

00524
86



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

**ANALISIS DE TOXINA T2 EN CEREALES MEDIANTE
INSERCIÓN DIRECTA EN ESPECTROMETRIA DE MASAS.**

T E S I S
PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
MARIA DEL PILAR LANDA NAVA



**EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA**

MEXICO, D. F.

2003



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

2 e

Jurado asignado

Presidente

Prof. Abel Gutiérrez Ramos.

Vocal

Prof. Adolfo García Osuna.

Secretario

Prof. Cesar Mateo Flores Ortiz.

1er. Suplente

Prof. María Alicia Hernández Campos.

2o. Suplente

Prof. Evangelina Camacho Frías.

**Este trabajo se desarrolló en la Unidad de Biología y Prototipos (UBIPRO)
de la Facultad de Estudios Superiores, Campus Iztacala.**


Mtro. Cesar Mateo Flores Ortiz.


María del Pilar Landa Nava.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mis padre Martín y Eréndira por el apoyo incondicional que nunca han dejado de brindarme, por haberme dado todo el amor, paciencia y comprensión y por permitirme llegar a realizar mis sueños.

A mis hermanas Leticia, Guadalupe, Claudia y mi sobrino Jesús por estar siempre en todo momento apoyándome.

AGRADECIMIENTOS

Al M. en C. CÉSAR MATEO FLORES ORTÍZ por darme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo así como por todas las enseñanzas y tiempo que me dedicó.

Al Biólogo Luis Barbo Hernández Portilla por su gran ayuda, paciencia y amistad que hicieron posible que este trabajo llegara a buen término.

A todos los integrantes del Laboratorio de Fisiología Vegetal y Biogeoquímica por hacer tan amena la estancia en el laboratorio así como por la ayuda que me prestaron para llevar a cabo este trabajo.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) IN210101 por el financiamiento otorgado para la realización de este trabajo.

A HELM de México S.A. por el apoyo recibido para la realización de este trabajo.

A la vida por darme la oportunidad de estar en el lugar indicado y el momento indicado para encontrar el camino que siempre busqué.

ÍNDICE

I. RESUMEN.....	1
II. INTRODUCCIÓN.....	1
III. OBJETIVOS.....	3
IV. ANTECEDENTES	
IV.1. Generalidades de las micotoxinas.....	4
IV.2. El género <i>Fusarium</i> y los tricoticenos.....	5
IV.3. Efectos biológicos y bioquímicos de los tricoticenos.....	7
IV.4. La Toxina T2.....	9
IV.5. Análisis de los tricoticenos.....	11
V. DESARROLLO EXPERIMENTAL	
V.1. METAS EXPERIMENTALES.....	16
V.2. MATERIAL Y METODOLOGÍAS	
V.2.1. Producción de Toxina T2.....	17
V.2.2. Análisis de Toxina T2 por ELISA.....	17
V.2.3. Análisis de Toxina T2 por CCD.....	18
V.2.4. Análisis de Toxina T2 por CG-MS	19
V.2.5. Curvas de Calibración Estándar.....	20
V.2.6. Análisis de Toxina T2 por Inserción Directa-MS	21
VI. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	22
VII. CONCLUSIONES.....	54
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	55

I. RESUMEN

En el presente trabajo se implementó una técnica de cuantificación de la Toxina T2 basada en la Inserción Directa al Espectrómetro de Masas. Para la validación de esta técnica se emplearon técnicas analíticas como ELISA (por sus siglas en inglés), y un estudio extenso de CG-EM (Cromatografía de Gases acoplada al Espectrómetro de Masas) en sus diferentes modos de análisis de Barrido Completo y EM/EM (por sus siglas en español). Junto con las técnicas analíticas, se utilizaron muestras de referencia de sorgo contaminado con concentraciones conocidas de Toxina T2 para este mismo fin. Los resultados obtenidos muestran que la técnica de Inserción Directa es la metodología con mayor sensibilidad, la cual es $45 \mu\text{g L}^{-1}$ y un tiempo de proceso de 65 min. La técnica de ELISA presenta una sensibilidad de $50 \mu\text{g L}^{-1}$, sin embargo no se permite el uso de esta técnica como método de prueba en las Normas de Regulación de Niveles Máximos de Micotoxinas. Durante este trabajo se realizaron múltiples ensayos con la técnica de CG-EM, obteniéndose como resultado un intervalo de sensibilidad de $50\text{-}200 \mu\text{g L}^{-1}$ y un tiempo de proceso aproximadamente de 2 horas 30 min en sus diferentes modos de análisis. La técnica que presentó el valor mayor respecto a la sensibilidad ($900 \mu\text{g L}^{-1}$) y un tiempo muy prolongado de proceso (155 min) fue la Cromatografía en Capa Delgada (CCD). Con base en los resultados obtenidos, se discute la utilidad de la técnica de Inserción Directa como una alternativa adecuada para la cuantificación de Toxina T2 en cereales.

II. INTRODUCCIÓN

Las micotoxinas son un grupo de metabolitos secundarios producidos por diferentes hongos, las cuales afectan la industria agropecuaria y especialmente la industria avícola. Desde los años 1960's, se llevó a cabo la identificación y descripción toxicológica de la mayoría de las micotoxinas de importancia, y a partir de los años 1980's y hasta la fecha, se han desarrollado técnicas analíticas cada vez más específicas y sensibles para la detección de este tipo de compuestos (Flores y Díaz de León, 1999).

En particular, los tricotecenos, son producidos por una gran variedad de hongos del género *Fusarium* como *F. poae*, *F. sporotrichioides*, etc. Este género, se presenta en la naturaleza como un grupo de saprófitos y parásitos de cereales como el trigo, maíz, cebada, avena, sorgo, arroz y centeno, así como diferentes subproductos agrícolas. La contaminación de granos y alimentos con esporas y toxinas derivadas del género *Fusarium* representa un riesgo sanitario para la salud humana y animal, además de que se ha documentado su participación en pérdidas económicas importantes (Betina, 1984).

Los signos de intoxicación por tricotecenos incluyen necrosis, diarrea y vómito. La intoxicación aguda y subaguda con este tipo de micotoxinas se caracteriza por rechazo de alimento en la mayoría de las especies, así mismo, se observa mayor susceptibilidad a padecimientos infecciosos y pérdida de peso. Particularmente, los porcinos han mostrado la mayor sensibilidad a la presencia de tricotecenos, en tanto que las aves de corral y los rumiantes presentan relativa tolerancia. De los efectos bioquímicos más importantes que presentan los tricotecenos se encuentran, la inhibición de la síntesis del Ácido Desoxirribonucleico (ADN), del Ácido Ribonucleico (ARN) y proteínas, además presentan efectos inmunosupresores y hemorrágicos (Miller y Trenholm, 1994).

Hasta ahora, se conocen alrededor de 180 tricotecenos, los cuales se dividen en dos grandes grupos, los macrocíclicos y los no-macroscíclicos. Particularmente la Toxina T2, pertenece al tipo A del grupo de tricotecenos no-macroscíclicos, los cuales están estrechamente relacionados con los sesquiterpenoides; éstos compuestos presentan un

doble enlace en la posición 9-10 del tricotieno, un anillo epóxido en los carbonos 12-13, un número variable de grupos hidroxilo y sustituciones acetoxi. A diferencia del tipo B, el tipo A no presenta grupo carbonilo en la posición C-8 (Langseth y Rundberget, 1998).

Los métodos de análisis de tricotienos han alcanzado un desarrollo incipiente debido a las dificultades asociadas a su reducida polaridad y carencia de cromóforos. En el caso específico de la Toxina T2, su identificación y cuantificación es compleja, ya que carece de enlaces conjugados que permitan su detección y cuantificación directa a través de técnicas espectroscópicas, por lo que se requieren procedimientos adicionales de derivatización para su cuantificación. Existen diferentes métodos que permiten la identificación y cuantificación de Toxina T2, distinguiéndose entre ellos diferencias de sensibilidad, tiempo de desarrollo de la técnica y costo de la instrumentación necesaria, entre ellos, se puede mencionar a la Cromatografía en Capa Delgada (CCD), Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR), ELISA, Cromatografía de Gases (CG) con distintos sistemas de detección, como Ionización en Flama (DIF), Captura de Electrones (DCE) o Espectrometría de Masas (EM). De los métodos mencionados, la Espectrometría de Masas, es considerada como la mejor opción para el análisis de la Toxina T2 ya que se ha reportado que por CLAR se tienen serios problemas para su cuantificación debido a que es una molécula poco polar y por su carencia de cromóforos es difícil su detección por medio de Ultra Violeta-visible.

En consideración de lo anterior, en el presente trabajo, se describe el desarrollo de metodologías analíticas planteadas en la literatura, así como, la implementación de un método para el análisis de muestras de sorgo basado en la Inserción Directa al EM para la identificación y cuantificación de la toxina T2; comparando los resultados cuantitativos, sus ventajas y desventajas de las diferentes técnicas analíticas planteadas las cuales son la CCD, ELISA, CG-EM y muestras de referencia.

III. OBJETIVOS

Considerando la exposición previa acerca de la importancia de la Toxina T2 en la producción pecuaria y sobre las limitaciones analíticas para el estudio de la Toxina T2, se han planteado los siguientes objetivos:

Objetivo General

Plantear una técnica para la determinación de la Toxina T2 por medio de Inserción Directa en el Espectrómetro de Masas, así como el desarrollo de la técnica de Cromatografía de Gases acoplada al Espectrómetro de Masas.

