de la presente investigación fue la de identificar y cuantificar los niveles de FB<sub>1</sub> en muestras de maíz comercial expandidas en el Valle de México y en muestras de maíz blanco y amarillo de valor acrecentado, conocidas también como QPM por sus siglas en inglés (Quality Protein Maize), con resistencia a *F. moniliforme*.

En las muestras de maíz amarillo se observó que los mayores daños se presentaron por hongos con un intervalo de 2.4 % a 14 %. En el análisis químico proximal todas las muestras cubren con las especificaciones requeridas y en lo que respecta a FB<sub>1</sub> el contenido varió desde 0.19 ppm hasta 33.70 ppm. En las muestras de maíz blanco se observó que la mayor proporción de daños, es en daño por hongos con un mínimo de 2.3 % y un máximo de 11.3 %; en el análisis químico proximal todas las muestras cumplieron con las especificaciones requeridas y del contenido de FB<sub>1</sub> ha de mencionarse un intervalo de valores de 0.66 a 38.59 ppm. En las muestras testigo se observó que el maíz azul exhibe porcentajes de daños bajos en color, insectos y granos chupados y no presentó problemas por daños por hongos; su análisis proximal no cumple la especificación mínima para % de proteína y por lo que toca a la concentración de FB<sub>1</sub> no se detectó en esta muestra; el maíz amarillo de Sinaloa presenta daños en color y grano quebrado, cumple con todas las especificaciones fisicoquímicas y en esta muestra tampoco se detectó FB<sub>1</sub> y, finalmente, el maíz blanco de Toluca, presentó sus mayores porcentajes de daños físicos en color y grano quebrado, cumplió con todos los requerimientos fisicoquímicos establecidos y fue la única muestra testigo que presentó contenido de FB<sub>1</sub> con un valor de 15.80 ppm.

## I. INTRODUCCION

Las fumonisinas han sido identificadas recientemente como un grupo de micotoxinas que contaminan naturalmente al maíz y otros cereales y leguminosas. Su importancia radica en que se les han asociado con diversos trastornos y enfermedades múltiples en animales.

El efecto de las fumonisinas en humanos ha sido difícil de establecer, pero diversos estudios epidemiológicos demuestran que en ciertas áreas de Sudáfrica y China se han presentado elevados índices de cáncer esofágico, los cuales son cuarenta veces mayores que en el resto del mundo.

Para su identificación y cuantificación se han desarrollado diversos métodos analíticos, que incluyen la cromatografía en capa fina, cromatografía de líquidos y más recientemente cromatografía de líquidos acoplada a la espectrometría de masas, que ofrece la mejor sensibilidad de esta serie de métodos y la ventaja principal de, a la vez, cuantificar, identificar y corroborar la estructura de los compuestos que se estén analizando.

El tratamiento alcalino con hidróxido de calcio  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  así como la aplicación de calor húmedo, reducen los niveles de fumonisinas, pero se producen las formas hidrolizadas de la toxina, originándose un producto que no pierde la toxicidad de la molécula original.

Actualmente las estrategias para combatir y reducir la incidencia y brotes de esta toxina, incluyen la competencia microbiana a nivel de campo contra otras bacterias

## I. - INTRODUCCIÓN

productoras de toxinas, así como el uso de radiación ultravioleta en el grano de maíz entero y en alimentos procesados.

Es preciso acotar que en nuestro país no existe una Norma Oficial respecto al control de fumonisinas, ni se ha establecido un método oficial para la detección y cuantificación de las mismas, por lo que el método aquí empleado (OPA) propio de la cromatografía de líquidos, puede proveer las bases para el monitoreo, detección y un futuro establecimiento como método oficial para la cuantificación de esta toxina.

## **II. ANTECEDENTES**

### **2.1 Biología de Fusarium**

*Fusarium spp.* es uno de los principales grupos de hongos que producen micotoxinas, agrupado dentro de la subdivisión *Deuteromycotina*.

La clasificación taxonómica de este género es la siguiente:

División: *Eumycota*.

Orden: *Moniliales*.

Subdivisión: *Deuteromycotina*. Familia: *Tuberculareacea*.

Clase: *Hyphomycetes*

Sin embargo su compleja taxonomía obligó a dividir este género en doce secciones, de acuerdo a Wollenweber & Reinking:

*Eupinnotes*, *Spicarioides*, *Arachnites*, *Sporitrichiella*, *Roseum*, *Arthrosporiella*, *Gibbosum*, *Discolor*, *Lateritium*, *Liseola*, *Elegans*, *Martiella-Ventricosum*

(Nelson , *et al*; 1983).

Los criterios usados para efectuar esta división fueron:

Presencia o ausencia de microconidios, la forma de los microconidios, la presencia o ausencia de clamidosporas, su localización, la forma de los macroconidios y la forma de la célula basal de los macroconidios.

Las principales especies caracterizadas por ser patógenas y toxigénicas en animales, plantas o humanos se concentran en cuatro secciones, las cuales son:

*Sporotrichiella*, *Gibbosum*, *Discolor* y *Liseola*.

La sección *Liseola*, que comprende las especies *F. moniliforme*, *F. proliferatum* y *F. subglutinans*, es utilizada para separar especies de un género amplio en unidades más pequeñas con características similares, distinguiéndose por la

morfología y modo de formación de los microconidios y en particular porque no forman clamidosporas.

La especie representativa y más importante en esta sección es *F. moniliforme*, cuyas características microscópicas son las siguientes:

### **2.2 Características microscópicas**

Algunas de las características microscópicas son:

Conidios.- abundantes y por lo general son células solas, ovales o con forma de bastón; los macroconidios son escasos y forman cadenas largas y falsas cabezas.

Conidióforos.- se presentan solamente monofialides.

Clamidosporas.- ausentes.

(Nelson, *ob cit*; 1983).

### **2.3 Distribución de *F. moniliforme***

*F. moniliforme* es un hongo distribuido ampliamente en todo el mundo y ha sido aislado de una gran variedad de plantas hospederas como sorgo, caña de azúcar, trigo, arroz, cebada e higo.

Está predominantemente asociado al maíz (*Zea mays L.*) y se ha aislado con frecuencia de semillas y de productos de consumo básico para el hombre y animales. Su incidencia es mayor en climas tropicales y subtropicales.

La presencia de este hongo en el hombre y animales se asoció a enfermedades de etiología alimentaria desde que fue descrito originalmente en 1904. A principios del siglo XX se relacionó con la incidencia de enfermedades de animales que ingirieron maíz enmohecido en los Estados Unidos de Norteamérica, en los cuales las pezuñas del ganado vacuno y los cascos de los caballos se desprendían, los cerdos perdían pelo, los pollos perdían plumas y algunos animales desarrollaban

convulsiones y, en general, un alto porcentaje de los animales infectados moría; en tales casos *F. moniliforme* fue el hongo comúnmente asociado a esas toxicosis alimentarias (Nelson, *et al*; 1993).

Desde 1934 en la región noreste de los E.U. murieron más de cinco mil caballos a causa de consumo de maíz enmohecido. En 1960 en la Gran Bretaña se presentó un brote de pavos enfermos a consecuencia de consumo de cacahuates importados de Brasil. Durante 1992 se reportó que el maíz importado de E.U. y de Argentina a cargo del gobierno de Sudáfrica, estaba contaminado con FB<sub>1</sub>, a través de análisis posteriores del maíz, presentando el maíz argentino niveles de 0.31 ppm, mientras que el estadounidense presentó 2.35 ppm.

Así mismo se ha reportado alta incidencia de *F. moniliforme* en maíz cultivado en Venezuela, en Colombia y en Costa Rica ( Bullerman; 1998).

Por lo que a México respecta existe un estudio de la Universidad Autónoma de Nuevo León, en 1994 a cargo del doctor Hugo Luna Olvera, en el cual reportan maíz contaminado con *F. moniliforme* en los municipios de Apodaca y Cadereyta encontrando niveles hasta mil doscientas veces lo permisible (Santamaría; 1994). También en México, en el año de 1997 el doctor René Rosiles y colaboradores, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, estudiaron un brote de leucoencefalomalacia equina en burros de diversos municipios del estado de Oaxaca, asociado a la FB<sub>1</sub> (Rosiles, *et al*; 1998).

### **2.3.1 Colonización del maíz en el campo**

*F. moniliforme* es capaz de colonizar maíz en todos los estados de desarrollo y en distintos órganos tales como el tallo, la raíz, las mazorcas y los granos. En muchos casos, aunque está presente, no es visible al no causar daños aparentes. La

infección asintomática puede existir en toda la planta y ser transmitida por las semillas, desarrollando una infección sistémica (Munkvold y Desjardins; 1997).

El ciclo de infección de *F. moniliforme* en maíz es complejo y las vías de infección son diversas. *F. moniliforme* es un saprófito que puede sobrevivir en restos de cultivo de maíz infectados, de esta manera, en el suelo puede infectar la raíz y el tallo de las plantas y, en general, su entrada es favorecida por daño mecánico o daños por insectos. Las vías más comunes de infección son mazorcas y granos, donde también causa pudrición en tejido. En las mazorcas la infección por otros hongos, el daño mecánico o por insectos, puede predisponer la entrada de *F. moniliforme*. La infección en el tejido dañado a menudo ocurre debido a la transmisión del hongo por aire o por lluvia (Munkvold y Desjardins, *ob cit*; 1997).

Los caminos por los cuales *F. moniliforme* puede infectar a los granos de maíz son:

- a) Durante la floración.- allí las mazorcas de maíz son más susceptibles a la infección por *F. moniliforme*, el hongo parece entrar por el pistilo, crecer sobre el pericarpio y por tanto en el grano.
- b) A través de las hifas.- quienes penetran a través de fisuras en la superficie del pericarpio y por ende crecen en el interior del grano.
- c) Las hifas.- pueden entrar por el grano en puntos donde emerge la plántula y así el micelio puede crecer por este camino y tener acceso directo al tejido del embrión.

### 2.3.2 Colonización del maíz durante el almacenamiento

En las semillas infectadas que son almacenadas bajo ciertas condiciones puede continuar el crecimiento del hongo. La temperatura y la actividad del agua ( $a_w$ ) son dos factores esenciales en la colonización por hongos en el almacenamiento de los granos. En el caso de *F. moniliforme*, las condiciones óptimas de crecimiento fueron:  $a_w$  de 0.98 a 0.994 y 25°C a 30°C, en tanto que *F. proliferatum* fueron  $a_w$  de 0.994 y de 25°C a 30°C. El intervalo mínimo de crecimiento se encontró en  $a_w$  de 0.89 a 0.90 en la temperatura óptima, no observando crecimiento en 40°C a 45°C. El valor óptimo de pH y temperatura para el crecimiento fue a pH de 5.5 y 25°C para *F. proliferatum* y un pH de 7.0 y 30°C para *F. moniliforme*. Hay que señalar que en estas condiciones óptimas ocurre también la germinación de los microconidios (Marín, *et al*; 1995).

Otros estudios han mostrado que ambas especies de *Fusarium* son capaces de colonizar granos de maíz viables en amplios intervalos de  $a_w$  y producir varias enzimas hidrolíticas; de ellas la  $\alpha$ -D-galactosidasa,  $\beta$ -D-glucosidasa y la N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa, fueron las enzimas predominantes; se sugiere, además, que la producción y cuantificación de las mismas pueden ser indicadores importantes de la colonización de *F. moniliforme* y *F. proliferatum* en el maíz, ya que aumentan durante esta. Ambas especies de *Fusarium* son dos importantes colonizadores del maíz y se han aislado tanto antes como después de la cosecha, así como durante el almacenamiento. Para establecerse habrán de competir efectivamente contra otros colonizadores, tales como ciertas especies del género *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. niger* y *A. ochraceus*) y *Penicillium* (*P. implicatum*).

En  $a_w$  de 0.93 a 0.95 y con temperatura de 15°C hay una inhibición mutua por parte de ambas especies de *Fusarium*, al encontrarse colonizado por *A. niger*, *A. ochraceus*, *A. flavus* y *P. implicatum*. En  $a_w$  de 0.98 y 25°C ambas especies de *Fusarium* inhiben el crecimiento de *A. ochraceus* y *P. implicatum*, pero a cambio, son dominados en las mismas condiciones por *A. flavus* y por *A. niger*, observando una reducción tanto de crecimiento como del porcentaje de infección de granos de maíz, alcanzando disminuciones del 45 y 30% respectivamente tras dos semanas, y de casi un 80% tras cuatro semanas en ambas especies (Marin, *et al*; 1998).

#### **2.4 Producción de toxinas**

Las micotoxinas son metabolitos fúngicos que son tóxicos al ser consumidos por animales y desde luego por humanos. Estas pueden acumularse en general en cereales, en leguminosas y en otros alimentos cultivados en el campo, así mismo en los granos durante su transporte.

Las cepas de *F. moniliforme* producen varias toxinas y compuestos con acción fitohormonal, entre los que destacan el ácido fusárico, fusarinas, giberelinas, moniliformina, zearalenona, tricotecenos y fumonisinas.

##### ▪ **Ácido Fusárico**

Es el ácido 5-n-butilpiridina-2-carboxílico, el cual es producido en grandes cantidades y ha sido aislado a partir de tejidos de plantas infectadas. La aplicación de este ácido en las plantas induce un aumento en la pérdida de agua y el paso de solutos, a consecuencia del daño en las membranas celulares. Esta toxina tiene actividad de quelante de metales pesados, especialmente el hierro, resultando en

una inhibición de enzimas como la porfirina-oxidasa. El resultado final es la disminución de la respiración de la planta.

▪ *Fusarinas*

En 1983 se mostró que las cepas de *F. moniliforme*, aisladas a partir de maíz de la provincia de Transkei en Sudáfrica, producían compuestos mutagénicos en el ensayo de Salmonella, de los cuales el principal compuesto mutagénico purificado fue identificado como fusarina. Estas toxinas pueden causar una serie de trastornos entre los cuales figuran la pudrición de mazorca en el maíz y pudrición con formación de costras en el trigo, los cuales afectan el crecimiento y la producción de las cosechas, llegando a estimar pérdidas del orden de los billones de dólares. La fusarina también es conocida como micotoxina T2, la cual puede producir por contacto directo inflamaciones extensivas y necrosis de tejidos, así como la exposición tópica ha llevado a toxicidad sistémica y a la muerte en los animales utilizados en experimentos. Esta toxina es considerada en la literatura de guerra nuclear, biológica y química, como agente de guerra biológica (Bacon & Williamson; 1992).

▪ *Giberelinas*

Caracterizadas originalmente como promotores de crecimiento en las plantas, se sabe que pueden aumentar el crecimiento de *F. moniliforme*, el cual podría influir indirectamente en la patogenicidad; se ha propuesto, además, que este regulador de crecimiento puede controlar la producción de toxinas al incrementar la biomasa fúngica.

▪ *Moniliformina*

Es la 1-hidrox ciclobut-1-eno-3,4-diona, y solamente es producida por un pequeño porcentaje de cepas o, incluso, *F. moniliforme* no llega a producirla. Es un compuesto altamente tóxico que causa una muerte rápida y lesiones patológicas que incluyen degeneración del miocardio y necrosis en animales de experimentación.

▪ *Zearalenona*

Es una lactona del ácido fenílico resorcílico, producida por cepas de *F. moniliforme*, *F. graminearum* y *F. equiseti*. Se encuentra principalmente en maíz y trigo y es posible encontrarla en cebada y piensos. Su importancia radica en los múltiples efectos que promueve en diversos animales a nivel hormonal, glandular y en el aparato reproductor de hembras y machos.

▪ *Tricotecenos*

Son un grupo de micotoxinas producidas por una amplia variedad de diferentes especies de *Fusarium* y son las de mayor diversidad estructural. Químicamente son sesquiterpenos tricíclicos con un sistema de anillo básico 12, 13-epoxi-tricotec-9-eno. A estas micotoxinas se les subdivide en cuatro subclases:

Tipo 1 que poseen otro grupo funcional diferente a la cetona en la posición C-8;

Tipo 2 que posee una cetona en la posición C-8; Tipo 3 que presentan un segundo grupo epoxi en las posiciones C-7, 8 o C-9, 10 y, finalmente el Tipo 4 que contiene un anillo macrocíclico entre las posiciones C-4 y C-5 con dos ésteres de unión.

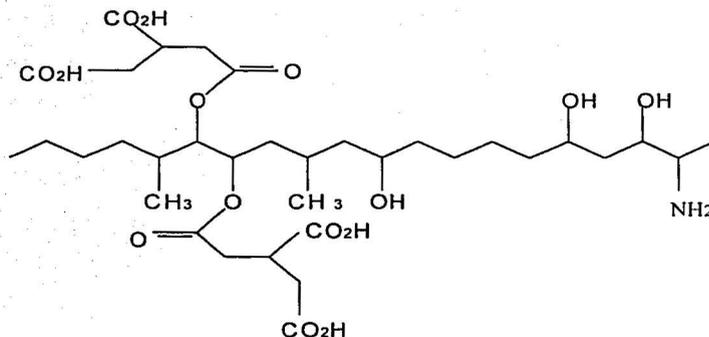
Debe señalarse que un gran número de tricotecenos son producidos en mezclas por *Fusarium spp.*, lo cual origina una identificación difícil de la toxina. Estas toxinas son inmunotóxicas y potentes inhibidores de la síntesis de proteínas, lo cual predispone a los animales a otras enfermedades, enmascarando otras toxicosis; los porcinos y otros animales monogástricos, incluyendo al hombre, son más susceptibles a estas toxinas (Bullerman; 1998).