Objetivos Particulares

1. Comparar la técnica de Inserción Directa para el análisis de la Toxina T2 con las metodologías de CCD, CG-EM y ELISA.
2. Comparar las metodologías planteadas para el análisis de Toxina T2 por medio del uso de muestras de referencia.
3. Determinar el orden de magnitud de la sensibilidad de las técnicas planteadas para el análisis de la Toxina T2.

IV. ANTECEDENTES

IV.1. GENERALIDADES DE LAS MICOTOXINAS

El desarrollo del hombre está estrechamente asociado al uso de diferentes hongos. Desde la antigüedad, es bien conocido el papel de estos microorganismos en diferentes procesos como la producción de pan, bebidas alcohólicas y alimentos fermentados entre otros. Hoy en día, los hongos son utilizados en la producción de quesos, alimento para ganado, producción de enzimas, ácidos orgánicos, vitaminas, proteínas, antibióticos y esteroides, por mencionar algunos. Adicionalmente, juegan un papel importante en infecciones a plantas, animales y al humano, así como en la contaminación de cultivos y alimentos (Betina, 1984).

En la década de los años 1960's, con el descubrimiento de las aflatoxinas, se inicia el estudio de las diferentes especies de hongos para buscar el origen de éstas, definiendo a las aflatoxinas como sustancia tóxica de origen fúngico que producen envenenamiento en animales.

La invasión por hongos en alimentos puede ocurrir en cualquier etapa de la cadena de producción del alimento, desde el momento de la cosecha como contaminantes naturales en hojas, tallos, granos o semillas, así como en carnes y productos lácteos, en el transporte, en el almacenamiento, o bien en la preparación de estos. Esto depende de la estación del año que se producen los alimentos hasta la región donde se lleva a cabo esto (Betina, 1984).

Las intoxicaciones por micotoxinas han sido reportadas en Estados Unidos desde el siglo pasado en porcinos y caballos asociada con la ingesta de alimentos contaminados con *Fusarium graminearum*. En otros países como Japón, se reportaron tumores de hígado y otros padecimientos; en Siberia, se describen intoxicaciones por consumo de granos almacenados para el invierno, siendo esto sólo un ejemplo de la gran diversificación de estos contaminantes (Betina, 1984).

Los cereales son contaminados por varias especies de *Fusarium* que son la fuente principal de tricoticenos no-macroclícos en alimentos y comestibles (Langseth y Rundberget, 1998). El hongo probablemente infecta al grano en la época de crecimiento; el trigo y el maíz son los más susceptibles. El tricoticeno de mayor distribución es el deoxinivalenol, el cual es detectado en mayor concentración en las semillas pequeñas y granos.

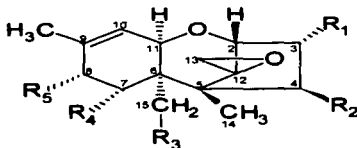
IV.2. EL GÉNERO *FUSARIUM* Y LOS TRICOTICENOS

Los tricoticenos, son producidas por una gran variedad de géneros de hongos como: *Fusarium*, *Trichoderma*, *Myrothecium*, *Stachybotrys*, *Cylindrocarpum* y *Trichothecium*, siendo de este último de donde toman su nombre. Se han aislado más de 180 y desde entonces la lista sigue en aumento. (Langseth y Rundberget 1998). El primer miembro de los tricoticenos, el tricotecin, fué descubierto originalmente como antimicótico por Freeman y Morrison en 1948 (Betina, 1994).

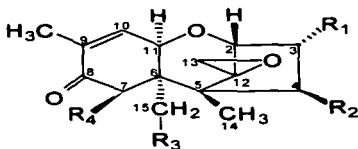
Durante dos décadas de estudio se ha revelado un gran número de metabolitos secundarios de *Fusarium*. La mayoría de las toxinas del género *Fusarium* fueron descubiertas en la década de los 1980's y sus biosíntesis son muy diversas (Marasas et al. 1984; Miller, 1988).

Normalmente los tricoticenos tienen un anillo epóxido y una doble ligadura en el carbono 12-13 y 9-10 respectivamente, por lo cual, estos son llamados 12,13-epoxytricoticenos-9-eno (Betina, 1994). Los tricoticenos se dividen en macroclícos y no macroclícos. Los tricoticenos no macroclícos tienen un doble enlace en la posición 9-10, un anillo epóxido en el carbono 12-13 y un número variable de hidroxilos y acetoxi. Por otro lado, los tricoticenos se clasifican en 4 grupos A,B,C y D de acuerdo a su estructura básica (Figura 1). El tipo B se caracteriza por tener un grupo carbonílico en la posición 8 e incluye entre otros al deoxinivalenol (DON), nivalenol y fusarenon-x, en tanto que los tricoticenos del tipo A carecen de oxígeno en la posición 8, los principales son la T-2, HT-

2. NEO y DAS, rara vez tienen grupo carbonilo. El tipo C se caracteriza por un segundo epóxido y el tipo D son compuestos macrocíclicos (Langseth y Rundberget 1998).



Tricotricenos Grupo A	P.M.	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
Neosolanol	382	OH	OAc	OAc	H	OH
Toxina HT-2	424	OH	OH	OAc	H	OCOCH ₂ CH(CH ₃) ₂
Toxina T-2	466	OH	OAc	OAc	H	OCOCH ₂ CH(CH ₃) ₂
Toxina T-2 triol	382	OH	OH	OH	H	OCOCH ₂ CH(CH ₃) ₂
Toxina T-2 tetraol	298	OH	OH	OH	H	OH
Scirpentriol	282	OH	OH	OH	H	H
1,5-Monoacetoxiscirpenol (MAS)	324	OH	OH	OAc	H	H
4,15-Diacetoxiscirpenol (DAS)	366	OH	OAc	OAc	H	H



Tricotricenos Grupo B	P.M.	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Deoxinivalenol (DON)	294	OH	H	OH	OH
3-Acetil-DON	338	OAc	H	OH	OH
1,5-Acetil-DON	338	OH	H	OAc	OH
Nivalenol	312	OH	OH	OH	OH
Fusarenol-X (4-Acetil-nivalenol)	354	OH	OAc	OH	OH

FIGURA 1. Tricotricenos del grupo A y B no macrocíclicos.

IV.3. EFECTOS BIOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS DE LOS TRICOTICENOS

Los hongos producen una gran variedad de metabolitos secundarios, muchos asociados a efectos adversos en plantas, animales y humanos, las manifestaciones de estos efectos son tan variados como variados son los hongos que producen estas micotoxinas (Miller y Trenholm, 1994; D'Mello y Macdonald, 1997).

Los diferentes efectos biológicos dependen de la especie del hongo, la cantidad de tricotico y la sensibilidad de cada organismo (Betina, 1984). La intoxicación aguda y crónica se da normalmente por rehusar y se caracteriza por pérdida de peso y un incremento considerable en la susceptibilidad a contraer infecciones. los porcinos son los más sensibles a los tricotico, las aves de corral y los rumiantes tienen relativa tolerancia.

Los tricotico se caracterizan por ser antibióticos, antifúngicos y presentan actividad citoestática. Los síntomas que se presentan se caracterizan por irritación en la piel, rechazo del alimento, vómito, diarrea, hemorragias, problemas neurales, se producen abortos y hasta la muerte. El intervalo para que cause intoxicación en el hombre está dentro de los $\mu\text{g g}^{-1}$ (Hsia et al, 1988).

Los tricotico son potentes inhibidores de la síntesis de proteínas e interactúan con las membranas celulares y aparentemente contribuyen en la regulación de las funciones del sistema inmune. La exposición aguda a los tricotico resulta en un grave daño en la división celular en tejidos como médula ósea, bazo, timo y la mucosa intestinal (Vidal, 1990). Se observan alteraciones muy evidentes sobre la hematopoyesis como leucopenia, granulopenia y linfocitosis. Este efecto inmunosupresor se utilizó en trasplantes a nivel experimental con éxito en animales. Los tricotico actúan sobre la síntesis de proteínas, pared celular, la vía del tioglicolato y síntesis de macromoléculas, todo esto sobre varios tipos de bacterias, virus, protozoarios y hasta hongos; también tienen efecto insecticida sobre algunos tipos de insectos y larvas.

Entre otros efectos los tricoticenos producen citotoxicidad, carcinogénesis, mutagénesis, teratogenicidad y fitotoxicidad; tienen efectos inmunosupresores, insecticida y actividad antimicrobiana (Betina, 1984). Se han utilizado diferentes modelos para medir su toxicidad tales como ratones, ratas, artemias, etc (Brown y Amer, 1969; D'Mello y MacDonald, 1997). Para evaluar la citotoxicidad se utilizan cultivos de diferentes líneas celulares de animales y humanos. En leucocitos humanos su efecto tóxico se observa en la mitosis, otras micotoxinas inhiben la síntesis de proteínas en eucariontes. Se ha comprobado que los tricoticenos producen cáncer primario de hígado en humanos, esto se debe a que interactúan con el ADN produciendo carcinogénesis y mutagénesis (Shank, 1977).