▪ *Deoxinivalenol*

Es un tricoteceno producido principalmente por *F. moniliforme*, conocido también como vomitoxina, debido a los efectos de rechazo al alimento contaminado y vómito que se induce. Se ha asociado a brotes de micotoxicosis en humanos caracterizado por anorexia, náusea, vómito, cefalea, dolor abdominal, diarrea, escalofríos y convulsiones.

▪ *Fumonisinias*

Estas toxinas fueron reportadas y caracterizadas por primera vez por un grupo de investigadores en Sudáfrica en 1988, y de manera independiente por otro grupo de investigación en Nueva Caledonia; presenta una estructura de un monoéster del ácido propano-1,2,3-tricarboxílico y del 2,4,5,13,14-penta-hidroxi-heptadecano (Figura 1).



**Figura 1. Estructura química de la FUMONISINA B<sub>1</sub>**  
(Kellerman, *et al*; 1990)

$C_{34} H_{59} N O_{15}$ ; 721 g / mol.

**Nombre químico**

Ácido 1, 2, 3- propanotricarboxílico, 1, 1'- (1- (12-amino-4, 9, 11- trihidroxi-2- metiltridecil)-2-(1-metilpentil)-1, 2 -etanodil) éster.

**Propiedades físicas y químicas**

*Punto de Ebullición:* No hay datos establecidos.

*Punto de Fusión:* No hay datos establecidos.

*Densidad / Gravedad específica:* No hay datos establecidos.

*Índice de Refracción:* No existen datos establecidos.

*Solubilidad en Agua:* FB<sub>1</sub> ha sido disuelta en agua y en solución salina con 5% de etanol (Kellerman, *ob cit*; 1990) para evaluaciones toxicológicas.

*Solubilidad en otros solventes:* FB<sub>1</sub> ha sido disuelta en metanol y en acetonitrilo (Gelderblom, *et al*; 1991), para evaluaciones toxicológicas.

**Reactividad química:** FB<sub>1</sub> es inestable en metanol cuando se almacena por largos periodos (Wilson, *et al*; 1991).

**Riesgos de inflamabilidad:** No existen datos establecidos.

### **2.5 Registro toxicológico**

Las fumonisinas fueron registradas por la Administración de Fármacos y Alimentos, *Food Drugs Administration* FDA, de los Estados Unidos de Norteamérica en septiembre de 1991. Dicho registro estuvo basado en los efectos potenciales y adversos de dichas toxinas en humanos al consumir productos de maíz contaminados o bien, animales que han sido expuestos a las toxinas.

La FDA descubrió que las fumonisinas son micotoxinas producidas por ciertas especies del género *Fusarium moniliforme*, el cual es un hongo que comúnmente se presenta en el maíz y otros productos agrícolas, además de estar asociado con Leucoencefalomalacia equina (LEMA), Edema pulmonar porcino (EPP) y Cáncer de esófago en humanos. (Osweiler, *et al*; 1993).

### **2.6 Producción y usos.**

Las fumonisinas no son producidas comercialmente, estas micotoxinas son aisladas y purificadas del hongo *F. moniliforme*, por diversos laboratorios para propósitos de investigación, con unos intervalos de pureza del 90 al 98 % (Pittet, *et al*; 1992).

También son toxinas que pueden estar de manera natural como contaminantes de los alimentos y que pueden ser ingeridos por consumidores en los productos de maíz y sus derivados; sin embargo aunado a ese tipo de exposición, los consumidores pueden estar expuestos indirectamente a la toxina mediante el consumo de animales que han ingerido alimentos contaminados. En muchos

casos la FB<sub>1</sub> ha sido encontrada en altos niveles en el maíz y otros alimentos contaminados con *F. moniliforme* obtenidos de áreas con elevada incidencia de cáncer de esófago y brotes de LEMA y EPP.

En cuanto a los efectos toxicológicos en humanos no han sido encontrados datos de efectos plenamente establecidos, sin embargo diversos reportes indican que la ingestión de granos contaminados con FB<sub>1</sub> por humanos está estrechamente relacionado con una muy elevada incidencia de cáncer de esófago.

Se cree que la exposición con fumonisinas también puede causar lesiones pancreáticas en cerdos y hepatotoxicidad y se encontró que inhibe la biosíntesis de esfingolípidos en ratas y se ha asociado a un trastorno peritoneal en pollos. No se ha encontrado una disposición química, reproductiva o de efectos teratogénicos en animales (Sydenham, *et al*, 1992).

### **2.7 Generalidades del maíz**

El maíz (*Zea mays* L.) es una planta de la familia de las gramíneas y es la más conocida y de mayor importancia económica en México y en muchos otros países del mundo. Aunque es originaria de las regiones tropicales de América, está muy difundida en todo el mundo, ocupando el Tercer Lugar en la producción mundial, detrás del trigo y del arroz. Esta planta tiene importancia en la alimentación animal tanto por su forraje como por sus granos enteros, molidos o quebrados, los cuales son sumamente nutritivos. El maíz desempeña un papel importante en la industria ya que se procesa un gran número de productos y subproductos tales como aceite, almidón, explosivos, plásticos, jabón, glicerina, emulsiones, productos medicinales y productos farmacéuticos, sin dejar atrás los múltiples productos alimenticios (INEGI, IX Censo Agrícola-Ganadero; 2001).

El grano de maíz está compuesto por cuatro partes principales las cuales son: cáscara o salvado (pericarpio y cubierta de la semilla), germen, endospermo y pedículo. El grano de maíz es de color muy variable, presentando tonalidades uniformes o variadas y abarca desde el blanco al pardo oscuro o púrpura, siendo los colores más comunes el blanco y el amarillo. El salvado constituye 5-6% del grano, el germen es relativamente grande con un 10-14% del grano y el resto corresponde al endospermo. Sus proteínas se localizan en el endospermo en forma de cuerpos proteicos discretos además de una matriz proteica. Los cuerpos proteicos están compuestos fundamentalmente por una prolamina llamada zeína; el endospermo contiene alrededor del 5% de albúminas y globulinas, 44% de zeína y alrededor del 20% de glutelinas (Hoseney; 1988).

El maíz representa en muchos países, como el nuestro, el principal alimento para gran parte de la población, sobre todo la de escasos recursos económicos, siendo consumido en formas muy variadas tales como tortillas, tamales, atole, pinole, etc. Sin embargo, y al igual que otros cereales, es rico en carbohidratos pero deficiente en proteínas, tanto en calidad como en cantidad. En el ámbito mundial, el cultivo de maíz se eleva a 134.2 millones de hectáreas (ha), lo que aporta una cosecha de 559.3 millones de toneladas/año. Los principales productores son Estados Unidos, China, Brasil, Argentina, Sudáfrica y Europa.

### ***2.7.1 Importancia del maíz en México***

En lo que respecta a México, el maíz representa más de la mitad del volumen total de alimentos que se consumen en el país, ya que aproximadamente son 14 millones de toneladas las destinadas a consumo humano.

La mayor proporción del mismo (62.7%) se destina al consumo directo y no entra a los canales de comercialización e industrialización, sin embargo, la transformación industrial del grano es relevante y, en general, puede clasificarse en tres grupos:

1. Tortillas, masa y harina nixtamalizada (cerca de 10.5 millones de toneladas de maíz se consumen en forma de tortillas), estos productos concentran la mayor proporción del maíz industrializado y prioritario para la alimentación nacional.
2. Derivados (almidones, féculas, levaduras, glucosa, dextrinas, etc.) empleados principalmente como insumos de la industria química, farmacéutica, papelera, cervecera y alimentaria.
3. Productos preparados como hojuelas para desayunos y frituras de maíz.

(INEGI, *ob cit*; 2001).

### **2.7.2 Producción de maíz en México**

De los 31.3 millones de ha disponibles para producción agrícola del país, de los cuales 26.6% es de riego y un 73.4% es de temporal, cerca de 15 millones de ha se destinan al cultivo de cereales como maíz, trigo, sorgo y cebada y, alrededor de 2 millones de ha se destinan al cultivo de frutas y vegetales. Hacia 1998 en los ciclos Primavera-Verano (P-V) y Otoño-Invierno (O-I), se destinaron 9.3 millones de ha para cultivo de maíz. El 80% de la producción se recolecta en el primer ciclo, que en su mayoría es de temporal, mientras que en el segundo ciclo el 80% de los cultivos son irrigados de manera artificial. En la producción nacional destacan los estados de Chiapas, Jalisco, Veracruz, Tamaulipas, Sinaloa y Michoacán.

## II. - ANTECEDENTES

La producción anual por ambos ciclos es de 16.5 a 19 millones de toneladas, en su mayoría el maíz producido en México es de variedad blanca y el de importación es de variedad amarilla.

De tal producción hay que considerar además las pérdidas producidas debido a la falta de controles de calidad durante el almacenamiento. Se han reportado casos de contaminación del maíz con micotoxinas en Tamaulipas, Baja California Sur, Sonora, Veracruz y Sinaloa, sin embargo, la distribución geográfica de la contaminación por micotoxinas no se ha establecido en nuestro país.

Los daños causados por plagas son enormes, ya que alrededor del 7 y hasta un 20% del total de la cosecha de maíz, son mermas, lo que equivaldría a 40 toneladas perdidas /año (INEGI, *ob cit*; 2001).

Desde la década de los 60s. era buscada una fuente natural que mejorara la calidad proteínica del maíz y surge, a la postre, un grupo de maíces mutantes que se denominaría "Opaco-2", cuyo contenido de Lisina fue 3.4% de la proteína del endospermo (más del 70% que un maíz normal), mientras que el contenido de Triptofano se duplicó.

Ya para la década de los 80s. se formó un maíz opaco modificado o bien denominado Maíz de Calidad Proteínica (MCP) que superó algunas deficiencias del opaco original, tales como un endospermo cristalino y una mejora en los rendimientos agronómicos.

Las muestras de maíz empleadas en la presente investigación, provienen de la formación de nuevos maíces mejorados apropiados para diferentes usos industriales cuyas características principales son:

1. Líneas y Poblaciones de maíces con porcentajes de Lisina y Triptofano en su endospermo de 0.44% y de 0.111% respectivamente, lo cual representa más del doble de los contenidos de estos aminoácidos respecto a un maíz normal.
2. Ligera reducción de la Calidad Proteínica.
3. Rendimientos tortilleros de entre 1.5 a 1.6 kg / kg de maíz; siguiendo el proceso de nixtamalización, un maíz normal proporciona de 1.4 a 1.5 kg / kg de maíz.
4. Al evaluar la calidad de la proteína, se estudió un grupo de ratas con el grano sin tratar, tanto con tortillas de maíz normal como MCP, mostrando mejores valores de ganancia de peso y de Relación de Eficiencia de la Proteína (PER) para los casos de MCP.

Se estima por ello que el consumo de estos maíces producirá un elevado y relevante impacto en el nivel nutrimental de los mexicanos.

### ***2.8 Antecedentes en los análisis de las fumonisinas***

Existen una serie de métodos desarrollados para la determinación de esta toxina en el maíz y productos derivados, de entre los cuales destacan: cromatografía de gases, cromatografía de líquidos, cromatografía de capa fina y cromatografía de líquidos-espectrometría de masas.

a) Cromatografía de gases.- se reporta un método por Plattner y col. en el cual se hidroliza la fumonisina por medio alcalino, provocando una ruptura y formación de un amino-pentol, el cual se aísla empleando una resina y químicamente es convertida en un derivado para su posterior análisis. Con la aplicación de este método es capaz de detectar concentraciones del orden de 10 ng / g como límite

## II. - ANTECEDENTES

de detección. El empleo de estos métodos, implican la manipulación de la muestra, tales como hidrólisis, limpieza y derivatización.

b) Cromatografía de líquidos.- se aprovecha la peculiaridad de que las fumonisinas son solubles en agua y en disolventes polares, para llevar a cabo la determinación a través de fase inversa. Además se debe considerar que las fumonisinas carecen de grupos cromóforos y que no fluorescen por sí mismas, requiriendo de la formación de un derivado.

Los métodos empleados se basan en que el extracto de maíz debe ser purificado a fin de remover impurezas y para concentrar a las fumonisinas; para ello se emplean cartuchos de extracción en fase sólida, de fase inversa, de intercambio aniónico y columnas de inmunoafinidad. En todas ellas es importante el monitoreo y ajuste del pH para una adecuada retención y recuperaciones reproducibles.

Casi todas esas columnas implican la reacción de una amina primaria; entre esos métodos figuran: Fluorescamina, OPA (orto-ftaldialdehído), NDA (naftlen-2,3-dicarboxialdehído), FMOC (9-fluorenil-metil cloroformato) y el NBDF (4-fluoro-7-nitrobenzofurazano). De tales métodos más del 90 % de laboratorios que analizan fumonisinas, reportan el uso del método de OPA, en esencia porque ofrece un límite de detección de hasta 50 ng / g., es un método de análisis rápido, reproducible y con la mejor sensibilidad, el inconveniente es que el derivado formado es estable en un periodo de tiempo muy breve de cuatro minutos tras su preparación, tras el cual disminuye drásticamente la respuesta de la fluorescencia.

d) Cromatografía de capa fina.- estos métodos existen como una alternativa para las determinaciones de fumonisinas en menor tiempo, extraídas en columnas de la misma manera que para cromatografía de líquidos, implican el uso de

placas de sílica modificada o de sílica en fase normal, usando diversos disolventes para su elución. Los primeros métodos ofrecían un límite de detección de hasta 0.1 mg / g; sin embargo, empleando fluoescamina en las placas a modo de spray y posterior análisis en UV, se mejoró ampliamente la sensibilidad del método, detectando hasta 100 ng / g.

- e) Cromatografía de líquidos-espectrometría de masas.- a través de esta técnica, se efectúa el análisis sin la necesidad de la formación de un derivado, además provee la confirmación de la presencia de fumonisinas. Una de las ventajas de esta técnica, es que las partículas en la interfase son capaces de proporcionar un espectro de ionización químico, el cual genera amplia información estructural. A su vez se obtiene un límite de detección de 0.8 ng / g.

( Wilkes, J.G. & Sutherland, G.S., 1998)

## **2.9 Generalidades sobre Cromatografía**

### ***Cromatogramas***

Si un detector responde a la presencia del analito, se coloca al final de la columna, y se representa su señal en función del tiempo, se obtienen una serie de picos (gráficas) denominadas cromatogramas, muy útiles en el análisis cualitativo y cuantitativo. La observación de un cromatograma pone de manifiesto su semejanza con las curvas gaussianas o de distribución normal que se obtienen cuando se grafican valores repetidos de una medida en función de la frecuencia de su aparición. De manera semejante, la forma gaussiana de un cromatograma puede atribuirse a la combinación aditiva de los movimientos al azar de miles de partículas de soluto en la zona cromatográfica. El ancho de la curva está

directamente relacionado con el tiempo de retención del soluto en la columna e inversamente proporcional con la velocidad a la cual fluye la fase móvil.

La efectividad de la columna, a su vez, es un parámetro que depende, en parte, de las velocidades con las que se eluyen ambas especies, pero a su vez, dichas velocidades están determinadas por la magnitud de las constantes de los equilibrios de distribución de las especies entre ambas fases (Lindsay; 1992).

#### ***Tiempo de retención y tiempo muerto***

Se denomina tiempo de retención al tiempo que transcurre después de la inyección de la muestra para que el pico del analito alcance el detector. El tiempo muerto es el tiempo necesario para que, en promedio, la fase móvil pase a través de la columna, con ello la especie no retenida alcanza el detector (Lindsay, *ob. cit;* 1992).

#### ***Columnas para Cromatografía***

Las columnas para Cromatografía de Líquidos se construyen de acero inoxidable de diámetro interno uniforme, cuya longitud oscila entre 10 y 30 cm y los tamaños de partícula de los rellenos más comunes son de 3, 5 y 10  $\mu\text{m}$ . Las columnas presentan la ventaja de la rapidez y un mínimo consumo de disolvente, que deben ser de alta pureza y por ende son muy caros.

***Tipos de rellenos de columna***

Existen dos tipos básicos de rellenos de columna el pelicular y el de partícula porosa. El relleno pelicular consiste en bolas de vidrio o de algún polímero en cuya superficie se deposita una capa delgada y porosa de sílice, alúmina o algunas resinas de intercambio iónico, que pueden ser también tratadas químicamente para obtener una capa superficial orgánica. Por lo regular este tipo de rellenos se emplean en las pre-columnas. Por otro lado, los rellenos de partícula porosa están conformados por micropartículas porosas con diámetros de 3 a 10 mm. Y con menor dispersión entre ellas. Están elaboradas de sílice, alúmina o resinas de intercambio iónico, siendo la sílice el material más común (Lindsay, *ob cit*; 1992).