En general, los efectos tóxicos de los tricoticenos sobre las células del sistema inmune se observa por una baja proliferación de los linfocitos después de un estímulo mitogénico. En el caso de la Toxina T2 cuando ocurre una exposición, hay un decremento en las células B y un incremento en las células T en animales (Miller y Atkinson, 1987). *In vitro*, la concentración requerida para la inhibición del sistema inmune es 10 veces menor que la requerida para la inhibición de la síntesis de proteínas, especialmente del grupo A de los tricoticenos (Forsell et al. 1985).

Exposiciones repetidas a la Toxina T2 de animales en experimentación resultan en un incremento muy marcado en la susceptibilidad a la *Cándida*, *Cryptococcus*, *Listeria*, *Salmonella*, *Micobacterium* y el virus del *Herpes* tipo 1 (Miller y Trenholm, 1994).

Por otro lado, los tricoticenos producen fitotoxicidad ya que inhiben la germinación de semillas, induce la deficiencia de la clorofila en plantas, tiene influencia sobre el crecimiento, sobre el contenido citoplasmático, la movilidad de los organelos, el metabolismo celular, el transporte de auxinas, permeabilidad de las membranas, etc (Miller y Trenholm, 1994).

Los tricoticenos se distribuyen en cosechas de cereales en regiones específicas y siendo poco tóxicas y por su baja concentración no representan una amenaza inmediata.

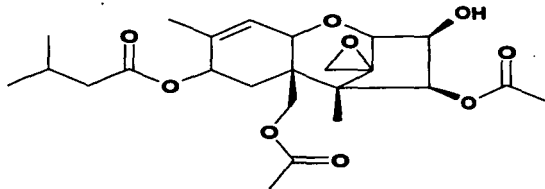
Mientras todos los tricoticenos son letales por ingesta en suficiente cantidad, el mayor problema se presenta en la cantidad de alimentos contaminados con tendencia a riesgo de intoxicaciones crónicas. Aunque todos los animales son afectados después de una exposición a los tricoticenos, el grado de intoxicación depende del tipo de toxina, el grado y duración de la exposición, así como la especies de animales involucrados (Miller y Trenholm, 1994).

IV.4. LA TOXINA T2

La Toxina T2 es un tricoticeno perteneciente al grupo de los terpenoides, está clasificada dentro del grupo A y se considera una micotoxina no macrocíclica, producida por especies de hongos como: *Fusarium tricinctum*, *F. nivale*, *F. poae*, *F. solani*, *Trichoderma lignorum*, *F. sporotrichioides*.

Entre sus propiedades físicas y químicas se encuentran:

Fórmula estructural:



Estructura química $C_{24}H_{34}O_6$. Peso molecular es de 466.2202 g mol⁻¹. Su estructura cristalina es de agujas blancas. Punto de fusión es 151-152°C. Es soluble en metanol, etanol, acetona, diclorometano, tolueno y octano (Betina, 1994).

Sus propiedades espectroscópicas son: EM m/z 466 (M⁺), 382, 364, 304, 278, 196, 180, 121. UV λ_{max} 187.5 nm en ciclohexano.. IR (KBr) 3400, 2940, 1720, 1635, 1365, 1240 cm⁻¹.

Desplazamientos químicos en Resonancia de ^{13}C y ^1H

Posición	^{13}C (ppm)	^1H (ppm)
2	78.7	3.68 (d, 4.9)
3	78.2	4.13 (ddd, 4.9, 2.8, 2.8) 3.18 (d, 2.8, 3-OH)
4	84.3	5.28 (d, 2.8)
5	48.3	
6	42.9	
7	27.7	2.38 (dd, 15.1, 5.8) 1.87 (dd 15.3, 1.5)
8	68.0	5.27 (d, 5.8)
9	136.3	
10	123.8	5.72 (dt, 5.8, 1.2)
11	67.3	4.33 (d, 5.8)
12	64.2	
13	47.0	3.04 (d, 3.9) 2.78 (d, 3.9)
14	6.6	0.79 (s)
15	64.5	4.04 (d, 12.6) 4.27 (d, 12.6)
16	20.1	1.72 (br s)
17	172.7	
18	43.4	2.10 (m)
19	25.6	2.01 (m)
20, 21	22.2	0.94 (d, 6.5) 0.93 (d, 6.5)
$\text{CH}_3(\text{Ac})$	20.8	2.01, 2.12 (s)
$\text{C}=\text{O}(\text{Ac})$	170.2, 172.5	

(Miller y Trenholm, 1994).

s:singulete, br s: singulete amplio, d:doblete, dd:doble de dobles, ddd:triple doblete, dt: doble triplete, m:multiplete.

Los niveles de Tolerancia a la Toxina T2 está basada en cerdos ya que es la especie más sensible a este género de toxinas. En cerdos, no hay daño con una cantidad menor a $1\mu\text{g L}^{-1}$; entre $1-8\mu\text{g L}^{-1}$ aparecen efectos de nivel moderado sobre el peso del animal y su consumo de alimento. En lechones se observa que toleran un nivel alto entre 10 y $12\mu\text{g L}^{-1}$, esto mostró que produce problemas significativos en peso corporal, química sanguínea y fertilidad; el rechazo total a la comida se observó a las $16\mu\text{g L}^{-1}$ (Miller y Trenholm, 1994).

La Toxina T2 produce lesiones orales en pollos en niveles menores a 1 ppm en el alimento. Efectos significativos aparecen a las $4\mu\text{g L}^{-1}$ o mayor a esto, que incluyen bajo consumo de alimento y retardo en el crecimiento, cambios en la química sanguínea y neurotoxicidad. Las lesiones orales son observados en pavos con $5\mu\text{g L}^{-1}$ de Toxina T2 y reducción de peso con $10\mu\text{g L}^{-1}$. Los tricotricenos generalmente no dan como resultado mortalidad, requieren de varios cientos de $\mu\text{g L}^{-1}$ para producir la muerte. De forma similar se atribuye a la Toxina T2 afecciones a otro tipo de animales domésticos como patos, gansos, caballos y cerdos. Los rumiantes son relativamente insensibles a la dieta contaminada con tricotricenos. En ganado vacuno con niveles en la dieta de $10-20\mu\text{g L}^{-1}$ no hay evidencias de manifestaciones clínicas. Niveles por debajo de $1.2\mu\text{g L}^{-1}$ de Toxina T2 en la dieta consumida por varios meses es asociada a intoxicaciones en ganado vacuno (Miller y Trenholm, 1994).

IV.5. ANÁLISIS DE LOS TRICOTICENOS.

Desde el reconocimiento de las micotoxinas como agentes detrimentales en la fisiología animal, se ha iniciado un gran número de esfuerzos tendientes al estudio de todos los componentes de este problema. En los 1960's se inició el estudio formal de las micotoxinas como agentes causales de muerte y enfermedades en animales y en el humano; en la década de los 1970's se realizó la identificación de la estructura química y la descripción toxicológica de la mayoría de las micotoxinas de importancia (Flores y Díaz de León, 1999).

A partir del inicio del estudio de las aflatoxinas, se desprende el análisis de otros tipos importantes de micotoxinas como en el caso de ocratoxina A, citrinina, zearalenona, rubratoxinas, tricotocenos, etc., en este último grupo se encuentra la Toxina T2 en la cual se centra este trabajo. Desafortunadamente no existen métodos universales para determinar la presencia de micotoxinas, generalmente se debe seleccionar una toxina o un grupo genérico de ellas para cuantificar selectivamente por comparación. Para cada grupo de micotoxinas existe una metodología particular de análisis, esto se debe a la gran diversidad que presentan en su estructura química los diferentes grupos de micotoxinas.

El desarrollo de métodos para el análisis de micotoxinas se encuentra en constante demanda. Durante los últimos diez años, entre las técnicas aplicadas a la detección, análisis y caracterización de micotoxinas, la cromatografía ha sido muy bien aceptada, ya que siempre se necesita separar los metabolitos primarios de los secundarios, así como otras sustancias que son producidas simultáneamente con las micotoxinas (Lin et al.1998, Flores y Díaz de León, 1999).

Hablando específicamente de los Tricotocenos, las técnicas cromatográficas que se utilizan para su determinación son: la CCD (Trenholm,1983; Lin et al, 1998; Gore et al, 1984). Cromatografía de Columna (Bennett et al. 1984). CLAR (Langseth y Rundberget, 1998; Jiménez et al. 2000, Jiménez et al. 1997; Lin et al. 1998; Krska, 1998). Electroforesis Capilar de Zona (Langseth y Rundberget, 1998) y la CG. Ésta última se puede combinar con Detección de DIF (Jiménez et al. 2000; Schothorst y Jekel, 2001; Gore et al. 1984), Detección de DCE (Moller y Gustavsson, 1992; Kotal et al. 1999; Krska, 1998; Radová et al. 1998; Rizzo et al. 1986) o Detección por EM (Tanaka et al. 2000; Lin et al. 1998; Trenholm,1983; Mossoba, et al, 1996; Onji, et. al.,1998; Langseth y Rundberget. 1998; Kotal et al. 1999; Schollenberger et al, 1998).

La determinación basada en la Cromatografía de Gases acoplada a la Espectrómetro de Masas es probablemente el método más usado en la actualidad, ya que proporciona una buena sensibilidad y especificidad, por lo que teniendo una buena capacidad de separación

es posible detectar diferentes tricotocenos en una misma muestra (Moller y Gustavsson,1992 y Onji et. al.,1998).