***Detectores***

En esta técnica no existen detectores tan aplicables universalmente ni tan fiables, a diferencia de la cromatografía de gases. Son de dos tipos básicos: detectores basados en una propiedad de la disolución y detectores basados en una propiedad del soluto. En el primer caso los detectores responden a una propiedad de la fase móvil, tal como el índice de refracción, la constante dieléctrica o bien la densidad. En el segundo grupo responden a alguna de las propiedades del soluto, tales como la absorbencia, UV, fluorescencia o bien la intensidad de difusión, que no son propias de la fase móvil

***Detectores de fluorescencia***

Estos tipos de detectores son semejantes en diseño a los fluorímetros y espectrofotómetros; en la mayoría de ellos, la fluorescencia se detecta por medio de un detector fotoeléctrico colocado perpendicularmente respecto al haz de

## II.- ANTECEDENTES

excitación. Los detectores más sencillos utilizan una fuente de excitación de mercurio y uno o más filtros para aislar la radiación fluorescente.

Una ventaja inherente a los métodos de fluorescencia es su alta sensibilidad, que resulta ser más de un orden de magnitud mayor que la de los sistemas de absorbencia. En la cromatografía de líquidos, se ha aprovechado esa ventaja para la separación y determinación de los compuestos fluorescentes de las muestras. Dichos compuestos, están relacionados con frecuencia, con el análisis de materiales, farmacéuticos, productos naturales, muestras clínicas y productos de petróleo. Muchas veces, el número de especies fluorescentes puede aumentarse mediante tratamientos previos de las muestras con reactivos que originan derivados fluorescentes (Lindsay, *ob cit*; 1992).

. Las variaciones en la intensidad de luz, causadas por la absorción UV-Visible, fluorescencia o índice de refracción resultantes de la interferencia encontrada al pasar los componentes de la muestra a través de la celda, son monitoreados como cambios de voltaje que se registran en un integrador.

### ***Equilibrios de intercambio iónico***

Estos procesos se basan en los equilibrios de intercambio entre iones de una disolución y los iones del mismo signo que están en la superficie de un sólido de elevada masa molecular y esencialmente insoluble. Los puntos activos más comunes en este tipo de resinas, para las de tipo catiónico, son los grupos de ácido sulfónico que es un ácido fuerte así como los grupos de ácido carboxílico que es un ácido débil.

Para los de tipo aniónico, contienen grupos de amina cuaternaria o bien grupos de amina primaria, siendo los primeros de base fuerte y los últimos de base débil (Willard y Merrit, *ob cit*; 1998).

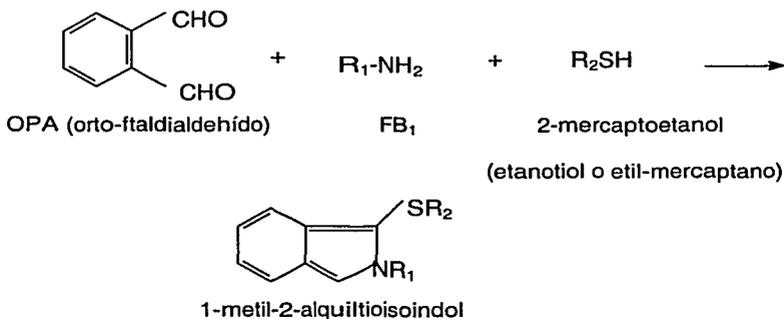


Figura 2. Reacción química de la FB<sub>1</sub> con el reactivo OPA (Wilkes; 1998).

### 2.10 Espectros de masas

Los espectros de masas se obtienen por conversión de los componentes de una muestra en iones gaseosos que se mueven rápidamente y se separan en función de su relación masa-carga.

Esta técnica es capaz de suministrar información sobre:

1. Composición cualitativa y cuantitativa tanto de analitos orgánicos como inorgánicos en muestras complejas.
2. Las estructuras de una amplia variedad de especies moleculares complejas.
3. Las relaciones isotópicas de los átomos de las muestras.
4. La estructura y composición de superficies sólidas.

Un término ampliamente usado en esta técnica, lo constituye la relación masa / carga de un ión atómico o molecular, el cual se obtiene dividiendo la masa atómica o molecular de un ión  $m$  por el número de cargas  $z$  de ese ión, sin embargo, debido a que la mayoría de los iones en espectrometría de masas tienen una carga unidad, dicho término se reduce al término más adecuado de masa.

### ***Descripción general***

La espectrometría de masas, es una técnica analítica basada en la química de los iones en estado gaseoso, y que, al igual que en muchas otras técnicas de análisis, tiene como objetivo básico convertir la muestra en productos "medibles" que indiquen la estructura original; en este caso los productos formados son iones gaseosos cuyas masas y abundancias relativas constituyen un espectro de masas. Un experimento típico de espectrometría de masas con ionización por impacto electrónico, comienza con la volatilización de la muestra, luego una corriente de moléculas en fase gaseosa colisiona en un campo de electrones acelerados, ionizando así dichas moléculas y generando radicales catiónicos que sufren una serie de fragmentaciones. Dichos iones son conducidos a través de un campo magnético variable que selecciona los fragmentos que llegan al detector en función de la relación masa-carga que poseen.

No obstante esta técnica requiere la modificación de la muestra a fase gaseosa para su análisis así como elevadas presiones y temperaturas y una fuente de ionización, lo cual supone una limitante para el análisis de compuestos poco volátiles, de carácter polar o bien de elevado peso molecular.

***Bombardeo rápido de átomos***

Para solucionar los inconvenientes antes mencionados se han desarrollado una serie de técnicas, entre las cuales destaca el Bombardeo Rápido de Átomos (FAB) debido a sus siglas en inglés, que consiste en el bombardeo de la muestra a través de átomos acelerados de alta energía

Los espectros del FAB son complejos, los cuales demuestran a la especie  $(M + H)^+$ , así como fragmentos, grupos de la matriz y grupos de la muestra.

La muestra se debe disolver en una matriz líquida permanente comúnmente empleado alcohol nitrobenzílico, glicerol, tioglicerol, dietanolamina y trietanolamina.

Los iones se aceleran y se enfocan para ser analizados bajo varios kilovoltios, luego pasan a un compartimiento de colisión donde son neutralizados por intercambio de carga entre iones y átomos

Esta transferencia es una reacción de segundo orden y la cantidad de producto depende en gran parte de la concentración de reactivo.

Después de la ionización son seleccionados los iones positivos o negativos, mientras que los átomos neutrales van golpeando la solución de la muestra, que incluye una onda corta que expulsa iones y moléculas, evitando la acumulación de cargas en las muestras no conductoras. Los iones son acelerados por la diferencia de potencial hacia el analizador, expulsando solamente los iones de la fase gaseosa ya presentes.

(Willard y Merrit, *ob cit*; 1998).

### III. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo General.

Cuantificar los niveles de fumonisina B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>) en muestras de maíz de valor acrecentado a través de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.

#### 3.1.1 Objetivos Particulares.

- Efectuar una selección y caracterización fisicoquímica del maíz de valor acrecentado mediante evaluación sensorial y análisis químico proximal.
- Fijar el nivel de cuantificación, sensibilidad y reproducibilidad de la técnica empleada para identificar a la FB<sub>1</sub>.
- Determinar el contenido de FB<sub>1</sub> en muestras de maíz de valor acrecentado de variedades blanco y amarillo, así como en muestras de maíz comercial expandidas en el Valle de México, las cuales servirán como testigos de comparación en el análisis.
- Establecer si existe alguna relación entre el contenido de la FB<sub>1</sub> y la composición gruesa del grano de maíz de valor acrecentado.

## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

El desarrollo del presente trabajo se dividió en las siguientes etapas:

1. Recepción y almacenamiento de la materia prima.
2. Evaluación Física de la materia prima.
3. Determinación de Calidad de la materia prima.
4. Selección de la metodología para el análisis de  $FB_1$ .
5. Proceso de molienda, acondicionamiento y extracción de  $FB_1$  en las muestras de maíz comercial y mejorado.
6. Elaboración de la Curva de Calibración para el análisis de  $FB_1$ .
7. Análisis y Cuantificación de  $FB_1$  en todas las muestras de maíz.
8. Confirmación estructural de  $FB_1$  tanto en los estándares como de algunas muestras, a través de Espectrometría de Masas, empleando la técnica de FAB.
9. Análisis estadístico de los datos y obtención de conclusiones.

### 4.1 Materiales

#### **Maíz**

Para el desarrollo de la presente investigación, se recibieron dos lotes de granos de maíz de las variedades amarillo y blanco, por parte del Centro de Investigación y Mejoramiento del Maíz y Trigo (CIMMYT) unidad El Batán, Texcoco, las cuales provienen de mazorcas inoculadas en el campo con *F. moniliforme* y, que a su vez, fueron evaluadas por el propio Centro a fin de observar la resistencia a la pudrición de mazorca.

Uno de los lotes está conformado por un grupo de 32 líneas amarillas subtropicales químicamente mejoradas, mientras que el segundo lote corresponde a un grupo de 42 líneas blancas subtropicales también mejoradas químicamente. Sin embargo únicamente se elaboró el análisis completo, que incluyó la caracterización física del porcentaje de daños del grano, el análisis químico proximal y la cuantificación de FB<sub>1</sub>, en dos grupos de muestras cada una conformado por 13 amarillas y 13 blancas.

#### ***Aparatos y reactivos***

A continuación se mencionan el equipo, los reactivos y los materiales empleados en el desarrollo experimental.

##### ▪ Equipo Cromatográfico

1. Detector de Fluorescencia Varian modelo 9075.
2. Bomba binaria e isocrática para Cromatografía de Líquidos.
3. Programa Varian Associates Inc. Versión 4.51.
4. Columna analítica de acero inoxidable (15 cm X 4.6 mm de diámetro interno) empacada en fase "Nucleosil" C-18 de 5 µm de diámetro de partícula.

##### ▪ Otros equipos.

1. Jeringas para cromatografía de líquidos de 20 µL y de 100 µL.
2. Extractor múltiple al vacío de 10 cartuchos.
3. Cartuchos de extracción SAX de 500 mg.
4. Baño de Ultrasonido.
5. Micropipetas de volumen variable 2 a 20 µL, 50 a 100 µL y de 100 a 1000 µL .
6. Potenciómetro.

7. Balanza Analítica.
8. Balanza granataria.
9. Sistema de filtración por vacío.
10. Molino con tamiz integrado.
11. Centrífuga.
12. Vasos para centrífuga de 250 mL.
13. Vórtex.
14. Parrilla de Agitación magnética con control de temperatura.
15. Membranas filtrantes de 47mm de diámetro con diámetro de poro de 0.45  $\mu\text{m}$  a base de nylon.
16. Espectrómetro de masas.

▪ Disolventes Orgánicos.

Metanol grado HPLC, acetonitrilo grado HPLC; ácido sulfúrico, éter etílico, ácido acético glacial y ácido clorhídrico de grado reactivo, ácido ortofosfórico con concentración mayor al 85 %.

▪ Reactivos.

Hidróxido de sodio, sulfato de potasio, sulfato de cobre pentahidratado, dihidrogenofosfato de sodio y tetraborato de sodio decahidratado de grado reactivo 2-mercaptoetanol, ortoftal-dialdehído y estándar de fumonisina B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>) de pureza certificada del 98 % (estos de la marca SIGMA).

#### **4.2 Métodos**

Las muestras de maíz se sometieron a un análisis selectivo para determinar la calidad comercial de las mismas, así como para evaluar las condiciones iniciales de la materia prima, llevada a cabo de manera manual.

La clasificación se efectuó tomando porciones de 100 g de maíz y de acuerdo a los siguientes criterios:

- **Materia Extraña (impurezas).** Que son aquellas fracciones de tallos, hojas, cáscaras, tamo, piedras, etc., denominando así a cualquier material extraño al grano de maíz y que es retenido en tamiz o malla del número 4.
- **Grano Dañado por Hongos.** Aquellos granos de maíz que contienen de manera apreciable en su porción superficial colonias de diversos colores rojas, rosadas, negras, azules, café, o cualquier otro color promovido por los hongos a nivel de campo o en almacén.
- **Grano Quebrado.** Son aquellos granos cuya composición no está íntegra, presentando rupturas o fragmentaciones en la superficie y que además son retenidos en tamiz o malla del número 8.
- **Grano Chupado.** Son aquellos granos de menor proporción, cuya fracción del endospermo no es proporcional al tamaño del grano entero y que por lo general abaten los rendimientos de la molienda.

De acuerdo con la Norma de referencia, se establece un proceso de clasificación del maíz, que incluye 5 categorías y que, por ende, nos habla de especificaciones y de la calidad de este cereal. Los criterios anteriores se tomaron de la Norma Oficial Mexicana NMX-FF-034-1995-SCFI.

#### **IV. - MATERIALES Y MÉTODOS**

Posteriormente se realizó un Análisis Proximal que consta de cenizas, humedad, proteína, extracto etéreo y carbohidratos por diferencia. Dichos análisis se efectuaron por triplicado y son de acuerdo al método oficial del AOAC (1995), como se señala en el anexo 3 de la página 78.

Se omitió el análisis de fibra, en virtud de carecer del equipo necesario para tal fin.

Ya elaboradas las etapas anteriores, se procedió a elegir el método cromatográfico que emplearíamos en lo posterior en esta investigación, trabajando originalmente con el método de fluorescamina, ese método fue descartado por diversos inconvenientes, entre los cuales destacan los tiempos de corrida extremadamente largos, del orden de 35 minutos, el cual era bastante largo para el análisis de un sólo compuesto, la obtención de dos picos y con ello la sobre estimación del contenido de toxina.

Después fue selecto el método de OPA, con el que finalmente efectuamos la cuantificación de FB<sub>1</sub>, por dos razones fundamentales: la primera de ellas es que es ampliamente usado en los análisis de esta toxina y porque, de acuerdo con los reportes, ofrece la mejor sensibilidad de los métodos disponibles, desde 0.80 ppm hasta 120 ppm. Las etapas posteriores fueron:

##### ***Preparación del estándar de FB<sub>1</sub>***

Todas las disoluciones de Fumonisina B<sub>1</sub> utilizadas, fueron preparadas a partir de una solución "madre" concentrada (100 ppm), la cual fue preparada de la siguiente manera:

Se pesó la cantidad de soluto necesaria (10 mg) y se disolvieron en 10 mL de metanol grado HPLC; una vez disuelto se transfirió y aforó cuantitativamente en un matraz volumétrico de 100 mL con el disolvente de referencia. Dicha solución se almacenó a una temperatura de 4°C y con cierta periodicidad se probaba por cromatografía para verificar su estabilidad.

#### ***Extracción de FB<sub>1</sub>***

La extracción de FB<sub>1</sub> de las muestras de maíz se realizó de la siguiente manera:

Se pesan 50g de maíz molido que previamente se haya tamizado con un tamaño de partícula de 1.5 mm en el molino Brabender® modelo OHG\_Duisburg 51-55 D4100, y se llevan a un vaso para centrifuga, se agregan 100 mL de una solución metanol/agua (3+1) y el vaso se coloca en el baño de ultrasonido Bransonic modelo 1210 por espacio de 15 minutos con la finalidad de permitir un mejor contacto y una adecuada agitación entre el disolvente y la muestra.

Transcurrido ese tiempo se introducen en la centrífuga marca Eppendorf 5810 R durante 10 minutos a 2500 rpm, se efectúa hasta aquí la separación del maíz y el disolvente y posteriormente se filtra el sobrenadante a través de papel filtro # 6 de velocidad lenta y retención fina. Finalmente se debe verificar el pH del filtrado, cuyo intervalo óptimo debe oscilar entre 5.8 y 6.5 y de ser necesario deberá ajustarse. Debido a que el volumen en que incorporé inicialmente el maíz se modifica en la agitación, centrifugación y filtración, se debe ajustar al volumen inmediato más próximo, en este caso se recuperaban alrededor de 60 a 65 mL de disolvente y lo llevamos a un volumen final de 75 mL que es la capacidad de los frascos viales donde fueron almacenados, de tal manera que será ese un factor de

dilución a considerar en los posteriores cálculos, es decir 50 g de maíz en 75 mL finales de disolvente.

***Limpieza de la muestra***

La limpieza de la muestra se lleva a cabo en cartuchos empacados con silica-SAX (Strong Anionic Exchange), los cuales deben ser previamente acondicionados efectuando un lavado sucesivo con metanol (5 mL) seguido de metanol/agua (5 mL, 75+25).

A continuación se aplica gradualmente el extracto de maíz (10 mL) con pH ajustado o dentro del intervalo óptimo, procurando que la velocidad del flujo no exceda los 2mL/minuto y se debe cuidar además que no se seque el cartucho.

Posteriormente se lleva a cabo un lavado del cartucho con metanol/agua (5 mL, 75+25) seguido de metanol (3 mL).

Finalmente las fumonisinas son eluidas con metanol/ácido acético (10 mL, 99+1) disminuyendo el flujo a 1mL/minuto, colectando el eluato en un vial de color ámbar. Se toma una alícuota y se procede a evaporarla hasta sequedad evitando que la temperatura supere los 60°C. Redisolver el extracto en 1mL de metanol y volver a evaporar en las mismas condiciones, esto con la finalidad de eliminar en su totalidad el ácido acético.