Para obtener una determinación confiable de las micotoxinas, específicamente de los tricotocenos, se debe utilizar primeramente alguna técnica de muestreo, extracción y purificación antes de realizar el análisis por alguna de las técnicas descritas anteriormente. Para esto, existen numerosas técnicas de extracción y purificación reportadas en la literatura (Tanaka et al, 2000; Radová et al, 1998; Krska, 1998; Langseth y Rundberget, 1998; Schollenberger et al. 1998; Kotal et al, 1999; Langseth y Clasen, 1992; Schothorst y Jekel, 2001; Onji et al. 1998; Rizzo et al. 1986), mediante las cuales se pueden tener muestras con menos interferencias para el análisis.

Una de las primeras técnicas usadas para la identificación de los tricotocenos fue la Cromatografía en Capa Delgada (Trenholm,1983; Lin et al, 1998; Gore et al. 1984), ésta se usó para hacer solo identificación cualitativa de los tricotocenos pues se requieren concentraciones muy altas para su observación y se reporta un límite de sensibilidad bajo. La Cromatografía de Columna se considera un método cuantitativo, pero se ha observado que para la identificación y cuantificación de tricotocenos no es muy confiable, ya que se requieren altas concentraciones y los métodos de detección normalmente usados no son útiles, se ha reportado que para esta técnica se utiliza la CCD para seguir la separación y la identificación (Bennett, Megalla y Shotwell, 1984). Por otro lado, algunos tricotocenos como es el caso de la Toxina T2, no tienen cromóforos en su estructura por lo que no se pueden detectar fácilmente mediante espectrofotometría de Ultra Violeta-visible; este mismo problema se presenta en la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (Langseth y Rundberget, 1998; Jiménez et al, 2000, Jiménez et al, 1997; Lin et al, 1998; Krska, 1998). Se ha reportado que la técnica de CLAR-UV, se utiliza principalmente para el grupo B de los tricotocenos y solo se usa en el grupo A cuando se tienen muestras con altas concentraciones de tricotocenos. Este método se realiza en fase inversa donde la fase móvil es una mezcla de acetonitrilo:agua y se detectan las Toxinas del grupo A a una longitud de onda de 200 nm, donde se ha observado que la señal del solvente es muy intensa para eliminarse del fondo, por los que no se alcanza a definir los picos con claridad. Respecto a

la Electroforesis Capilar de Zona (Langseth y Rundberget, 1998), es una técnica muy similar al CLAR, pero tiene la desventaja de que se debe lavar la columna capilar y esto hace que la técnica no sea reproducible, además de que el método de detección es también por UV-Visible y por lo tanto presenta el mismo problema de detección por la falta de cromóforo en la molécula. Desde hace ya varias décadas, se utilizan métodos inmunológicos como la técnica de ELISA (Krska, 1998, RIDASCREEN[®]FAST T-2 Toxin, R-Boipharm GmbH, Darmstadt, Germany, 1998; Lin et al, 1998) para resolver el problema de la falta de detección de los tricotocenos, pero se han generado otros problemas relacionados con la técnica de extracción que se utilice o por humedad, además de que hay tricotocenos que tienen una estructura química muy similar por lo que la unión con el anticuerpo no es específica y da como resultado reacciones cruzadas, esto descarta la técnica cuando se requiere detectar cantidades del orden de picogramos y cuando se tiene una muestra con varios tipos de micotoxinas, ya que se pueden producir falsos positivos.

Finalmente la Cromatografía de Gases se considera como una de las mejores opciones para el análisis y la cuantificación de los tricotocenos y aún mejor cuando se lleva a cabo la derivatización de estos, ya que se obtiene una buena separación de los diferentes tricotocenos y obteniéndose buenos resultados cuando se combinan con un método de detección apropiado. Se puede combinar con Detector de Ionización de Flama (Jiménez et al. 2000; Schothorst y Jekel, 2001; Gore et al. 1984), otra opción es el Detector de Captura de Electrones (Moller y Gustavsson, 1992; Kotal et al, 1999; Krska, 1998; Radová et al. 1998; Rizzo et al. 1986). Finalmente se encuentra la Detección por Espectrómetro de Masas (Tanaka et al. 2000; Lin et al. 1998; Trenholm, 1983; Mossoba et al. 1996; Onji et. al., 1998; Langseth y Rundberget, 1998; Kotal et al, 1999; Schollenberger et al. 1998), este método ioniza y fragmenta las moléculas en iones de menor masa, además de que produce el ión molecular de cada tricotoceno y nos proporciona la estructura química de la molécula, por lo que lo hace un método muy confiable, exacto y preciso, disminuyendo los errores por interferencias, además de que su límite de detección es del orden de picogramos y esto lo hace muy versátil. Adicionalmente, la detección por Espectrometría de Masas se ha reconocido como el más sensible y resolutivo para la identificación y cuantificación de las moléculas, en particular el elevado peso molecular de la Toxina T2 (466 g mol^{-1}), permite

obtener iones moleculares y fragmentos que son específicos para su identificación y cuantificación diferencial cuando están presentes en una mezcla compleja, como lo es el extracto de cereales ó alimentos balanceados. El principal inconveniente de esta técnica es el requisito de una instrumentación de alto costo y el tiempo necesario para la preparación de las muestras.

Con base en lo mencionado anteriormente, en el presente trabajo, se plantea una metodología para el análisis de muestras de sorgo basado en la Inserción Directa al Espectrómetro de Masas para la identificación y cuantificación de la Toxina T2; comparando los resultados cuantitativos obtenidos de los diferentes métodos analíticos como CCD, ELISA, CG-EM y muestras de referencia.

V. DESARROLLO EXPERIMENTAL

V.1. METAS EXPERIMENTALES

- 1. Obtención de la Toxina T2 por medio del cultivo de *Fusarium sporotrichoides* en el Laboratorio.**
- 2. Cuantificación de la Toxina T2 en muestras por ELISA.**
- 3. Análisis Cualitativo y Cuantitativo de la Toxina T2 obtenida, mediante Cromatografía en Capa Delgada.**
- 4. Derivatización y Cuantificación de la Toxina T2 obtenida, por medio de Cromatografía de Gases acoplada al Espectrómetro de Masas.**
- 5. Cuantificación de la Toxina T2 obtenida, derivatizada y sin derivatizar, por medio de Inserción Directa al Espectrómetro de Masas.**

V.2. MATERIAL Y METODOLOGÍAS

V.2.1. Producción de Toxina T2.

Primeramente se sembró el hongo *Fusarium sporotrichoides* (Cepa con alta producción de Toxina T2 registro No. NRLL3299 ATTC) en el medio de cultivo de Czapek peptona líquido, el cual se preparó colocando en un vaso de precipitados 3% de sacarosa, 0.5% de peptona, 0.2% de KNO_3 , 0.1% de K_2HPO_4 , 0.05% de KCl, 0.05% de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.001% de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, se agitó hasta disolver todos los componentes y se ajustó el pH a 6.8; se colocaron 50 mL de medio en cada matraz, en total 5 matraces Erlenmeyer de 150 mL. Se taparon con tapones de algodón con gasa y se esterizaron en la autoclave por 15 minutos a 121°C y 15 psi. se dejaron enfriar a temperatura ambiente (M. Jiménez et al. 2000). En la campana de extracción, en condiciones de esterilidad, se inocularon los matraces con la cepa de *Fusarium sporotrichoides*. Se incubaron los matraces en la estufa a 27-29°C durante 20 días (Jiménez et al. 1997; Jiménez et al. 2000).

Para la extracción de la toxina, se agregó metanol en proporción (1:1) con el medio, se agitó y filtró con 4 capas de gasa. Se pasó el filtrado a un embudo de separación y se le agregó acetato de etilo en proporción (1:1) con el filtrado, se agitó vigorosamente y se dejó en reposo hasta que se separaron las dos fases, se colocó el acetato de etilo en un matraz bola y se evaporó a sequedad a presión reducida. El extracto crudo se trasvasó a un vial y se guardó en congelación hasta su uso (Tanaka et al. 2000; Onji et al. 1998; Mossoba et al. 1996; Bennett et al. 1984; Trenholm. 1983; Jiménez et al. 1997; Jiménez et al. 2000; Moller y Gustavsson. 1992; Lin et al. 1998; Jiménez et al. 2000; Radová et al. 1998; Langseth y Rundberget. 1998; Schollenberger et al. 1998; Kotal et al. 1999; Schothorst y Jekel. 2001).

V.2.2. Análisis de Toxina T2 por ELISA.

Extracción de la muestra. 250 g de sorgo fueron homogenizados hasta malla 20. En 5 g de la muestra obtenida, se adicionaron 25 mL de metanol al 70%, y se agitaron durante 10 min a 150 rpm en el agitador orbital, el extracto obtenido se filtró con papel Whatman No. 1 y se diluyó 1:1 con agua desionizada. Para este análisis de ELISA se utilizó un Kit

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

comercial "RIDASCREEN[®]Fast T-2 TOXIN" marca R-biopharm GmbH, Germany (Krska, 1998. RIDASCREEN[®]FAST T-2 Toxin, R-Boipharm GmbH, Darmstadt, Germany, 1998; Lin et al. 1998). Para este análisis se utilizaron 50µL de la dilución, se adicionaron 50µL de los estándares y de las muestras. Posteriormente, se agregaron 50µL del conjugado Toxina T2-enzima a cada pocillo e inmediatamente después se agregaron 50µL de anticuerpo Anti-Toxina T2 a cada uno. Se mezcló cuidadosamente y se incubó durante 10 min a temperatura ambiente; transcurrido este tiempo, se vaciaron los pocillos y se lavaron tres veces con agua desionizada. Posteriormente, se adicionan 100µL del sustrato/cromógeno a cada pocillo y se incubó 5 min en la oscuridad a temperatura ambiente. Finalmente, se agregaron 100µL de la solución de paro a cada pocillo. Las placas de ELISA obtenidas fueron cuantificadas a 450 nm en un lector de ELISA.