***Derivatización y análisis***

Resuspender el extracto en 200 µL de metanol, y tomar 25 µL de este en otro vial, se añaden 225 µL del reactivo OPA (orto-ftaldialdehído), se agitan en el vórtex por espacio de 10 segundos y se inyectan 20 µL al cromatógrafo de líquidos

procurando que toda esta operación no exceda el minuto, debido a que tras ese tiempo decae significativamente la intensidad de la fluorescencia.

A su vez el reactivo OPA se prepara de la siguiente manera:

Se pesan 40 mg de OPA y se disuelven en 1 mL de metanol, una vez disuelto se agregan 5 mL de Borato de sodio (0.1M) y finalmente se añaden 50  $\mu$ L de 2-mercaptoetanol, el cual debe almacenarse en vial de color ámbar, a temperatura ambiente y ha de usarse antes de una semana (Sydenham, *et al*; 1996).

#### ***Condiciones de operación del equipo***

Las características y condiciones del método cromatográfico empleadas en el estudio fueron: concentración mínima detectable de 0.19 ng de FB<sub>1</sub> / g de maíz, concentración máxima detectable de 121 ng / g de maíz, flujo de 1 mL/minuto, fase móvil compuesta por metanol y buffer de dihidrogen-fosfato de sodio 0.1 M (77+23), columna analítica de acero inoxidable de 15 cm X 4.6 mm de diámetro interno empacada en fase nucleosil C-18 de 5  $\mu$ m de diámetro de partícula.

Las condiciones del detector de fluorescencia fueron: longitud de onda de emisión de 440 nm, longitud de onda de excitación de 334 nm .

Para efectuar los análisis se construyó una curva de calibración con un estándar de FB<sub>1</sub>, que requería al menos de 5 diferentes concentraciones, ello para observar la capacidad del sistema y asegurar que los resultados obtenidos sean proporcionales a la concentración del estándar en estudio. Las concentraciones empleadas fueron: 0.5 ppm, 1.0 ppm, 2.0 ppm, 5.0 ppm, 6.0 ppm y 10.0 ppm. Dicha curva se realizó graficando el cambio de la señal del detector, en este caso el área bajo la curva como función del cambio de concentración del estándar

#### IV. - MATERIALES Y MÉTODOS

analizado. Siguiendo la ecuación de la línea recta  $y = mx + b$ , con dicha curva se pudo determinar el coeficiente de correlación ( $r$ ) el cual debe aproximarse a la unidad, para asegurar el trabajar en un sistema lineal. Finalmente tras la elaboración de esta curva, se pudo efectuar la comparación del área de los picos producidos por las muestras de maíz con respecto a los del estándar de FB<sub>1</sub>, así como de sus respectivos tiempos de retención (Figura 3 de la página 57).

## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Resultados de la clasificación del porcentaje de daños.

En la tabla 1 se presenta la clasificación de los granos de maíz amarillos y blancos de valor acrecentado, así como de las muestras testigo, con base a la Norma NMX-FF-034-1995-SCFI.

En las muestras amarillas para dicha caracterización se puede mencionar que en el aspecto de grano quebrado e impurezas, los porcentajes de daño son relativamente bajos, sin embargo, los porcentajes de daño por insectos llegan a alcanzar en ciertas muestras hasta un 4 %, mientras que en el aspecto de granos chupados esos mismos porcentajes en general son bajos.

Hay que señalar, además, que el parámetro que más resalta es el de daño por hongos, con niveles de daño que oscilan del 2.4 % hasta un 14 %, presentando valores en este rubro ligeramente mayores que los de las muestras blancas.

De ello se desprende que al clasificarlos de acuerdo con la Norma de referencia y, al hacer la suma total de daños, cinco de esas muestras se ubican en la clasificación de "comercial", en tanto que sólo tres muestras recibieron la clasificación "México 2", dos muestras más en la "México 3" y finalmente tres muestras se ubican en la "México 4". Dicha clasificación se basa en que al hacer la suma total de daños, se asigna una clasificación de México 1 a la muestra con no más de 3 % de daños; es México 2 si dicha suma no asciende a más de 5 %; se denomina México 3 si la suma total no supera el 7 % y es México 4 si dicha suma no supera el 10 %; en caso de superar un 10 % de daños, la muestra recibe la asignación de Comercial.

## V.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Por otro lado, en la clasificación del grano de maíz blanco de valor acrecentado, podemos observar que los daños por hongo y de grano quebrado son en esencia bajos, con un valor máximo de 0.7 %, los daños por impurezas apenas alcanzan el 1 %, los daños para grano chupado alcanzan un valor máximo de 1.5 % y en mayor grado los daños por insecto alcanzan hasta el 1.9 %, constituyendo la suma de daños total un parámetro relativamente bajo.

No obstante, y al igual que en las muestras amarillas, los mayores porcentajes de daño se presentan en el marco de daño por hongo, si bien poco más bajos que en las muestras amarillas, se presenta un intervalo del 2.3 % al 11.3 % .

Finalmente en el esquema de clasificación de las muestras, el grueso de ellas se ubica en la "México 3" con una proporción total de cinco muestras, en la clasificación "México 4" hay un total de cuatro muestras, en tanto que dos muestras se clasificaron en la "México 2", una de ellas en la "México 1" y sólo una de las muestras de este grupo se clasificó en el rubro de muestra "comercial".

Por lo que respecta al grano de maíz empleado como testigo; del maíz azul de Milpa Alta pueden señalarse daños muy bajos en lo que a impurezas se refiere con 0.1 %, en grano chupado con apenas el 1 %, en granos de diferente color con el 1.5 %, en tanto que la mayor proporción recae en daños por insectos con el 1.7 %, quedando su clasificación final en "México 2".

Del maíz amarillo testigo proveniente del estado de Sinaloa, se debe señalar solamente dos aspectos que son granos de diferente color con 6.9 % y granos quebrados con 6.3 %, elementos que le confieren a esta muestra la clasificación de "comercial".

## V. - RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Finalmente del maíz blanco testigo proveniente del estado de México hay que señalar tres aspectos constituidos por daños por impurezas con 0.3 %, granos de diferente color con un 4.5 % y granos quebrados con 6.7 %, de tal manera que al efectuar la suma de daños en total, recibe una asignación de "comercial".

**Tabla 1. Caracterización física del porcentaje de daños en maíz.**

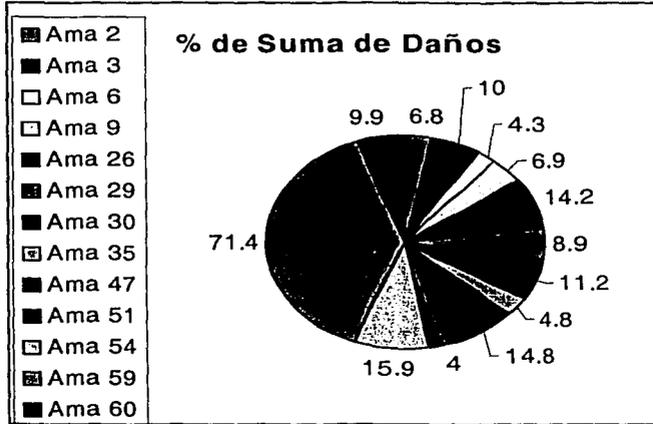
Muestra	Chupados	Hongos	Quebrados	Insectos	Impurezas	Suma	Clasif.
Ama 2	1.2	4.4	0.9	0	0.3	6.8	M-3
Ama 3	1.0	4.8	0	4.0	0.2	10.0	M-4
Ama 6	0.1	3.1	0	1.0	0.1	4.3	M-2
Ama 9	0.3	5.0	0	1.6	0	6.9	M-3
Ama 26	1.3	10.2	0	2.5	0.2	14.2	COM.
Ama 29	0.7	7.5	0.5	0	0.2	8.9	M-4
Ama 30	0.8	7.6	0	2.4	0.4	11.2	COM.
Ama 35	0.2	3.9	0	0.5	0.2	4.8	M-2
Ama 47	0.5	14.0	0.1	0	0.2	14.8	COM.
Ama 51	0	2.6	0	0.9	0.5	4.0	M-2
Ama 54	0	13.3	0	1.1	1.5	15.9	COM.
Ama 59	9.0	2.4	0	0	0	71.4	COM.
Ama 60	0	9.3	0	0.3	0.3	9.9	M-4
Bco 1	0	5.4	0.7	1.1	0.1	7.3	M-4
Bco 3	0.1	3.5	0	1.5	0.3	5.4	M-3
Bco 5	1.5	6.0	0	1.5	1.0	10.0	M-4
Bco 9	0.4	8.0	0	0	0.1	8.5	M-4
Bco 10	0.5	4.2	0.2	0	0.2	5.1	M-3
Bco 13	0.2	11.3	0	1.9	0.4	13.8	COM.
Bco 14	1.2	6.7	0	0	0.1	8.0	M-4
Bco 19	0.5	4.7	0	1.2	0.3	6.7	M-3
Bco 31	0.3	4.1	0	0.3	0.4	5.1	M-3
Bco 34	0.3	2.3	0.4	0	0.3	3.3	M-2
Bco 46	0.5	5.3	0.1	0	0.4	6.3	M-3
Bco 71	0	2.7	0	0.1	0.1	2.9	M-1
Bco 80	0	3.8	0	0.7	0.2	4.7	M-2
Azul	1.0	0	0	1.7	0.1	4.3	M-2
Ama T	0	0	6.3	0	0	13.2	COM.
Bco T	0	0	6.7	0	0.3	11.5	COM.

La muestra Amarillo 59 presentó adicionalmente un 60 % de grano de diferente color.

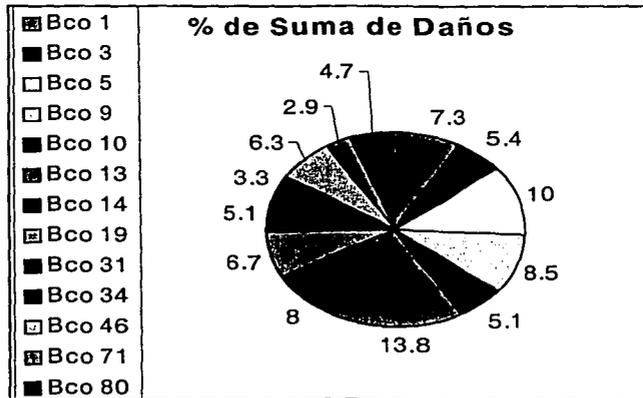
Datos expresados en porcentaje (%).

**Clasificación de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NMX-FF-034-1995-SCFI.**

Gráfica 1. Suma de % de daños en muestras Amarillas



Gráfica 2. Suma de % de daños en muestras Blancas



**5.2 Resultados del análisis químico proximal**

En la tabla 2 se pueden apreciar los resultados del análisis químico proximal del grano de maíz amarillo y blanco de valor acrecentado y también de las muestras testigo.

**Muestras de maíz Amarillo.**- se puede apreciar en primer lugar que los contenidos de humedad van del 9 al 11.88 %, porcentajes adecuados para transporte y manejo de las muestras, siendo el valor máximo adecuado para este fin y de acuerdo con la Norma del 14 %.

Del contenido de proteína hemos de señalar que las muestras exhibieron contenidos de proteína del 8.29 % al 10.43 %, que comparadas con la referencia, que establecen un 8 % mínimo en el caso del maíz (N X 6.25), cumplen con tal especificación.

Por lo que respecta al contenido de grasa, el intervalo presentado fue del 2.87 al 5.51 %. La especificación en la referencia establece un 3.1 % mínimo, de tal manera que sólo la muestra Amarillo 30 no cumple con ello.

Finalmente en el contenido de cenizas, las muestras presentan contenidos que van del 0.98 % hasta un 1.60 %, pertenecientes respectivamente a las muestras Amarillo 47 y Amarillo 54 y, toda vez que la referencia establece un 3 % como máximo de este componente, se aprecia que todas las muestras cumplen con dicha especificación.

**Muestras de maíz Blanco.**- podemos señalar en primer término que los contenidos de humedad presentados oscilan entre 9.95 y 12.46 %. De igual

manera hay que señalar que de acuerdo con la referencia, se cumple en todas las muestras con el contenido óptimo de humedad.

Por lo que respecta al contenido de proteína, para estas muestras el intervalo obtenido fue del 6.78 a 10.41 %. Aquí resalta el hecho de que, de acuerdo con la referencia y de acuerdo al factor empleado ( $N \times 6.25$ ), hay tres muestras que no cumplen con tal fin, la Blanco 46 con 6.78 %, la Blanco 71 con 7.76 % y la muestra Blanco 19 con 7.91 %.

Del contenido de grasa cabe mencionar que se presentó un intervalo de valores comprendido entre 3.51 % al 8.69 %, y de acuerdo con la referencia todas las muestras cumplen con la especificación del 3.1 % como mínimo de este componente. Finalmente, el contenido de cenizas figura de 0.98 % hasta 1.56 %, pertenecientes a las muestras Blanco 14 y Blanco 9, de manera respectiva, por lo que cumplen con la especificación todas las muestras.

**Muestras de maíz Testigos.**- en primer lugar la muestra azul de Milpa Alta cumple con el requerimiento de humedad con un valor de 8.38 %, por otro lado no cumple con el requerimiento mínimo de proteína del 8 %, además si cumplió con el contenido mínimo de grasa obteniendo un 4.82 % y de igual forma cumplió con la especificación del contenido de cenizas con un valor de 1.39 %. Por lo que respecta a la muestra testigo amarilla, del estado de Sinaloa, apreciamos a primera instancia que cumple con todas las especificaciones tanto para humedad con 9.36 %, proteína ( $N \times 6.25$ ) con 8.66 %, en grasa con 5.96 % y en cenizas con el 1.05 %. Finalmente y en lo que respecta a la muestra testigo blanca de la localidad de Toluca, Estado de México, se puede apreciar que cumple también con todas las especificaciones, presentando un valor de 11.83 % de humedad, un

**V. - RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

valor de proteína (N X 6.25) del 8.11 %, 6.35 % en el contenido de grasa y finalmente un valor de 1.04 % en el contenido de cenizas.

**Tabla 2. Análisis Químico Proximal y contenido de FB<sub>1</sub> de las muestras de maíz mejoradas y testigos.**

Muestra	Humedad (%)	% Proteína (Base Seca)	% Grasa (Base Seca)	% Cenizas (Base Seca)	% CHOST (Base Seca)	Contenido FB <sub>1</sub> (ppm)
Ama 2	11.34	10.43	3.93	1.45	72.85	1.89
Ama 3	11.26	8.92	4.33	1.31	74.18	0.19
Ama 6	11.61	9.32	5.19	1.38	72.5	7.37
Ama 9	11.53	8.81	4.05	1.31	74.3	20.07
Ama 26	10.38	8.52	3.37	1.38	76.35	33.70
Ama 29	11.88	9.21	3.83	1.32	73.76	4.29
Ama 30	11.5	8.29	2.87	1.11	76.23	22.09
Ama 35	11.0	8.74	3.51	1.05	75.7	4.52
Ama 47	9.0	9.1	5.51	0.98	75.41	33.45
Ama 51	9.42	8.78	4.16	1.49	76.15	0.19
Ama 54	10.22	9.90	3.88	1.60	74.4	2.52
Ama 59	9.01	9.18	3.95	1.08	76.78	8.14
Ama 60	9.58	10.23	4.71	1.35	74.13	4.45
Bco 1	11.62	9.20	3.74	1.35	74.09	2.89
Bco 3	10.54	9.31	3.92	1.18	75.05	0.66
Bco 5	11.01	8.14	4.18	1.29	75.38	17.54
Bco 9	10.76	10.41	4.73	1.56	72.54	12.04
Bco 10	10.89	9.40	3.51	1.35	74.85	38.59
Bco 13	10.76	8.80	8.69	1.02	70.73	4.55
Bco 14	10.82	8.15	8.22	0.98	71.83	25.29
Bco 19	11.36	7.91	3.82	1.20	75.71	4.40
Bco 31	11.17	8.44	6.53	1.11	75.22	2.46
Bco 34	11.37	8.07	4.64	1.03	74.89	2.62
Bco 46	9.95	6.78	7.39	1.27	74.61	3.13
Bco 71	10.74	7.76	4.84	1.09	75.57	2.05
Bco 80	12.46	8.01	6.48	1.10	71.95	2.85
Azul Test.	8.38	7.39	4.82	1.39	78.02	0
Ama Test.	9.36	8.66	5.96	1.05	74.97	0
Bco Test.	11.83	8.11	6.35	1.04	72.67	15.80
NORMA	14 Max.	8.0 Min.	3.1 Min.	3.0 Max.		4.0 Max. (*)
σ	0.99	0.86	1.47	0.18	1.65	11.22

(N x 6.25)

(\*) Consumo humano

Los valores son promedios de 3 determinaciones individuales.

**Ejemplo para cálculo de  $FB_1$  en las muestras**

$$\left( \frac{50 \text{ g de maíz}}{75 \text{ mL}} \right) \left( \frac{4 \text{ mL}}{0.2 \text{ mL}} \right) \left( \frac{0.025 \text{ mL}}{0.25 \text{ mL}} \right) \left( \frac{1 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} \right) = 0.134 \text{ kg de maíz / litro}$$

Donde el primer factor corresponde a los 75 gramos iniciales de maíz en un volumen final completado de 75 mL; el segundo factor corresponde a 4 mL de extracto que se aplican al cartucho de limpieza, recuperando tras la evaporación 0.2 mL (200  $\mu$ L); a continuación está el factor proveniente de tomar 25  $\mu$ L de extracto que se hacen reaccionar con 225  $\mu$ L de OPA, es decir 0.025 mL a un volumen final de 0.25 mL.; y finalmente en todas las muestras empleamos un factor de dilución de 1:10 para inyectar al cromatógrafo.

Ese factor obtenido es constante para todas las muestras y después se interpola en la curva de calibración para cada muestra, para determinar la concentración de  $FB_1$  en ese volumen inyectado, haciendo uso de la pendiente y la ordenada al origen.

Ejemplo: muestra Amarillo 2 área promedio = 385615

Haciendo uso de la ecuación de la recta  $y = mx + b$ , donde  $m = 1116726.1$  y  $b = 102466.652$ , se obtiene una concentración ( $x$ ) = 0.2535 mg de  $FB_1$  / litro.

Finalmente se divide esa concentración 0.2535 mg de  $FB_1$  / litro entre el factor constante obtenido de la manipulación de la muestra 0.134 Kg de maíz / litro; se obtiene un valor de 1.89 mg de  $FB_1$  / Kg de maíz (ppm).

**5.3 Análisis Estadístico del Análisis Químico Proximal (AQP) de las muestras de maíz.**

Todos los Análisis estadísticos se llevaron a cabo a través de un análisis de varianza de una vía y, en los casos necesarios, se elaboró la prueba de comparación de Duncan a niveles de significancia de 0.01 y de 0.05, empleando el paquete estadístico SPSS-PC de la Versión 2.

Para este análisis, consideramos dos variables en estudio, "Variedad" por un lado y que en este caso son Amarilla o Blanca, y la variable "Muestra" para designar a cada una de las muestras analizadas.

❖ *Discusión de resultados de las muestras en el contenido de Humedad.*

El intervalo de humedad presentado por las muestras amarillas va de 9 % hasta un 11.88 %, mientras que para las muestras blancas ese contenido va de 9.95 hasta 12.46 %, los cuales nos indican que hasta el momento de efectuar la determinación de humedad, las muestras exhibieron contenidos adecuados para su manejo y almacenamiento, además de cumplir todas ellas con el requerimiento establecido por la Norma de referencia para granos de maíz, que señala un 14 % máximo.

Dado que estas muestras de maíz fueron tratadas a nivel de campo de manera idéntica, posteriormente almacenadas en las mismas condiciones de temperatura, efectuado el tratamiento en el laboratorio por igual, etc., podemos considerar que las diferencias significativas presentadas se atribuyen a los propios contenidos

individuales de humedad de cada muestra, a la heterogeneidad del grupo de muestras y a la complejidad del maíz como matriz alimenticia.

Del mismo modo, no se percibe de manera clara una relación aparente entre los contenidos de humedad y la concentración de  $FB_1$ .

Del análisis de varianza, de las muestras amarillas, se puede ver que no existe diferencia significativa en lo que concierne a la variable "Variedad", pero en la variable "Muestra" se presenta diferencia significativa al 0.05; y al efectuar la prueba de Duncan para comparar resultados individuales, de 78 comparaciones posibles, 24 de ellas presentan esa diferencia significativa, es decir una proporción del 30.76 %.

Mientras que del análisis estadístico de las muestras blancas se desprende que la variable "Variedad", no presenta diferencia significativa en los contenidos de humedad, mientras que para la variable "Muestra" presenta diferencia significativa al 0.01. Al efectuar la comparación de los contenidos individuales de humedad, a través de la prueba de Duncan, se destacan con diferencia significativa al 0.01 un total de 6 muestras, lo cual equivale al 7.69 % de ese grupo de muestras.

❖ *Discusión de resultados de las muestras en el contenido de grasa.*

Los resultados en las muestras amarillas presentan un intervalo de contenido de grasa entre el 2.87 y el 5.51 % y pese a no obtener diferencia significativa en la variable muestra, sí se presenta diferencia significativa en lo que concierne a la variable "Variedad". Se aprecia también que sólo una de las muestras, la Amarillo 30, exhibe un contenido relativamente más bajo respecto a lo que señalan las referencias de 3.1 % como mínimo.

En la prueba estadística de Duncan, de las 78 posibles comparaciones individuales entre las muestras, sólo dos de ellas presentan diferencia significativa, 2.56 % del total.

En segundo lugar se analizan los resultados obtenidos para las muestras blancas y todas las muestras de este lote y de esta variedad, cumplen con tal especificación.

Del análisis estadístico se aprecia que No Existe Diferencia Significativa en el contenido de grasa respecto a la variable "Variedad", pero sí la presenta como altamente significativa en lo que concierne a la variable "Muestra", ello propiciado en parte porque las muestras presentan un intervalo más amplio del contenido de grasa, el cual va de 3.5 a 8.35 % y, pese al señalamiento que con anterioridad se hacía en el sentido de que todas las muestras se almacenaron y se trataron de idéntica forma, el componente grasa presenta mayor heterogeneidad en estas muestras de maíz.

Mediante la prueba Duncan con un nivel de  $\alpha = 0.05$ , de 78 comparaciones individuales, 23 muestras presentaron Diferencia Significativa, lo cual corresponde a un 29.5 %.

❖ *Discusión de resultados de las muestras en el contenido de proteína.*

Respecto al % de proteína en el maíz no se presentó diferencia significativa tanto en la variable "Variedad" como en la de "Muestra"; aunque también cabe señalar que los contenidos de este componente son bastante similares a los de la variedad blanca. Al comparar con las referencias, todas las muestras amarillas

## V.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

presentan contenidos superiores al 8 % mínimo señalado (N X 6.25), por lo que sí se cumple con esa especificación.

En apariencia las dos muestras con mayor contenido de proteína, presentan ciertamente valores altos en las concentraciones de  $FB_1$ , mientras que la muestra Amarillo 30, con el menor contenido de proteína, exhibe el segundo lugar más alto en la concentración de  $FB_1$  en dicho lote, sin que con ello pueda establecerse una generalidad.

Por lo que respecta a las muestras blancas hay tres muestras que no cumplen con la especificación mínima para proteína, los casos de las muestras Blanco 19, Blanco 46 y Blanco 71, mientras que el resto de las muestras, incluyendo el testigo sí cumplen.

Debido a que estas muestras son de valor acrecentado y tienen una mejora en sus niveles de Lisina y Triptofano, se esperaría quizá, en primer término, una cantidad sustancialmente mayor en sus respectivos niveles de proteína, hecho que no ocurre así ya que en este caso la mejora efectuada fue en cuanto a calidad proteica más no en cantidad.

Finalmente, al efectuar la prueba Duncan con un nivel de  $\alpha = 0.01$ , se puede apreciar que únicamente siete de 78 comparaciones individuales presentan Diferencia Significativa, lo que equivale al 8.9 %.

### ❖ *Discusión de resultados de las muestras en el contenido de cenizas.*

En las muestras amarillas podemos observar que todas las muestras cumplen con la especificación de 3 % como máximo presentando un intervalo de 0.98 a 1.60 %.

## V.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

No se presenta diferencia significativa para ambas variables "Variedad" y "Muestra", además de que los contenidos de cenizas en ambas variedades fueron muy similares entre sí.

A través de la comparación del contenido de cenizas de este lote de muestras de maíz de variedad blanca, se puede apreciar que todas esas muestras cubren con la especificación, comprendiendo un intervalo de valores del 0.98 hasta un 1.56 %. Por otro lado, en lo que respecta al análisis estadístico, se puede apreciar que no existe diferencia significativa en la variable "Variedad", ni tampoco en la variable "Muestra", siendo el componente más homogéneo de los verificados en el análisis químico proximal. Es importante destacar que el componente cenizas tampoco guarda una relación aparente con respecto a la concentración de  $FB_1$ .

### ❖ *Discusión de resultados de las muestras en el contenido de $FB_1$ .*

En primer lugar se elaboró una comparación de estos datos con respecto a la referencia de la FDA, y está claro que una gran proporción de las muestras analizadas no cumplen con los requerimientos establecidos para  $FB_1$  en lo que respecta a alimentos de consumo humano, siendo importante destacar que aunque en promedio las muestras blancas presentan mayor concentración de la toxina, es menor el número de muestras que se rechazarían para tal fin.

La muestra que presentó la mayor concentración de  $FB_1$  fue la Amarilla 26 con 33.70 ppm, en tanto que las que menor contenido exhibieron fueron las muestras Amarillo 3 y Amarillo 51 con 0.19 ppm.

Es importante señalar que la muestra amarilla usada como testigo, se obtuvo en un expendio de la ciudad de México, proveniente del estado de Sinaloa, sin

embargo se desconoce el ciclo de cosecha del que proviene, y por otro lado no fue posible detectar toxina en dicha muestra.

Por lo que respecta al Análisis Estadístico, se vuelve a apreciar que No Existe Diferencia Significativa en la variable "Variedad", pero la variable "Muestra" resulta ser altamente significativa. Mediante la prueba de Duncan, de las 78 comparaciones individuales, 70 de ellas resultan con diferencia significativa, lo que asciende al 89 % de las muestras, lo cual corrobora por qué la variable "Muestra" es altamente significativa.

Del mismo modo que en las muestras blancas, el intervalo de la concentración de  $FB_1$  es marcadamente heterogéneo, el cual oscila de 0.19 a 38.59 ppm y queda claro que aún con todas las condiciones en campo, supuestamente controladas, las mismas condiciones de almacenamiento, etc., las muestras desarrollaron diferentes niveles de infección al ser sometidas a la contaminación artificial con el hongo *F. moniliforme*, y por ende un contenido muy variado de  $FB_1$ .

La comparación efectuada con las referencias de los E.U., para ambas variedades, se debe a que en nuestro país no existen niveles de regulación en lo que a fumonisinas compete, existe de manera específica la Norma Oficial 147-SSAI-1996, pero dicha Norma es para aflatoxinas.

A partir de los resultados, cabría la posibilidad de que sólo 7 muestras de maíz pudieran ser destinadas, en un momento dado para consumo humano, en sus distintos canales de comercialización, ya que las concentraciones obtenidas fueron menores a las señaladas en las referencias.

Está latente, además, la posibilidad de destinar estas muestras de maíz hacia el consumo de animales de crianza y ganado en general, aunque no es del todo

## V. - RESULTADOS Y DISCUSIÓN

factible porque habría de verificarse el destino final específico, ya que los niveles permisibles están situados en una gama de concentraciones más amplia.

Por lo que respecta a la cuestión estadística, se aprecia que no existe diferencia significativa al analizar la variable "Variedad", sin embargo al analizar la variable "Muestra", resulta ser altamente significativa, en primer lugar porque en ese grupo de muestras se presentan concentraciones de  $FB_1$  muy diferentes entre sí y en segundo lugar uno de los factores que presumiblemente influya en los niveles considerablemente altos de estas muestras, lo constituye el hecho de que provienen del ciclo de cosecha Primavera-Verano (P-V), recordando que las lluvias constituyen un factor que incide en la proliferación de la toxina, aunque lo anterior no se pueda contrastar experimentalmente debido a que se carece de muestras cosechadas en el otro ciclo Otoño-Invierno (O-I).

Por otro lado resalta el hecho de que la muestra empleada como testigo blanco, proviene del mismo ciclo (P-V), originaria de Toluca, Estado de México, presenta una concentración algo mayor a las 15 ppm y fue obtenida en un expendio comercial de la ciudad de México y potencialmente sería destinada a consumo humano, superando por mucho las 4 ppm permitidas para este fin.

Finalmente, se puede apreciar con claridad que a partir del hipotético caso de que las muestras hayan sido inoculadas con *F. moniliforme* en idénticas condiciones, se aplicó la misma concentración y tipo de fertilizante, la misma cantidad y tipo de herbicida, se irrigaron por igual y con la misma frecuencia, se colectaron en la misma fecha y se mantuvieron en las mismas condiciones de almacenamiento, se presentaron diferentes niveles de contaminación de toxina, lo cual puede atribuirse

## V. - RESULTADOS Y DISCUSIÓN

un tanto a la manera aleatoria en que se haya efectuado la toma de muestras, y desde luego a la evidente complejidad de la matriz alimenticia.

La prueba de Duncan nos permite apreciar que de las 78 comparaciones individuales dentro de las muestras blancas, 41 de ellas resultan con diferencia significativa a un nivel de  $\alpha = 0.05$ , lo que corresponde al 52.56 % de las muestras y que en parte corrobora por qué de la diferencia tan significativa.

### ❖ *Discusión de resultados de las muestras en el porcentaje de daño por hongo.*

Un aspecto más que decidimos considerar para efectuar un análisis estadístico, lo constituyó el parámetro del porcentaje de daño por hongos, apreciando que en promedio, las muestras de la variedad amarilla presentaron un % de daño por hongo ligeramente mayor con relación a las muestras blancas (6.77 % contra 5.23 % respectivamente).

En general, la importancia de este parámetro, daño por hongo, radica en que nos permite establecer una clasificación para determinada muestra, con base en una serie de elementos señalados en las Normas.

Dichas Normas comprenden una clasificación del maíz, con base en la suma de daños que pudiera presentar una muestra, tales como granos quebrados, material extraño, granos de diferente color, daño por hongo, etc., y para el aspecto de daño por hongo, en particular, se sometió a análisis estadístico para establecer, en un momento dado, alguna posible relación entre el contenido de FB<sub>1</sub> y este % de daños, sin obtener datos que así lo estimaran.

Las clasificaciones comprenden cinco categorías México 1 al 4 y Comercial. En la clasificación México 1, la suma de estos daños oscila entre el 1 y 3 %, en México

2, cuando esta suma va del 3 al 5 %, en México 3 la suma de daños es de 5 a 7 % y como México 4 cuando dicha suma oscila de 7 a 10 %; las muestras que superan el 10 % de suma de daños se clasifican como maíz comercial.

De ello podemos apreciar que existe una mayor cantidad de muestras clasificadas en el rubro Comercial en el grupo de Amarillas, con cinco de 13 muestras, es decir un 38.46 %, mientras que en el lote de muestras Blancas sólo una de ellas recibe tal asignación, apenas el 7.6 %.

De ello se puede mencionar que, aún sin una relación marcadamente clara, las muestras Amarillas presentan una concentración de  $FB_1$  ligeramente mayor, y además una cantidad mayor de sus muestras queda clasificada en la categoría comercial y a su vez presentan un porcentaje mayor en el aspecto del daño por hongo.

Basta recordar que el maíz al presentar fracturas, fragmentaciones, deterioro en el endospermo, presencia de colonias o coloraciones diferentes, es más susceptible a cualquier tipo de contaminación, en este caso en donde se realizó en campo la inoculación artificial con el hongo *F. moniliforme*, es lógico obtener como resultado una amplia gama de niveles en la concentración de  $FB_1$ .

#### ***Eficiencia de la columna cromatográfica***

Este parámetro descrito como N, implica la medición de la anchura del pico a la mitad de la altura, efectuada con una  $\lambda = 254$  nm. Para esta columna se empleó como referencia una solución de nitrato de sodio 1 M y verificamos su tiempo de retención. Por otro lado se empleó una solución de fenantreno en concentración

## V. - RESULTADOS Y DISCUSIÓN

idéntica al nitrato, para establecer la eficiencia de la columna a través de sus respectivos tiempos de retención.

Llevamos a cabo el uso de la siguiente relación:

$N = 5.54 (tr / W)^2$             donde tr es el tiempo de retención de cada uno de los compuestos.

W se refiere a la medición de la anchura del pico a la mitad de la altura (parámetro que proporciona el cromatograma expresado en segundos). El tiempo de retención empleado debe ser corregido respecto el tr de la muestra (en este caso fenantreno) y el tr del nitrato de sodio. A partir de ello se obtuvo lo siguiente:

Tiempo de retención para el fenantreno = 10.567 minutos, área del cromatograma para el fenantreno = 13800; el tiempo de retención del nitrato de sodio es de 3.377 minutos, área del cromatograma para el nitrato de sodio = 5400

Tiempo de retención ajustado = 7.190 minutos

W es de 9.3 segundos lo cual equivale a 0.155 minutos.

$$N = 5.54 (7.190 / 0.155)^2 = 11920.76$$

Y a partir de ello, por una regla de tres:

13800-----100 %            de ello se obtiene el **86.39 %**

11920.76----- X %

Lo cual indica que la eficiencia de la columna, en apariencia baja, nos proporcionó una buena separación de la fumonisina, en virtud de que solamente separamos un compuesto, el % hubiese sido muy bajo si nuestra intención hubiera sido separar más de dos compuestos.