V.2.3. Análisis de Toxina T2 por CCD.

Extracción de la muestra.

Se tomó una muestra de 250 g de sorgo y se homogenizó hasta malla 20. En 5 g de la muestra obtenida, se adicionaron 25 mL de metanol y se agitaron durante 10 min. a 150 rpm en el agitador orbital. El extracto obtenido se filtró con papel Whatman No. 1 y el filtrado se depositó en un matraz bola de 100 mL, el cual se evaporó a sequedad a presión reducida y se empleó acetona para el arrastre de la humedad. Finalmente, el residuo se resuspendió en 500 µL de metanol y fue utilizado para el análisis de Toxina T2 mediante Cromatografía en Capa Delgada (Langseth y Rundberget. 1998; Lin et al. 1998).

Cromatografía en Capa Delgada.

Se dispensaron 5 µL del estándar de Toxina T2 1000 µg L⁻¹ en una placa de sílica gel de 3 x 6 cm mediante una microjeringa. Posteriormente, en la misma placa, se colocaron 10µL del extracto de la muestra obtenida según se describe arriba. La placa fue eluida en una cámara que contenía aproximadamente 3 mL de la mezcla de disolventes de fase móvil benceno:acetona (3:2 v/v), la cual fue previamente saturada durante 2 minutos. La elución se desarrolló hasta que el frente alcanzó el borde superior de la placa. Posteriormente, la placa fue revelada en 15 mL de solución de *p*-anisaldehído, que contenía 0.25 g de *p*-

anisaldehído disueltos en 100 mL de metanol:ácido acético:ácido sulfúrico (85:15:5 v/v), la placa fue colocada en plancha caliente a 60°C durante 5 min (Trenholm, 1983; Lin et al. 1998; Gore et al. 1984). La identificación de la Toxina T2 se llevó a cabo por comparación de los valores de Rf de las manchas de la muestra y el estándar (SIGMA), posteriormente se llevó a cabo la cuantificación de la Toxina T2 del estándar y muestras de sorgo mediante un transiluminador AlphaInnotech y un Software analizador de imágenes Alphamager™ 2000 3.3.

V.2.4. Análisis de Toxina T2 por CG-EM.

Extracción de la muestra.

La extracción de la Toxina T2 se realizó de acuerdo a técnicas previamente publicadas (Radová et al, 1998; Langseth y Rundberget, 1998; Schothorst y Jekel, 2001; Krska, 1998). Se tomó una muestra de 250 g de sorgo y se homogenizó hasta malla 20. En 5 g de la muestra obtenida, se adicionaron 30 mL de la mezcla de $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ (84:16) y se agitaron durante 1 hr a 200 rpm en agitador orbital. El extracto obtenido se filtró con papel Whatman No. 1 y el filtrado se pasó por una columna de extracción en fase sólida marca PURITOX^{SR} utilizando vacío. La columna previamente se acondicionó con 6 mL de la mezcla del eluyente. Posteriormente, al filtrado se le adicionaron 50 mL de etanol absoluto y se evaporó a sequedad. Finalmente, el residuo se resuspendió en 500 μL de tolueno y fue empleado para el análisis de Toxina T2 mediante Cromatografía de Gases acoplada al Espectrómetro de Masas.

Derivatización.

La derivatización de la Toxina T2 se llevó a cabo de acuerdo a publicaciones previas. (Tanaka et al, 2000; Schollenberger et al, 1998; Langseth y Rundberget, 1998; Langseth y Clasen, 1992; Schothorst y Jekel, 2001; Kotal et al, 1999; Gore et al, 1984; Mossoba et al, 1996; Trenholm, 1983; Jiménez et al, 2000; Radová et al, 1998; Rizzo et al, 1986; Moller y Gustavsson, 1992; Krska, 1998). Se prepararon 100 μL de la mezcla de Trimetilsililimidazol (TMSI) y Trimetilclorosilano (TMCS) (6:2), la cual se adicionó al extracto crudo obtenido, se dejó reposar 15 min a temperatura ambiente agitando cada 3 min, transcurrido este

tiempo, se colocó el vial en un termo-bloque previamente ajustado a 60°C y fue secado en atmósfera de nitrógeno. Posteriormente, se adicionaron 500 µL de tolueno y 1 mL de agua desionizada, se agitó en el vortex durante 30 segundos y finalmente se dejó en reposo hasta la separación de las fases. La fase orgánica fue empleada para el análisis en Cromatografía de Gases acoplado al Espectrómetro de Masas de la Toxina T2 derivatizada.

Cromatografía de Gases

El equipo de CG empleado fue un sistema Finnigan Mat GCQ equipado con una columna capilar de 30 m de longitud x 0.32 mm de espesor y 0.25 mm de diámetro interno con fase estacionaria de dimetilpolisiloxano DB-1 (J. & W. Scientific). El gas acarreador empleado fue helio. Las condiciones del análisis fueron las siguientes: volumen de inyección 2µL, temperatura del inyector 220°C, Modo splitless abierto 0.01/cerrado 0.00, Presión a velocidad constante de 35 cm seg⁻¹., Rampa de calentamiento: 2 min a 70°C, incremento de 8°C/min. hasta 270°C; incremento 10°C/min. hasta 290°C y mantener 3 minutos.

Espectrómetro de Masas

La columna capilar fue directamente acoplada al detector de masas de tipo trampa de iones Finnigan Mat GCQ. Los espectros de ionización electrónica fueron registrados a 70 eV. Las condiciones de trabajo fueron las siguientes: La temperatura de la línea de transferencia a 280°C, temperatura de la Fuente de ionización a 180°C, Modo Barrido Completo y fragmentación secundaria de los iones m/z 304 y 364, intervalo de 50-650 m/z, polaridad positiva (Rizzo et al, 1986; Radová et al, 1998; Langseth y Rundberget, 1998; Onji et al, 1998; Schollenberger et al, 1998; Gore et al, 1984; Moller y Gustavsson, 1992; Kotal et al, 1999; Tanaka et al, 2000; Schollenberger et al, 1998; Langseth y , 1992; Schothorst y Jekel, 2001; Mossoba et al, 1996; Trenholm, 1983; Jiménez et al, 2000).

V.2.5. Curvas de Calibración Estándar.

Para la preparación de las diferentes curvas de calibración se utilizó un estándar de Toxina T2 marca SIGMA (St. Louis, MO, USA) con una concentración de 1000 mg L⁻¹

(Disolución Madre). Para la curva de calibración de la Toxina T2 en CCD, a partir de la disolución madre, se realizaron las siguientes diluciones: una dilución 1:10 para obtener el estándar de 100 mg L^{-1} , una dilución 1:4 para una concentración de 250 mg L^{-1} ; una dilución 1:2 para una concentración de 500 mg L^{-1} y por último una dilución 1:1.4 para el estándar de 700 mg L^{-1} . Partiendo del estándar de 1000 mg L^{-1} (Disolución Madre) se realizó una dilución 1:10 para tener el estándar a una concentración de 100 mg L^{-1} , a partir del cual se realizaron las diferentes diluciones para las curvas de calibración utilizadas en CG-EM de la siguiente manera: se hizo una dilución de 1:50 para llegar a $2000 \mu\text{g L}^{-1}$, y una dilución de 1:100 para la de $1000 \mu\text{g L}^{-1}$, una dilución 1:333.3 para una concentración de $300 \mu\text{g L}^{-1}$; a partir de la disolución de $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ se realizaron las siguientes diluciones: 1:2 para la concentración de $500 \mu\text{g L}^{-1}$, 1:4 para la concentración de $250 \mu\text{g L}^{-1}$, 1:5 para la concentración de $200 \mu\text{g L}^{-1}$, 1:10 para la concentración de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ y 1:12.5 para la concentración de $80 \mu\text{g L}^{-1}$. Finalmente de la disolución de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ se realizaron las siguientes diluciones: 1:2 para la concentración de $50 \mu\text{g L}^{-1}$, 1:2.5 para la concentración de $40 \mu\text{g L}^{-1}$, 1:4 para la concentración de $25 \mu\text{g L}^{-1}$, 1:5 para la concentración de $20 \mu\text{g L}^{-1}$, 1:20 para la concentración de $5 \mu\text{g L}^{-1}$ y 1:25 para la concentración de $4 \mu\text{g L}^{-1}$. Estos estándares se almacenaron a -18°C hasta su uso.

V.2.6. Análisis de Toxina T2 Inserción Directa-EM.

Inserción Directa.

Se colocaron $2\mu\text{L}$ de la muestra en el filamento del inserto directo del Espectrómetro de Masas. La desorción térmica se llevó a cabo utilizando rampas de calentamiento de 0 a 1000 mA con velocidades de 2 a 50 mA seg^{-1} . Las condiciones del detector de masas fueron las siguientes: temperatura de la fuente de ionización a 180°C . Modo Barrido Completo y fragmentación secundaria de los iones m/z 185, 304 y 364, intervalo de 50-650 m/z. Polaridad positiva (Langseth y Rundberget, 1998; Tanaka et al, 2000; Schollenberger et al, 1998; Mossoba et al, 1996; Rizzo et al, 1986).