**Curva de calibración**

La curva de calibración para la presente cuantificación se elaboró a partir de la disolución madre cuya concentración original corresponde a 100 ppm del estándar de FB<sub>1</sub>, elaborando las diluciones pertinentes y considerando un perfil de concentraciones entre 0.50 hasta 10 ppm de FB<sub>1</sub> e inyectando por triplicado cada punto, graficando el promedio de cada serie (Figura 3).



**Figura 3. Curva de calibración de FB<sub>1</sub>**

Los parámetros obtenidos de esta curva fueron los siguientes: -

$$R = 0.99974354; R^2 = 0.99948714; m = 1116726.1 \text{ y } b = 102466.652$$

Por lo que se refiere a la reproducibilidad y de acuerdo con los resultados obtenidos, podemos estimar que esta técnica lo es, en virtud de que se obtuvo una  $\sigma$  apenas superior al 8 %, porque estadísticamente se acepta si dicho valor es menor al 10 %, dependiendo de otros factores como la naturaleza de la matriz.

En la tabla 3 se pueden apreciar las concentraciones de FB<sub>1</sub> empleadas en la elaboración de la curva de calibración, el perfil obtenido en los tiempos de retención y las diferentes áreas obtenidas en cada caso.

**Tabla 3. Concentraciones, áreas y tiempos de retención de la curva de calibración**

ppm FB <sub>1</sub>	AREAS	Tiempo.Ret. (minutos)
0	0	0
0.5	824052	5.862
1	1244765	5.917
2	2292453	6.030
5	5678130	5.863
6	6710690	5.904
10	11326966	5.914

**Porcentaje de recuperación de la muestra**

Para establecer este parámetro, se procedió a “contaminar” artificialmente una muestra de maíz, que previamente se sometió a análisis cromatográfico, en este caso la muestra de maíz amarillo testigo, y en la que no se detectó FB<sub>1</sub>, la cual ya molida se llevó a un matraz Erlenmeyer con 95 mL del solvente de extracción, en este caso metanol agua (75+25) y 5 mL del estándar de FB<sub>1</sub> con una concentración de 100 ppm.

Se procedió a extraer la toxina con el método antes señalado para muestras de maíz a través del baño en el sonicador, la centrifugación, verificación del pH del extracto, aplicación en cartuchos y toma y evaporación de alícuota. Lo anterior se efectuó por 5 veces obteniendo una recuperación del **70.35 %** con una desviación estándar ( $\sigma$ ) = 1.57.

#### 5.4 Análisis de los espectros de masas

A través de los análisis de los espectros de masas podemos apreciar, en primer término, los picos generados por la matriz que en este caso corresponde al alcohol nitrobenílico, el cual se aprecia en la región de las 154 unidades  $m/z$ , ( $153 + 1$ ) y sobresale otro pico hacia las 136 una propio de la degradación del grupo funcional OH y uno más en 139 una que debe pertenecer a la degradación de un grupo  $CH_2$ , siendo éstos los de mayor abundancia en lo que a porcentaje se refiere, tal como se muestra en la Figura 4.

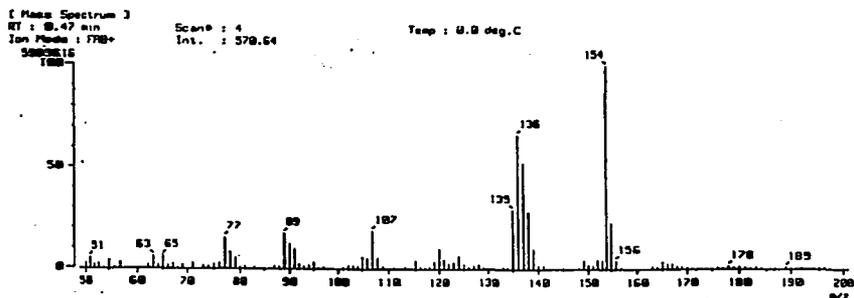
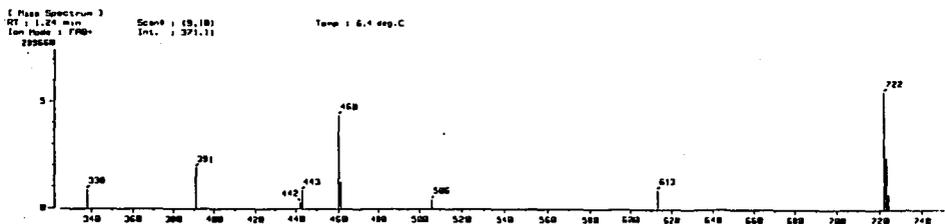


Figura 4. Espectro de masas de la matriz (alcohol nitrobenílico)

En segundo término se aprecia en el espectro de la  $FB_1$  un pico considerablemente abundante, del orden de casi 60 % referido a un estándar cuya concentración correspondió a las 2.0 ppm. En él podemos corroborar lo

## V.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

mencionado anteriormente en el sentido de que debido a la serie de colisiones presentadas, se efectúa una transferencia de un átomo de hidrógeno, dando como resultado la  $FB_1$  protonada y ese pico sobresaliente corresponde al peso molecular de la  $FB_1$  del orden de 721 uma y se muestra en el espectro un pico en 722, es decir la relación de  $M + 1$ . Debido una serie continua de colisiones, la molécula de  $FB_1$  se ve sometida a más interacciones iónicas, lo que lleva consigo la formación de un producto más con peso correspondiente a 728 uma, con un porcentaje de abundancia relativo menor al 10 %, tal como se muestra en la Figura 5.



**Figura 5. Espectro de masas de  $FB_1$  en concentración de 2 ppm**

Para las muestras analizadas, a través de FAB y la subsecuente confirmación de la estructura de la  $FB_1$ , en dos de ellas se permite apreciar un pico separado en 722 m/z, correspondiente al pico del ión molecular que es el que nos proporciona el peso molecular del analito, los espectros corresponden a las muestras Amarillo

47 y Blanco 10, obteniendo respectivamente una abundancia relativa del 30 y del 10 %, como se puede apreciar en las Figuras 6 y 7.

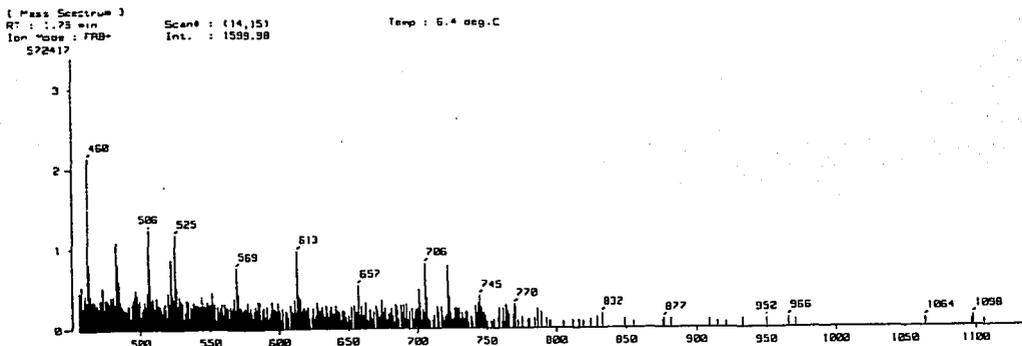


Figura 6. Espectro de masas de la muestra de maíz Amarillo 47

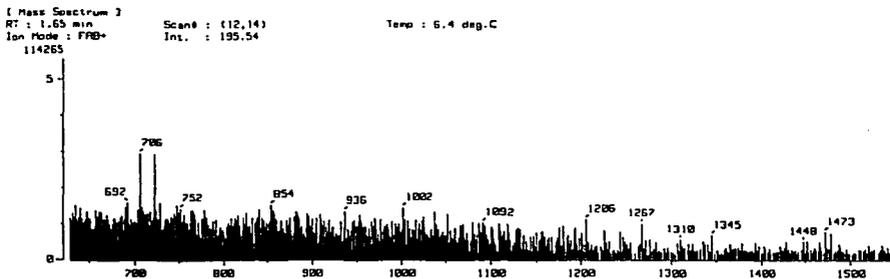


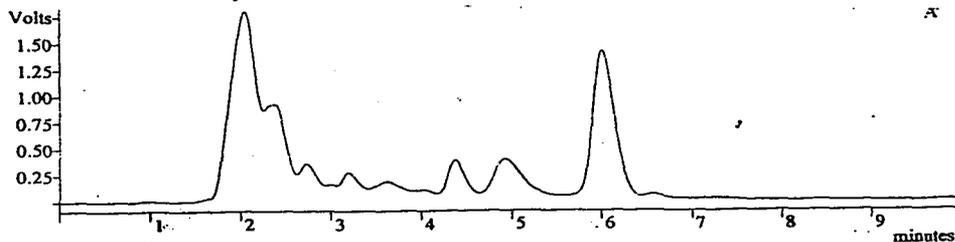
Figura 7. Espectro de masas de la muestra de maíz Blanco 10

En ellas fue totalmente más clara y definida la confirmación de la estructura de la FB<sub>2</sub> con un pico mostrado en la región de las 706 uma., aunado a que en la proximidad de esa zona se presentan una serie de picos poco abundantes y no muy separados.

### 5.5 Análisis de los cromatogramas

Del análisis de los cromatogramas podemos señalar que en el caso del estándar de referencia, cuya concentración corresponde a 2 ppm, se observa un pico muy poco definido al inicio, que aparece también en las muestras de maíz y que aparece también al correr un blanco del reactivo de OPA, por lo que se forma un compuesto con fluorescencia, totalmente separado del derivado de interés que se forma con la FB<sub>1</sub> y que corresponde al 1-metil-2-alquiltioisindol, este compuesto produce el pico presentado muy cerca de los 6 minutos en el cromatograma, y que finalmente fue analizado en las condiciones de operación ya señaladas, con un tiempo de análisis total de 10 minutos y que corresponde al cromatograma presentado en la Figura 8.

Es necesario señalar que las condiciones de uso del equipo fueron: flujo de la fase móvil de 1 mL / minuto,  $\lambda$  de emisión = 440 nm,  $\lambda$  de excitación = 334 nm, detector de fluorescencia Varian modelo 9075, tiempo de retención de la muestra de 6.030 minutos y un área de 2493337 unidades.

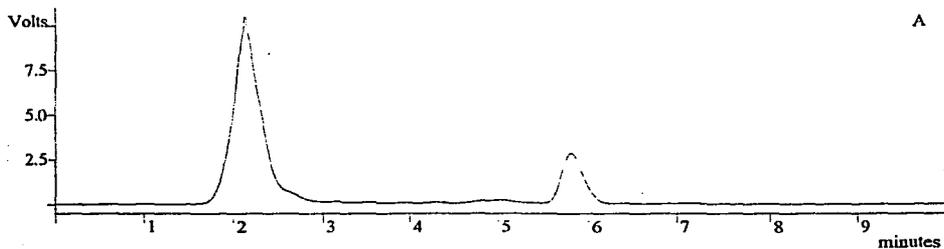


**Figura 8. Cromatograma del estándar de FB<sub>1</sub> de concentración 2 ppm**

(Tiempo de retención = 6.030 min., Área = 2493337)

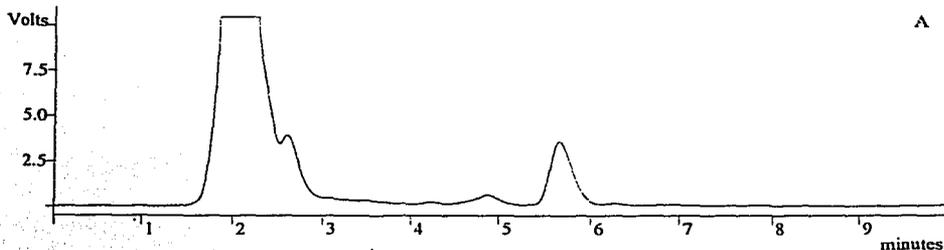
## V.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

También se presentan otros dos cromatogramas que pertenecen a las muestras de maíz Amarillo 47 y Blanco 10. En este caso, se presentan los picos de FB<sub>1</sub> en una zona ligeramente menor a los 6 minutos y que, a diferencia del estándar que lo presentó en casi 6 minutos, se debe atribuir al propio manejo del equipo, limpieza de la tubería, incrustaciones de sales, cierto taponamiento de la columna que incrementa la presión, etc. El área bajo la curva de la muestra de maíz Amarillo 47 fue de 5120043 unidades, exhibiendo un tiempo de retención de 5.821 minutos, la Figura 9 describe gráficamente lo anteriormente señalado.



**Figura 9. Cromatograma de la muestra de maíz Amarillo 47**

(Tiempo de retención = 5.821 min., Área = 5120043)



**Figura 10. Cromatograma de la muestra de maíz Blanco 10**

(Tiempo de retención = 5.683 min., Área = 6056388)

## V. - RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 10 puede apreciarse, finalmente, el cromatograma correspondiente a la muestra de maíz Blanco 10, cuyo tiempo de retención fue de 5.683 minutos, con un área de 6056388 unidades y las condiciones del equipo ya descritas,  $\lambda$  emisión = 440 nm,  $\lambda$  excitación = 334 nm, flujo 1 mL / min.

## **VI CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

### **6.1 Conclusiones**

☐ De acuerdo con la metodología empleada y, siguiendo las recomendaciones del AOAC y de la IUPAC, fue posible aislar, identificar, detectar y cuantificar a la Fumonisina B<sub>1</sub> en las diversas muestras de maíz empleando Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.

☐ Del presente estudio realizado puede señalarse que en las muestras de maíz de valor acrecentado, se pudo determinar en ellas el contenido de FB<sub>1</sub>, ya que todas las muestras analizadas fueron positivas en su contenido, a excepción de dos muestras empleadas como testigo, maíz Sinaloa amarillo y maíz azul de Milpa Alta.

☐ En la presente investigación, la concentración obtenida de FB<sub>1</sub> en maíz varió de 0.65 hasta 38.59 ppm en el caso de las muestras blancas y de 0.19 hasta 33.70 ppm para las muestras amarillas, encontrando adicionalmente que no existe una relación aparente entre el contenido de esta micotoxina con el contenido de humedad, grasa, proteína, cenizas ni carbohidratos.

## VI.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

☐ La muestra que presentó la mayor concentración de  $FB_1$  fue la Blanco 10 con 38.59 ppm, sin embargo, el contenido promedio de la toxina es ligeramente mayor en las muestras de variedad Amarilla con relación a las Blancas, además en estas hay mayor proporción de muestras clasificadas como "Comercial" y hay mayor porcentaje de muestras ubicadas en el rubro de "Daño por Hongo".

☐ El método empleado fue lineal dentro del intervalo de concentraciones estudiadas ( $r = 0.9997$ ), con un rendimiento de extracción promedio superior al 70 %, preciso (obteniendo coeficientes de variación menores al 8 %), simple y rápido (una muestra es analizada en solamente diez minutos) y con un límite de detección experimental de 0.25 ppm., el cual es menor que el señalado por AOAC-IUPAC, ubicada en 0.80 ppm.

☐ Se empleó como método de confirmación un Análisis de Espectrometría de Masas, a través de la técnica de FAB, el cual presenta la fragmentación única de cada compuesto y con ello nos permitió corroborar la presencia de la toxina en las muestras de maíz.

### **6.2 Recomendaciones**

Las muestras analizadas proporcionadas por el CIMMYT, provienen del ciclo de cosecha Primavera-Verano 1999, por lo que sería recomendable realizar un muestreo y análisis que incluya muestras de maíz del otro ciclo, es decir, del Otoño-Invierno del mismo año, y contrastar los resultados experimentalmente.

Las principales acciones a desarrollar a corto y mediano plazo son: establecer un método analítico oficial que permita la cuantificación de esta toxina en cereales, derivados y alimentos en general, desarrollar estrategias de control útiles, evaluando a fondo los alcances de este tipo de contaminación y de igual forma, implementar métodos de prevención que sean económicamente viables.

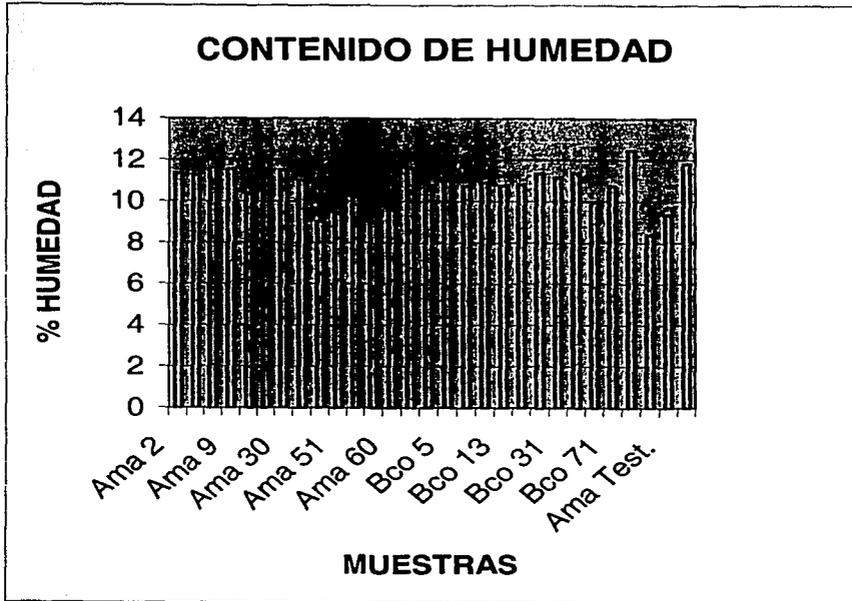
Proponer niveles de tolerancia específicos de fumonisinas en alguna Norma de alimentos derivados del maíz, o bien desarrollar una Norma Oficial mexicana particular para fumonisinas.

ANEXOS

**ANEXOS**

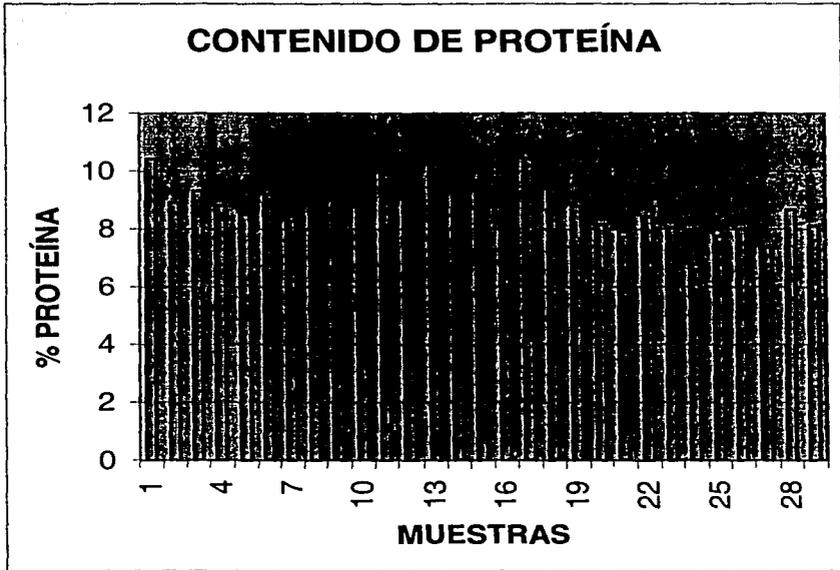
ANEXO 1. GRAFICAS.

GRAFICA 3



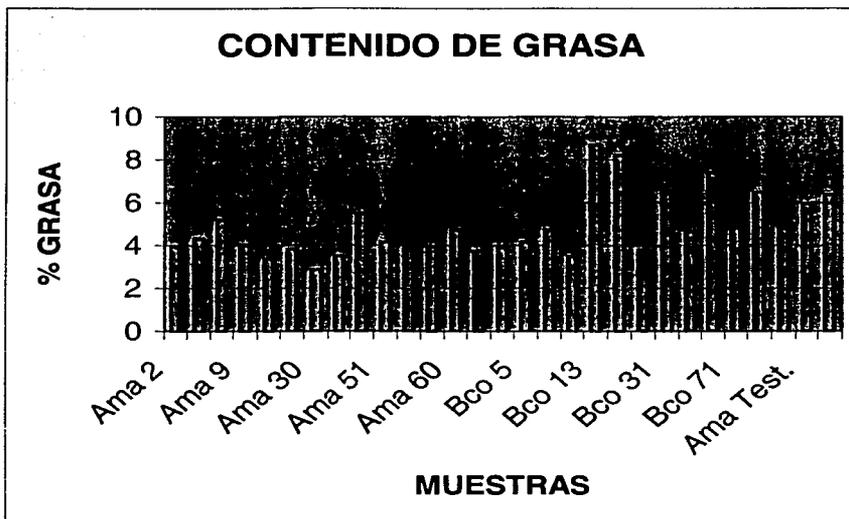
Contenido de Humedad en muestras Mejoradas y Testigo

GRAFICA 4



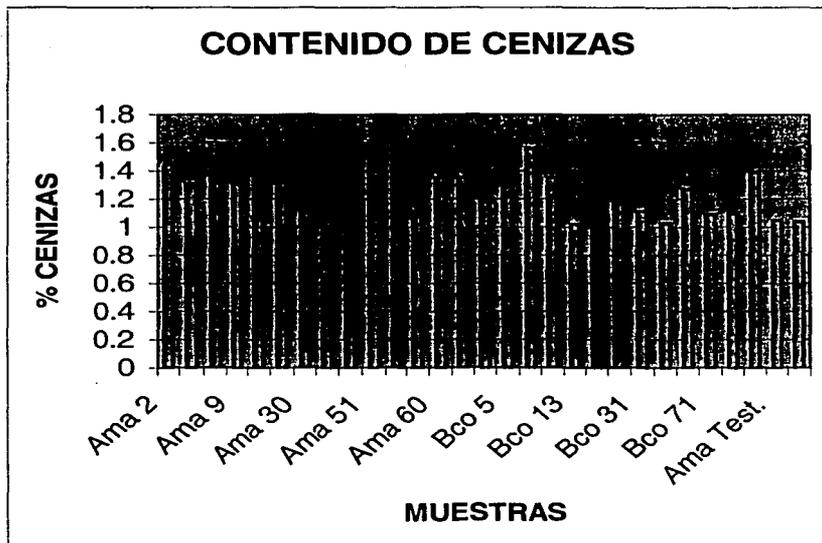
**Contenido de Proteína en muestras Mejoradas y Testigo**

GRAFICA 5



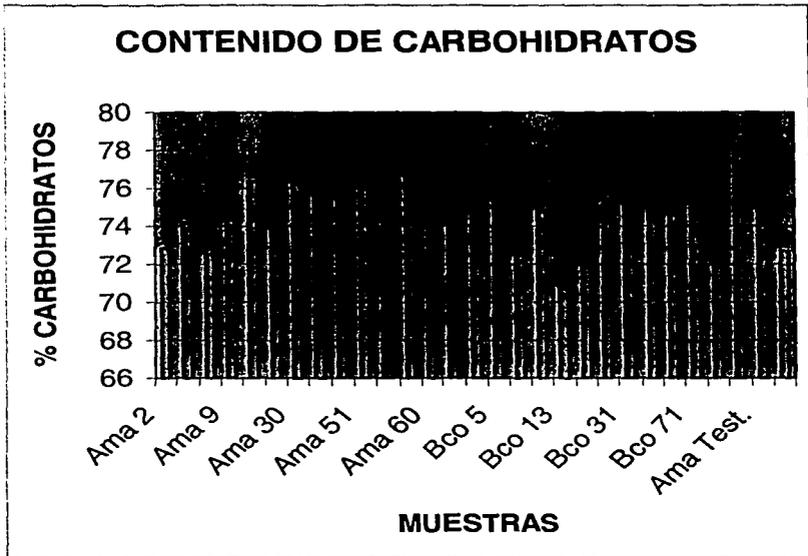
**Contenido de Grasa en muestras Mejoradas y Testigo**

GRAFICA 6



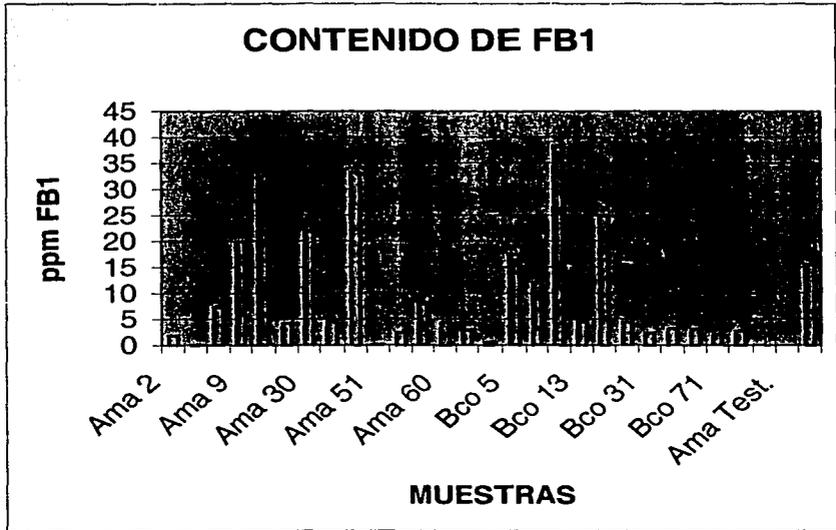
**Contenido de Cenizas en muestras Mejoradas y Testigo**

GRAFICA 7



**Contenido de Carbohidratos (por diferencia) en muestras Mejoradas y  
Testigo**

GRAFICA 8



**Contenido de FB<sub>1</sub> en muestras Mejoradas y Testigo**

## ANEXO 2 TRATAMIENTO EN CAMPO Y CARACTERISTICAS DEL MAIZ

### **FERTILIZACIÓN.**

Se emplearon dos fertilizantes que fueron mezclados y aplicados al voleo: Sulfato de Amonio (como fuente de nitrógeno) y Superfosfato triple (como fuente de fósforo). Después fueron incorporados con dos pasos de rastra de discos antes de surcar. La dosis inicial de fertilizante fue de 135-50-00, lo cual quiere decir que por hectárea (ha) se aplicaron 135 Kg de N + 50 Kg de  $P_2O_5$ . La fuente de nitrógeno,  $(NH_4)_2SO_4$ , contiene 20.5% de N, mientras que el  $P_2O_5$  contiene 46% de Fosfatos. La fecha de aplicación fue el día 20 de junio de 1999.

La segunda fertilización fue aplicada el día 28 de julio de 1999 y correspondió a una proporción de 140-50-00.

Finalmente, la tercera y última fertilización se aplicó un mes después en una proporción de 275-50-00.

### **RIEGO DE GERMINACIÓN.**

Se efectuó el día 25 de junio de 1999, en un riego por aspersión durante un periodo de 5 horas.

### **APLICACIÓN DE HERBICIDA.**

Efectuada el 26 de junio de 1999 con aspersor de mochila en forma total. Se empleó el herbicida selectivo para maíz "Primagram 500 FW" en dosis de 6L /ha y un volumen de aplicación de 400 L/ha. Este es un herbicida preemergente a la maleza y al cultivo y, comercialmente es una mezcla de dos herbicidas, la atrazina

(23.3%) para controlar malezas anuales de hoja ancha, y el metacloro (23.3%) para controlar malezas anuales de hoja angosta.

Tabla 4. DATOS METEOROLÓGICOS JUNIO A OCTUBRE DE 1999

MES	JUNIO				JULIO				AGOSTO			
DIA	MAX.	MIN.	HUM.	PRE.	MAX.	MIN.	HUM.	PRE.	MAX.	MIN.	HUM.	PRE.
1	36.8	18.2	90.0	0.0	32.4	20.0	95.0	0.0	33.0	19.0	93.0	0.0
2	36.8	20.0	77.0	0.0	32.4	19.0	95.0	7.0	31.2	18.2	97.0	2.4
3	37.0	21.8	73.0	0.0	29.8	20.0	95.0	23.4	31.4	15.0	94.0	3.6
4	37.2	22.0	73.0	0.0	29.8	19.0	95.0	10.3	31.6	17.8	97.0	13.3
5	37.0	21.4	82.0	0.0	25.6	19.0	95.0	20.9	31.6	16.0	95.0	0.0
6	37.2	22.0	82.0	0.0	28.6	17.0	95.0	0.7	31.6	18.8	95.0	4.4
7	37.0	22.0	90.0	4.4	28.6	17.0	97.0	12.1	31.6	17.0	90.0	0.0
8	37.2	21.0	88.0	0.3	29.4	16.0	95.0	0.0	30.0	18.6	97.0	0.0
9	37.0	19.2	97.0	17.3	31.6	19.4	95.0	0.0	31.2	18.0	95.0	24.6
10	37.2	19.0	95.0	3.0	31.4	17.0	92.0	2.2	30.0	20.0	95.0	6.4
11	37.2	22.4	88.0	0.0	30.8	18.0	95.0	6.7	30.0	18.0	95.0	3.1
12	37.2	18.0	95.0	2.5	30.8	18.0	95.0	0.0	30.2	19.8	95.0	8.5
13	37.2	20.8	90.0	0.0	27.8	20.0	92.0	0.0	30.2	17.0	97.0	2.5
14	37.0	18.0	95.0	15.8	32.0	11.0	97.0	0.0	29.8	17.0	94.0	0.0
15	29.4	20.4	93.0	1.0	31.0	17.0	95.0	0.0	30.4	14.0	97.0	0.0
16	31.8	18.0	95.0	13.4	31.0	17.0	95.0	3.0	31.0	19.6	86.0	0.0
17	31.2	21.0	90.0	0.0	31.0	18.0	97.0	0.0	31.8	20.0	97.0	0.0
18	32.0	20.0	90.0	0.0	31.6	18.0	95.0	34.0	31.8	19.4	95.0	36.2
19	34.2	23.4	82.0	0.0	28.8	19.6	95.0	20.0	31.8	18.0	97.0	5.0
20	34.2	20.0	90.0	0.0	29.0	17.0	95.0	7.4	29.0	19.2	95.0	4.0
21	34.2	20.4	93.0	1.7	30.8	20.6	81.0	0.0	29.6	19.2	95.0	3.2
22	34.0	18.0	95.0	36.5	30.8	17.0	95.0	0.0	30.4	20.8	95.0	0.0
23	32.4	21.0	95.0	0.5	31.4	15.4	88.0	0.0	31.2	19.0	95.0	0.5
24	32.4	20.0	93.0	12.1	31.4	15.0	94.0	0.0	29.6	18.8	95.0	26.3
25	29.4	20.6	95.0	10.5	31.2	17.0	95.0	0.0	29.6	18.0	95.0	30.9
26	29.2	19.0	95.0	6.3	31.4	18.0	88.0	0.0	29.4	19.0	95.0	1.8
27	28.8	19.8	90.0	0.0	30.6	17.6	90.0	0.0	29.8	19.0	95.0	1.8
28	31.6	17.0	95.0	32.2	32.6	16.0	87.0	0.0	29.0	20.4	95.0	2.0
29	31.8	19.4	95.0	0.0	32.8	18.0	97.0	1.8	30.8	19.0	95.0	5.3
30	33.0	18.0	95.0	3.7	32.8	19.0	92.0	6.0	29.6	20.0	95.0	0.0
31					32.8	19.6	95.0	5.0	31.0	18.0	95.0	19.2

MES	SEPTIEMBRE				OCTUBRE			
DIA	MAX.	MIN.	HUM.	PRE.	MAX.	MIN.	HUM.	PRE.
1	30.0	20.0	97.0	10.3	30.6	18.2	95.0	14.1
2	30.4	18.0	97.0	55.3	30.6	18.0	95.0	11.2

## ANEXOS

3	30.8	20.4	93.0	6.2	29.8	19.0	95.0	10.6
4	30.8	18.0	95.0	1.9	29.8	17.0	95.0	0.0
5	30.8	20.0	95.0	28.3	26.6	19.8	95.0	6.7
6	30.6	19.0	95.0	11.2	26.6	18.0	95.0	7.5
7	30.6	20.0	97.0	10.0	28.4	20.4	95.0	0.0
8	30.6	18.0	95.0	1.0	29.4	17.0	95.0	3.8
9	29.0	20.6	93.0	0.0	30.6	19.6	90.0	4.7
10	30.0	19.0	95.0	2.2	30.6	19.0	95.0	1.0
11	30.6	17.8	97.0	17.0	30.8	19.8	95.0	0.0
12	30.6	17.0	97.0	36.4	30.8	15.0	90.0	0.0
13	30.6	17.2	95.0	2.6	30.2	15.8	97.0	0.0
14	30.6	18.0	95.0	0.3	30.4	15.0	97.0	1.3
15	30.8	19.0	95.0	0.0	29.6	18.2	97.0	0.0
16	30.8	17.0	97.0	6.0	30.0	16.0	95.0	0.0
17	31.8	18.8	97.0	0.0	30.0	20.6	95.0	0.0
18	31.8	18.0	97.0	0.7	30.8	18.0	92.0	0.0
19	31.0	20.0	97.0	5.4	30.6	19.0	90.0	0.0
20	31.0	17.0	95.0	0.0	30.6	16.0	95.0	0.0
21	30.6	14.4	97.0	0.0	30.6	16.8	94.0	0.0
22	30.6	13.0	97.0	0.0	30.6	13.0	94.0	0.0
23	30.6	16.6	97.0	0.0	30.6	10.6	94.0	0.0
24	30.6	18.0	97.0	0.0	30.4	8.0	93.0	0.0
25	31.6	18.2	97.0	0.0	28.2	8.0	93.0	0.0
26	31.6	18.0	97.0	0.0	28.2	7.0	89.0	0.0
27	32.0	18.2	97.0	0.0	26.0	7.0	93.0	0.0
28	32.6	18.0	97.0	0.0	28.0	8.0	97.0	0.0
29	28.8	20.6	95.0	0.0	28.8	7.0	97.0	0.0
30	29.0	12.0	85.0	0.0	29.4	10.0	94.0	0.0
31					29.6	10.0	97.0	0.0

**MAX. y MIN.** hacen referencia a las temperaturas registradas esos días, máxima y mínima.

**HUM.** Se refiere a la Humedad Relativa reportada por el CIMMYT esos días.

**PRE.** Se refiere a la Precipitación pluvial, medida en mm, registrada esos días por el CIMMYT.

**ANEXO 3 TECNICAS DEL ANALISIS QUIMICO PROXIMAL**

*Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists-AOAC-1995.*

**CENIZAS.**

Pesar de 3 a 5 g de muestra en un crisol previamente tratado (pre-tratamiento para el crisol y meterlo a la mufla entre 550° a 600°C por dos horas, retirar de la mufla y dejar enfriar en desecador a temperatura ambiente, pesar y utilizar a partir del equilibrio de temperatura), procurar no sobrepasar la mitad del crisol.