VI. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En el presente trabajo se evalúa la mejor metodología para el análisis de la Toxina T2. Los resultados que a continuación se describen, fueron ensayos con la Toxina T2 por diferentes técnicas de análisis. La descripción y discusión de estos resultados hacen énfasis en la comparación de las diferentes metodologías para definir la mejor técnica de identificación y cuantificación de la Toxina T2.

OBTENCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LA TOXINA T2

El primer paso que se llevó a cabo fue la producción de la Toxina T2 en el laboratorio, para lo cual se activó un cultivo de hongo *Fusarium sporotrichoides* en medio sólido PDA, a los 5 días se obtuvo un crecimiento considerable; el cual se observó como un cultivo blanco, esponjoso de aspecto algodonoso que produjo un pigmento rojo intenso después de dos semanas de incubación. El cultivo activado fue empleado para la producción de Toxina T2 en medio líquido CZAPEK y, a partir de éste medio se extrajo la Toxina T2 después de un mes de incubación obteniéndose 91.3 mg de extracto crudo, el cual presentó apariencia de un sólido café claro de consistencia viscosa. En la figura 1 se muestran los diferentes cultivos del hongo.



Figura 1. Cultivos de *Fusarium sporotrichoides*.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Para la identificación de la Toxina T2 obtenida, se llevaron a cabo diferentes técnicas como Cromatografía en Capa Delgada y Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas, los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Para la identificación en Cromatografía en Capa Delgada se corrió una muestra de la Toxina T2 producida por el hongo en una placa de sílica gel, en un sistema de elusión de benceno-acetona (3:2 v/v) y como revelador una solución ácida de *p*-anisaldehído y se contrastó con una muestra de estándar de Toxina T2 (SIGMA). En la figura 2, se muestra la coelución de las muestras del extracto del cultivo y del estándar de la Toxina T2, donde se puede observar que presentan Rf similares.



Figura 2. Coelución de la toxina obtenida (1 y 2) y el estándar (3).

El cálculo del Rf de la mancha del estándar de la Toxina T2 es: $Rf=3.1/4.1=0.75$, y el Rf encontrado para la Toxina T2 obtenida del cultivo es: $Rf=3.0/4.1=0.73$. La diferencia observada probablemente se deba a que la Toxina T2 obtenida proviene de un extracto crudo del medio de cultivo, por lo tanto pueden existir interferencias por la presencia de muchas otras sustancias que determinan la diferencia en el valor del Rf.

Adicionalmente, para la identificación de la toxina en el extracto obtenido, se realizó un análisis por medio de CG-EM, siguiendo las condiciones de operación planteadas por Tanaka et al, 2000 y Rizzo et al, 1986. Inicialmente, fue determinado el tiempo de retención de la toxina T2 utilizando un estándar de la toxina; el tiempo establecido fue de 28:20 minutos. Posteriormente, se inyectó la muestra de la toxina

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

obtenida, en la cual se observaron dos picos mayoritarios, los cuales fueron identificados como DAS y Toxina T2 respectivamente, mediante la comparación de los tiempos de retención y por la similitud encontrada con los espectros de los estándares obtenidos de la biblioteca NIST. Por otro lado se observa en el cromatograma una gran cantidad de pequeños picos, creemos que estos se deben al medio de cultivo ya que este ensayo se llevó a cabo con un extracto crudo. En la Figura 3 se observa el cromatograma de los tricoticenos obtenidos del cultivo de *F. sporotrichoides*.

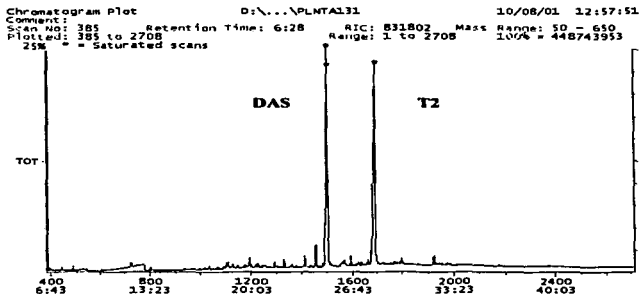


Figura 3. Cromatograma de tricoticenos obtenidos del cultivo de *F. sporotrichoides*.

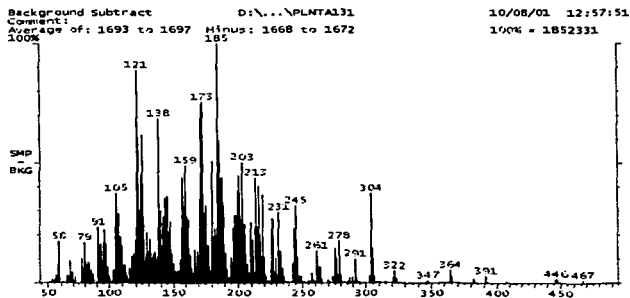


Figura 4. Espectro de Masas de la Toxina T2 obtenida del cultivo del hongo.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Por otro lado, en la Figura 4 se presenta el Espectro de Masas de la fracción correspondiente a la Toxina T2 del extracto obtenido, el cual a través de la comparación de abundancia relativa de los picos más importantes encontrados con el espectro del estándar puro, nos permite confirmar su identidad química.

En la Figura 5 se presenta un esquema que describe la propuesta probable de fragmentación que explica la existencia de los fragmentos 304 y 364 que posteriormente fueron utilizados en los análisis de fragmentación secundaria.

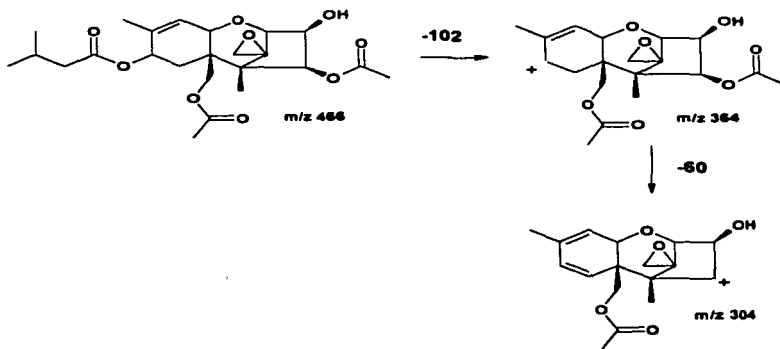


Figura 5. Formación de los fragmentos 304 y 364 de la Toxina T2

ANÁLISIS DE LA TOXINA T2 POR CROMATOGRAFÍA EN CAPA DELGADA.

Con relación a la cuantificación de la Toxina T2 por medio Cromatografía en Capa Delgada, se evaluaron siete metodologías reportadas previamente (Lin Leming et al, 1998), con diferentes mezclas de disolventes de elución y reveladores. Los detalles de los métodos evaluados se pueden observar en la Tabla 1.

Tabla 1. Sistemas de elución y revelado para el análisis de Toxina T2 por CCD.

Autor	Sistema de Elución	Revelador
J.F. Hewetson et al (1984)	CHCl ₃ -AcOEt-EtOH (50:25:25 V/V)	Rociar con 4-(<i>p</i> -nitrobenzil) piridina, calentar por 30 min. a 150°C.
B. Yagen, A. Sintov (1986)	Tolueno-AcOEt-Acetona (7:2:1 V/V)	Rociar con metóxido de Sodio o butóxido de Sodio y observar en UV.
R.D. Wei, F.S. Chu (1986)	Tolueno-AcOEt (1:3 V/V)	Rociar con H ₂ SO ₄ (1:3 V/V) y calentar en parrilla.
H.M. Stahr et al (1986)	MeOH-H ₂ O-CH ₃ COOH (65:35:1v/v) con 0.5% de NaCl	Rociar con ácido cromotrópico y calentar de 4-5 min. a 110°C.
B.B. Jaruis et al (1992)	Diclorometano-MeOH (92:8 V/V)	Observar con luz UV a 365 o 254 nm.
D.G. Corley et al (1984)	Benceno-Acetona (3:2 V/V)	Rociar con sol. de <i>p</i> -anisaldehído (0.25mL <i>p</i> -anisaldehído en MeOH-CH ₃ COOH-H ₂ SO ₄ 85:15:5 V/V) calentar en parrilla.
A. Bata, A. Vanyi, R. Lasztily (1987)	Benceno-Acetona (12:7 V/V)	Rociar con 4-(<i>p</i> -nitrobenzil) piridina al 1% en tetracloruro de carbono-CHCl ₃ (3:2 V/V) seguido de tetrailenpentamina al 10% en tetracloruro de carbono-CHCl ₃ (3:2 V/V) calentar por 30 min. a 150°C.

Con base en la mejor separación de los componentes de tricoticenos de las mezclas de estudio, así como la mejor sensibilidad y correlación entre la intensidad de las manchas y la concentración; fue seleccionado el método de D.G. Corley et al (1984), fase móvil benceno-acetona (3:2 v/v), solución reveladora de *p*-anisaldehído (0.25mL *p*-anisaldehído en MeOH:CH₃COOH:H₂SO₄ (85:15:5 v/v), el revelado se realizó con exposición directa a una plancha térmica.