Calcinar la muestra carbonizando primero con mechero hasta que no se desprendan humos.

Introducir a la mufla cuidando que la temperatura no exceda los 550°C. Suspender el calentamiento cuando las cenizas estén blancas o grises. alrededor de 3 a 4 horas después (si se observan puntos negros, se humedecen con unas gotas de agua destilada, secándose posteriormente en la estufa a 130°C y se vuelve a calcinar). Enfriar en desecador y pesar, haciéndolo mínimo por duplicado.

$$\%CENIZAS = (A-B/M)*100$$

Donde A = es el peso del crisol con las cenizas.

B = es el peso del crisol vacío.

C = es el peso de la muestra (g).

**HUMEDAD.**

Pesar de 2 a 3 g de muestra en un pesafiltro con tapa el cual previamente ha sido pesado y colocado a peso constante en la estufa por 2 horas a 130°C. Secar la muestra por espacio de una hora en la estufa a dicha temperatura; retirar y dejar enfriar en un desecador hasta temperatura ambiente y enseguida se pesa la muestra. Se reporta como pérdida por secado a 130°C y se hace mínimo por duplicado.

$$\% \text{HUMEDAD} = (A-B/M) \cdot 100$$

A = pesafiltro + muestra.

B = pesafiltro + muestra después de secar.

M = peso de la muestra (g).

**EXTRACTO ETEREO (Grasa Cruda).**

Colocar un vaso para equipo Goldfisch a la estufa a 100°C hasta peso constante, aproximadamente 2 horas. Pesar 4 a 5 g de muestra sobre un papel, enrollarlo y colocarlo en un cartucho de celulosa, tapar con algodón. Situar el cartucho en un sostén o recipiente de fondo perforado y colocarlo en el contenedor del equipo.

Adicionar en el vaso para Goldfisch aproximadamente 40mL de éter etílico y colocarlo en el equipo mediante un anillo metálico con empaque. Subir la parrilla girando hacia un lado y posteriormente hacia el otro.

Calentar hasta extracción completa de la grasa, para ello dejar caer una gota de la descarga sobre un papel filtro, de tal manera que al evaporarse el éter no debe dejar residuo de grasa.

**ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA**

Al finalizar, cambiar el contenedor del cartucho por un recipiente sin perforación y se continúa calentando para recuperar el éter. Quitar el vaso del equipo y secar el extracto a 100°C por espacio de 30 minutos, enfriar y pesar.

Calcular el % de Grasa, analizando mínimo por duplicado.

$\% \text{ EXTRACTO ETereo} = [(A-B)/C] \times 100$

A = Vaso Goldfisch con extracto.

B = Vaso Goldfisch vacío.

C = peso de la muestra (g).

#### ***PROTEÍNA CRUDA. (Método de Kjeldahl).***

Se pesan de 0.5 a 1.0 g de muestra en un papel delgado, agregando 0.3g de Sulfato de cobre pentahidratado + 5g de Sulfato de sodio o potasio y se introducen en un matraz Kjeldahl de 800mL al cual se agregan 15mL de Ácido sulfúrico concentrado y se añaden piedras de ebullición.

El matraz se coloca en el digestor del equipo Kjeldahl y se calienta hasta la total destrucción de la materia orgánica, esto es hasta que el líquido quede transparente con una coloración azul verdosa.

Se deja enfriar a temperatura ambiente, se diluye con 350mL de agua destilada fría y se enfría sobre hielo.

En un matraz Erlenmeyer de 500mL se adicionan 50mL de Ácido Clorhídrico 0.1N y unas gotas del indicador Rojo de Metilo. Colocar el matraz en el aparato de destilación cuidando de introducir la alargadera hasta el fondo de la solución.

Añadir lentamente y resbalando por la pared del matraz Kjeldahl 40mL de una solución concentrada de Hidróxido de sodio (1:1) enfriada previamente sobre hielo. Adicionar polvo de zinc, conectar inmediatamente el matraz a la trampa del Kjeldahl y agitar hasta mezclar las dos capas.

Destilar hasta un volumen de 150mL, retirar el Erlenmeyer, lavar la alargadera recogiendo sobre el destilado las aguas de lavado.

Titular el exceso de ácido con una solución de Hidróxido de sodio 0.1N y efectuar además una prueba en blanco empleando la misma cantidad de papel.

Calcular el % de Proteína, de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Nitrógeno} = (A-B)(C)(D)(100)/M$$

A = Volumen gastado en la titulación por el blanco.

B = Volumen gastado en la titulación por la muestra.

C = Concentración Normal del NaOH.

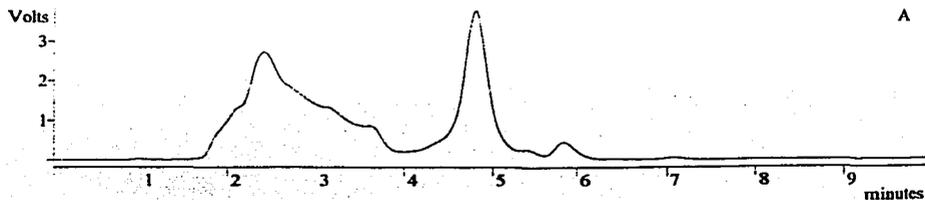
D = 0.014 que son los miliequivalentes de nitrógeno

M = peso de la muestra (g).

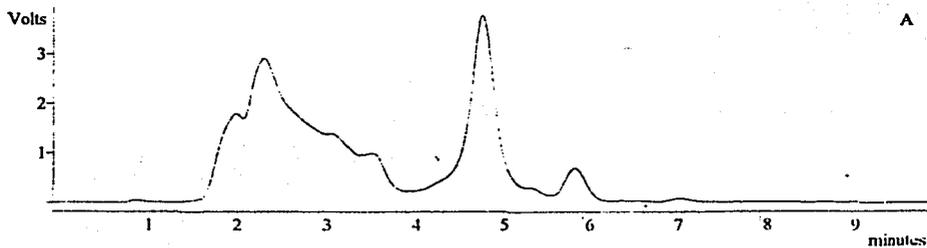
### **CARBOHIDRATOS TOTALES.**

Los Carbohidratos Totales (C.T.) se determinan por diferencia:

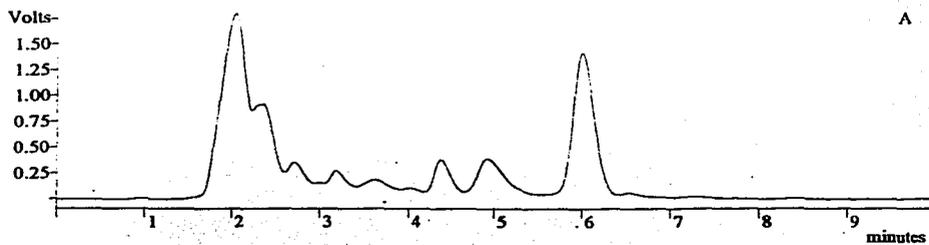
$$\% \text{ C.T.} = 100 - [\% \text{ Humedad} + \% \text{ Cenizas} + \% \text{ Proteína} + \% \text{ Extracto etéreo}].$$

**ANEXO 4. CROMATOGRAMAS DE LA CURVA DE CALIBRACION.***Cromatograma # 1 FB, Concentración 0.5 ppm.*

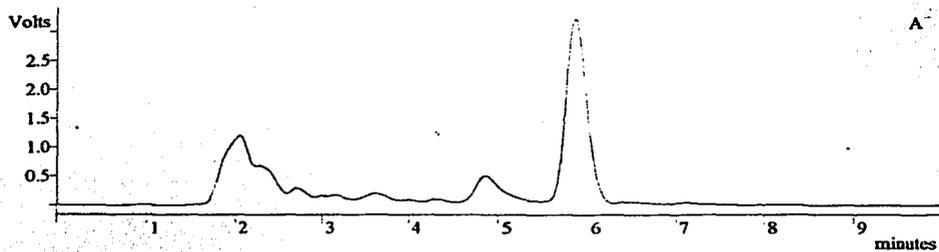
Tiempo de Retención = 5.862 min; Área = 824052

*Cromatograma # 2 FB, Concentración 1.0 ppm.*

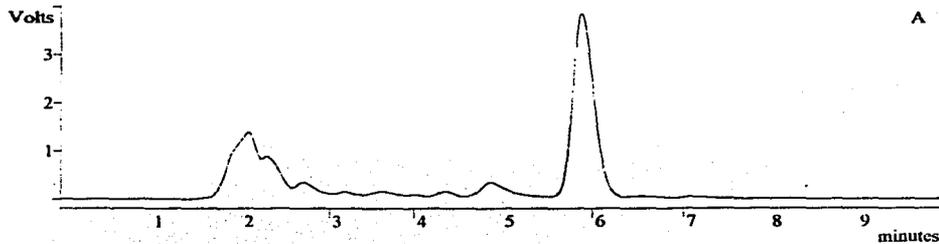
Tiempo de Retención = 5.917 min; Área = 1244765

**Cromatograma # 3 FB<sub>1</sub>, Concentración 2.0 ppm.**

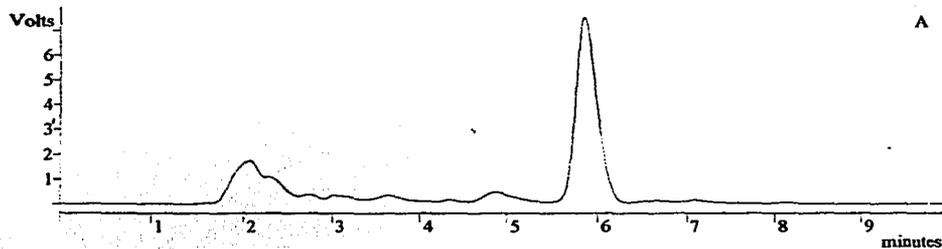
Tiempo de Retención = 6.030 min; Área = 2292453

**Cromatograma # 4 FB<sub>1</sub>, Concentración 5.0 ppm.**

Tiempo de Retención = 5.863 min; Área = 5678130

**Cromatograma # 5 FB, Concentración 6.0 ppm.**

Tiempo de Retención = 5.904 min; Área = 6710690

**Cromatograma # 6 FB, Concentración 10.0 ppm.**

Tiempo de Retención = 5.914; Área = 11326969

## VI BIBLIOGRAFÍA

- ☞ AOAC. (1995) *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*, AOAC. Horwitz, W. 16<sup>a</sup>. ed. Washington, D.C. USA.
- ☞ Bacon, C.W. & Williamson, J.W. (1992). Interactions of *Fusarium moniliforme*, its metabolites and bacteria with corn. *Mycopathologia*, 117, 65-71.
- ☞ Bullerman, L.B. (1998). Fusaria and toxigenic molds other than *Aspergilli* and *Penicillia*, Eds. Doyle, M.P., Beuchat, L.R. & Motville, T.J. In: *Food Microbiology Fundamental & Frontiers*. Eds., ASM Press, USA.
- ☞ Celma. (1998). *The International Magazine of Grain, Flour & Feed*. Octubre.
- ☞ Codex Alimentario. (1995). *Cereales, Legumbres, Leguminosas y Productos Derivados*, Vol. 7, 2<sup>a</sup>. Edición, FAO, pp. 9-18.
- ☞ Gelderblom, W.C.A., Marasas, W.F.O., Vleggar, R., Thiel, P.G. & Cawood, M.E. (1991). Fumonisin: Isolation, Chemical characterization and Toxicological Effects. *Abstract presented at the Fumonisin Symposium*, Raleigh, North Carolina, April 24 and 25.
- ☞ Hernández Rojas, M.E. (1998). *Determinación de trazas de plaguicidas organofosforados (metidation) en agua potable*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM. México, D.F.
- ☞ Hosney, R. (1988). *Principios de Ciencia y Tecnología de los Cereales*. Zaragoza, España, Editorial Acribia, pp. 16-19 y 77.
- ☞ INEGI, IX Censo Agrícola Ganadero, (2001), en <http://www.inegi.gob.mx>.

- ☞ Johnson, J.A. (1987). *Chromatographic theory and basic principles*. Ed. New York, Marcel Dekker.
- ☞ Kellerman, T.S., Marasas, W.F.O., Thiel, P.G., Gelderblom, W.C.A., Cawood, M. & Coetzer, J.A.W., (1990) Leukoencephalomalacia in Two Horses Induced by Oral Dosing of Fumonisin B<sub>1</sub>. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*. Vol. 57, 269-275.
- ☞ Lindsay, S. (1992). *High Performance Liquid Chromatography* . 2<sup>nd</sup>. Edition, Ed. John Barnes, John Wiley & sons. Londres, Inglaterra. 85-98.
- ☞ Marin, S., Sanchis, V., Viñas, I., Canela, R. Y Magan, N. (1995). Effect of the Water Activity and Temperature on Growth and Fumonisin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> production for *Fusarium proliferatum* and *Fusarium moniliforme* from maize. *Can. J. Microbiol.*, 42, 1045-1050.
- ☞ Marin, S., Sanchis, V., Ramos, A.J., Arnau, F. & Magan, N. (1998). Colonization and Competitiveness of *Aspergillus* and *Penicillium* species on Maize Grain in the Presence of *F. moniliforme* and *F. proliferatum*. *Int. J. Food Microbiol.*, 45, 107-117.
- ☞ Munkvold, G.P. & Desjardins, A.E. (1997). Fumonisin in maize. Can we reduce their occurrence? , *Plant Dis.*, 81, 556-563.
- ☞ Nelson, P.E., Toussoun, T.A. & Marasas, W.F.O. (1983). *Fusarium species. An Illustrated Manual for Identification*. The Pennsylvania State University Press. University Park and London.
- ☞ Nelson, P.E., Desjardins, A.E., Plattner, R.D. (1993). Fumonisin, mycotoxins produced by *Fusarium* species: Biology, Chemistry and Significance. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 31, 233-252.

## VI.- BIBLIOGRAFÍA

- ☞ NORMA MEXICANA NMX-FF-034-1995-SCFI (*Productos Alimenticios No Industrializados, Cereales Maíz, Zea mays L.*). Especificaciones y Métodos de Prueba.
- ☞ Osweiler, G.D., Kehrlí, M.E., Stabel, J.L., Thurston, J.R., Ross, P.F. & Wilson, T.M. (1993). *Journal Anim. Sci.*, 71, 459-466.
- ☞ Pittet, A., Parisod, V. & Schellenberg, M., (1992), *Journal of Agric. Food Chem.*, 40, 1352-1354.
- ☞ Rosiles Martínez, R., Bautista, J., Fuentes, V.O. y Ross, F. (1998). An outbreak of equine leukoencephalomalacia at Oaxaca, Mexico, associated with Fumonisin B<sub>1</sub>. *Journal of Vet. Med. A.*, 45, 299-303.
- ☞ Rottinghaus, G.E., Coatnet, C.E. & Minor, H.C. (1992). *Journal Vet. Diagn. Invest.*, 4:326-329.
- ☞ Santamaría, F.I. (1994). *Micotoxigenicidad de hongos A. flavus y F. moniliforme aislados de alimento comercial para conejos*. Tesis de Licenciatura, Facultad de Med. Vet. y Zoot., UNAM, México, D.F.
- ☞ Skoog, D. & Leary, J. (1992). *Análisis Instrumental.*, 4<sup>a</sup>. Edición, España, Editorial Mc. Graw-Hill Interamericana.
- ☞ Snyder, L.R. y Kirkland, J.J. (1979). *Introduction to modern liquid chromatography*, 2<sup>nd</sup> edition, Ed. John Wiley & sons. Inc., New York, USA 16-34
- ☞ Sydenham, E.W., Marasas, W.F.O., Shephard, G.S., Thiel, P.G. & Hirooka, E.Y. (1992). *Journal of Agric. Food Chem.*, 40, 994-997.

## VI.- BIBLIOGRAFÍA

- ☞ Sydenham, E.W., Shephard, G.S., Thiel, P.G., Stockenstrom, S. & Snijman, P.W. (1996). *AOAC-IUPAC Collaborative Study. Journal of AOAC International.*, Vol.79, No.3, 688-696.
- ☞ Wilkes, J.G. & Sutherland, G.S. (1998). *Journal of Chromatography B.*, 717, 135-156.
- ☞ Willard, H.H. y Merrit, J.R. (1988). *Métodos instrumentales de Análisis*, 6ª. Edición, Editorial Van Nostrand Company, Princeton, New Jersey, USA, 697-750.
- ☞ Wilson, T.M., Ross, P.F. & Nelson, P.E. (1991). Fumonisin mycotoxins and leukoencephalomalacia., *JAVMA*. Vol.198, No.7, p.1104.