Una vez seleccionadas las mejores condiciones de trabajo para la Cromatografía en Capa Delgada, se procedió con el análisis del estándar de Toxina T2, el cual se analizó en un intervalo de concentración de 0.1 a 0.7 mg mL⁻¹, en la Figura 6, se observan dos placas que muestran los perfiles de separación del estándar. Posteriormente, se construyó una curva de calibración tomando como referencia las concentraciones del estándar y las intensidades respectivas obtenidas mediante el densitómetro "Alpha Innotech", los datos correspondientes a la curva de calibración se pueden observar en la Tabla 2, en la cual se presentan los promedios de las intensidades de cada mancha y las desviaciones estándar respectivas, las diferentes diluciones utilizadas se describen en el apartado V.2. Finalmente, en la Figura 7 se presentan gráficamente los datos de la curva de calibración obtenida, en la cual se observa que el método es lineal hasta niveles de 0.5 mg ml⁻¹ (R²=0.91), y se encontró un orden de magnitud de la sensibilidad de 0.1 mg mL⁻¹.

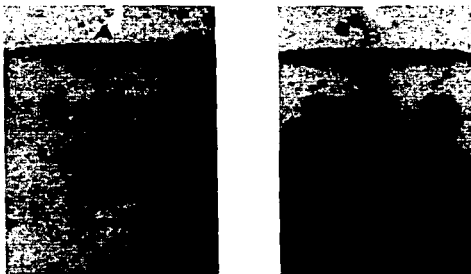


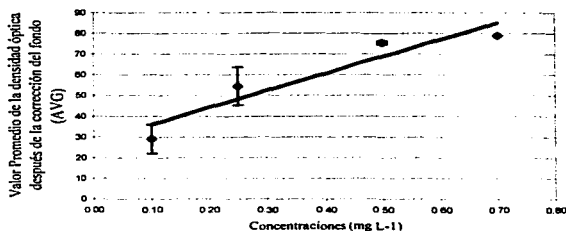
Figura 6. Placas de estándar de Toxina T2 a diferentes concentraciones.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 2. Curva de Calibración de estándar de Toxina T2 en CCD

Concentración (mg mL ⁻¹)	Promedio de AVG	Desviación Est.
0.10	29	7.071
0.25	54.5	9.192
0.50	75.5	0.707
0.70	79	0.000

AVG= Valor promedio de la densidad óptica después de la corrección del fondo.

**Figura 7. Curva de Calibración por Densitometría de CCD estándar de Toxina T2.**

Para confirmar los parámetros linealidad y sensibilidad encontrados para la técnica de CCD, se analizaron muestras extraídas de sorgo para la identificación y cuantificación de la Toxina T2, empleando muestras de sorgo de referencia preparadas con niveles conocidos de Toxina T2 como se muestra en la Tabla 3. Posteriormente, se llevó a cabo la extracción de las muestras, la cual se describe en el apartado V.2 material y metodologías de este trabajo (Langseth et al, 1998). En la Figura 8 se presenta la cromatoplaca correspondiente a la separación de dos muestras de sorgo, incluyendo un estándar de Toxina T2 de concentración conocida. Se puede notar que la muestra 1 presenta una mancha con un $R_f=0.82$, el cual es similar al del estándar ($R_f=0.84$), en tanto que para la muestra 2 no se registra la presencia de la Toxina T2.

Tabla 3. Niveles de Toxina T2 en muestras de sorgo de referencia

Muestras de Sorgo	Concentración (mg mL ⁻¹)
Mtra 1	0.99
Mtra 2	0.44



Est mtra1 Mtra2

Figura 8. Coelución de 2 muestras de sorgo y el estándar de la Toxina T2.

De los resultados obtenidos se observa que el método de análisis por CCD no registra niveles de Toxina T2 por debajo de 0.99 mg mL⁻¹ en muestras de sorgo ya que la muestra 2 con niveles de 0.44 mg mL⁻¹ no se observa en el revelado. Por otro lado, se realizaron ensayos con muestras reales de sorgo contaminadas con Toxina T2, de las cuales no se obtuvieron resultados detectables, probablemente esto se debe a la gran complejidad de las mezclas, así como a la baja sensibilidad encontrada para este método.

Finalmente, se puede decir que de acuerdo a los resultados obtenidos, la determinación cualitativa y cuantitativa de la toxina T2 por medio de Cromatografía en Capa Delgada tiene limitaciones de sensibilidad, por lo cual su uso es restringido a análisis cualitativos o bien la determinación de intervalos de concentración por arriba de 0.9 mg mL⁻¹ en muestras de sorgo. En cuanto a sus ventajas podemos mencionar que es una técnica barata, sencilla y accesible, sin embargo, dentro de sus desventajas se encuentra que la técnica de extracción no es eficiente y su tiempo de proceso es largo (155 min.).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

SELECCIÓN DEL MÉTODO PARA LA DERIVATIZACIÓN DE LA TOXINA T2

Continuando con las metas experimentales, se realizó la cuantificación de la Toxina T2 por medio de Cromatografía de Gases acoplado al Espectrómetro de Masas. el análisis se realizó en dos modalidades, derivatizando la Toxina T2 y sin derivatizar, obteniéndose los siguientes resultados:

Para establecer las mejores condiciones de análisis de la Toxina T2 mediante la técnica de Cromatografía de Gases se evaluaron 5 reacciones diferentes para la derivatización. La primera derivatización (Rizzo, et al, 1986; Langseth, et al. 1992 y Mossoba, et al, 1996) consistió en una reacción de sililación que presenta dos variantes, las diferencias entre estas variantes radican en la mezcla de derivatizadores usada, la temperatura de reacción y los disolventes de extracción. Los detalles de las dos formas de reacción para la primera derivatización se muestran en la Tabla 4. Con las dos formas de reacción se derivatizaron muestras de una mezcla de tricoticenos y un estándar puro de Toxina T2 con a una concentración de $17 \mu\text{g mL}^{-1}$; los resultados cromatográficos de la inyección de estas muestras de estándares también se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4. Reacción de sililación de Toxina T2

Tipo de Reacción	Reacción I		Reacción II	
	TMSI Calentar a 60°C por 1 hora		TMSI, TMCS, Acetato de etilo (1:0.2:9) A Temp. ambiente por 15 min.	
Concentración (17 $\mu\text{g mL}^{-1}$)	Mezcla de Toxinas:T2, DAS y NEO	Toxina T2	Mezcla de Toxinas:T2, DAS y NEO	Toxina T2
Área Bajo la Curva	13,026,226	28,576,801	813,923	2,176,598
Riqueza	12,111,712	179,472,170	11,222,487	22,975,284

En la Tabla 4 se observa que los picos de la reacción I tienen mayor rendimiento que la reacción II, dado que la riqueza y el área bajo la curva en la reacción I son cerca de

ocho veces más intensos que los observados en la reacción II. Lo anterior puede ser explicado en función del efecto de la temperatura a la cual se realiza la reacción I, con lo cual los rendimientos de los productos aumentan, sin embargo, la formación de dos fases al término de la derivatización agregando agua y hexano para la reacción I y acetato de etilo en la reacción II, resulta en una separación pobre de las fases, con lo cual se dificulta la toma de la muestra para la inyección. Adicionalmente, se observó que la utilización de agua en la formación de las fases no es recomendable, ya que los niveles de humedad residual de las muestras son elevados, con lo cual se afecta la reproducibilidad de los ensayos y en general se perjudica al desempeño de la columna y la cámara de ionización del espectro de masas.

En las figuras 9 y 10 se presentan los cromatogramas obtenidos de acuerdo a la metodología de la primera derivatización tanto con la mezcla de estándares de tricotricenos así como el estándar de la Toxina T2 siguiendo la metodología de la Reacción I. En la figura 9 se observa que se obtienen los tres tricotricenos derivatizados y la resolución no es suficiente.

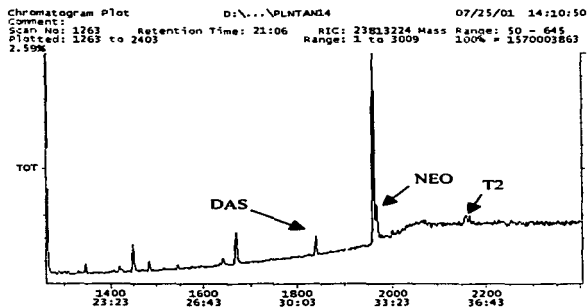


Figura 9. Cromatograma de mezcla de estándares de tricotricenos derivatizados por la Reacción I.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

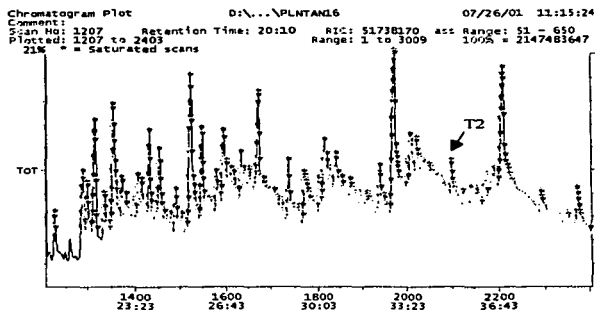


Figura 10. Cromatograma de la Toxina T2 derivarizada por la Reacción I.

En la figura 10 se observa el cromatograma de la Toxina T2 una gran saturación e impurezas lo que no permite identificar con claridad el pico de la toxina, probablemente esto se debe a los productos obtenidos de la reacción así como al disolvente de extracción utilizado (hexano) ya que arrastra agua y esto provoca que la línea base se mueva.

Posteriormente en las figuras 11 y 12 se presentan los espectros de masas de la reacción I de la Toxina T2 en la mezcla de tricocenos y de la Toxina T2 derivatizados respectivamente. En estos espectros de masas se confirma la obtención de la Toxina T2 ya que se observan los fragmentos característicos de esta toxina derivatizada (m/z 436 y 350), así mismo se observa que existen otros fragmentos que no corresponden a la fragmentación secundaria de la Toxina T2, esto probablemente se deba a la presencia de ftalatos provenientes de los disolventes y a residuos de la columna capilar ya que se observó que los disolventes de extracción utilizados no son los ideales para la columna capilar.

TESIS CON

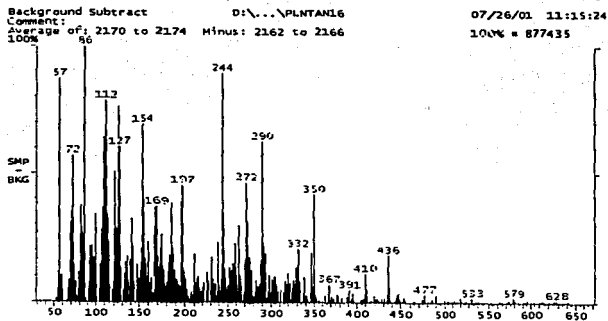


Figura 11. Espectro de Masas del estándar de la Toxina T2 derivatizada presente en la mezcla de triticocenos de la Reacción I.

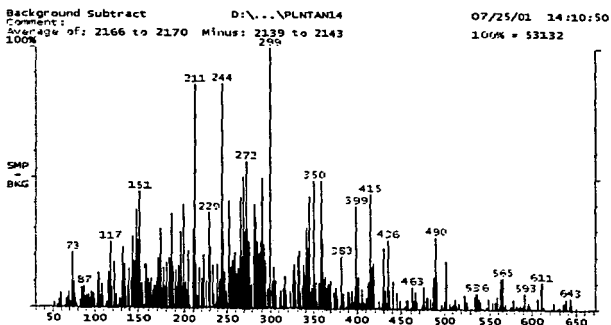
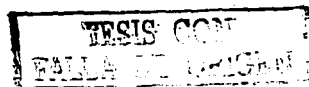


Figura 12. Espectro de Masas del estándar de la Toxina T2 derivatizada por la Reacción I.



En las figuras 13 y 14 se presentan los cromatogramas obtenidos de acuerdo a la metodología de la primera derivatización tanto con la mezcla de estándares de tricoticenos así como el estándar de la Toxina T2 siguiendo la metodología de la Reacción II. Como se puede observar en los cromatogramas obtenidos, la separación de los picos es deficiente, además se observa que la línea base esta elevada, esto probablemente se debe a la disolución de la fase estacionaria de la columna capilar provocado por la presencia de agua proveniente de la separación de las fases ya que el acetato de etilo puede arrastrar agua.

Posteriormente en las figuras 15 y 16 se presentan los espectros de masas de la reacción II de la Toxina T2 en la mezcla de tricoticenos y de la Toxina T2 derivatizados respectivamente. En estos espectros de masas se confirma la obtención de la Toxina T2 ya que se observan los fragmentos característicos de esta toxina derivatizada (m/z 436 y 350), así mismo se observa que existen otros fragmentos que no corresponden a la fragmentación secundaria de la Toxina T2, esto se debe a la presencia de residuos de la columna capilar, ya que se observó que el acetato de etilo arrastra agua y ésta disuelve la fase estacionaria de la columna capilar, la cual se identificó en el detector de masas por medio de la biblioteca NIST.

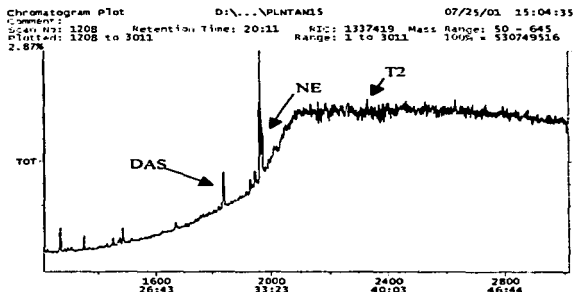


Figura 13. Cromatograma de mezcla de estándares de tricoticenos derivatizados por la Reacción II.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

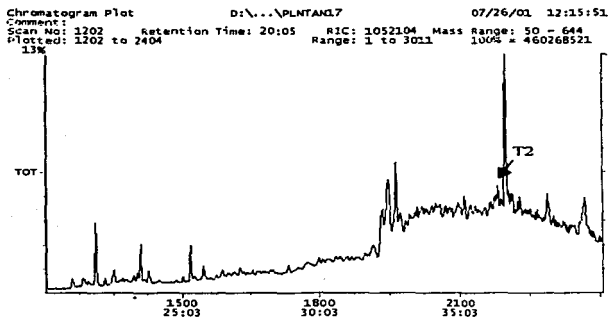


Figura 14. Cromatograma de la Toxina T2 derivatizada mediante la Reacción II.

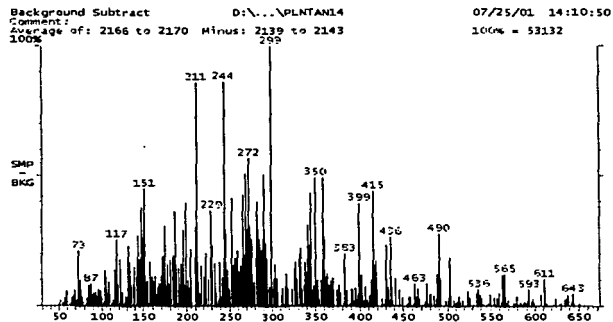


Figura 15. Espectro de Masas del estándar de la Toxina T2 derivatizada presente en la mezcla de tricoticenos de la Reacción II.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

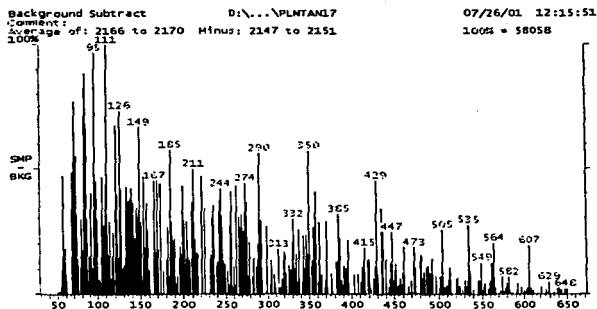


Figura 16. Espectro de Masas del estándar de la Toxina T2 derivatizada por la Reacción II.

La segunda reacción de derivatización evaluada (Trenholm, et al, 1983; Redová, et al, 1998) consistió en una reacción de sililación. Los detalles de los reactivos empleados, los tratamientos de reacción y los disolventes de extracción se muestran en la Figura 17, de la cual si se obtuvo la toxina volatilizada.

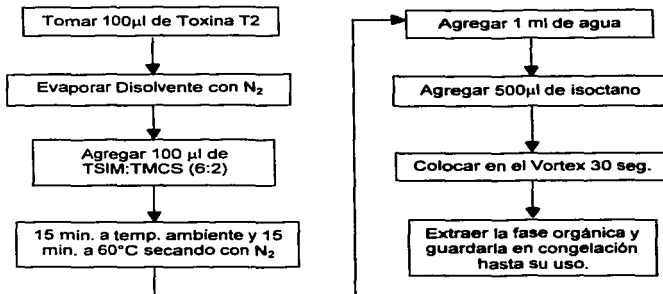


Figura 17. Esquema de la metodología para la segunda derivatización.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Para la tercera reacción de derivatización que fue evaluada (Gore, 1984; Schothorst, et al, 2001), se llevó a cabo en las mismas condiciones que se describen para la segunda derivatización, siendo la única diferencia la mezcla de derivatizadores empleada, que para el caso de esta reacción fue: N-trimetilsililimidazol (TMSI), N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) y trimetilclorosilano (TMCS) en una proporción de 3:3:2. Con esta reacción no se obtuvieron derivados volátiles de Toxina T2, ya que en los cromatogramas correspondientes no se observó ningún pico.

La cuarta derivatización evaluada (Kotal et al, 1999) fue una trifluoroacetilación, en la cual se empleó bicarbonato de sodio anhidro, anhídrido trifluoroacético (TFAA) como reactivos catalizadores de la reacción. Las condiciones para esta reacción fueron: incubación a 80°C por 30 minutos, posteriormente se adicionó tolueno y agua para forzar la separación de las fases de la reacción, se recuperó la fracción orgánica y se le agregó sulfato de sodio anhidro. La quinta reacción de derivatización evaluada (Schollenberger et al, 1998) también consistió en una reacción de trifluoroacetilación, el procedimiento que se llevó a cabo es similar a la cuarta derivatización descrita, con la diferencia de la temperatura de incubación de la reacción, que para este caso fue de 60°C por 20 minutos. De estas dos reacciones de trifluoroacetilación no se obtuvieron derivados, ya que los cromatogramas de estas reacciones no muestran picos correspondientes a la Toxina T2. Lo anterior puede ser explicado en función de los impedimentos estéricos que se presentan, tanto en el hidroxilo libre de la Toxina T2, así como por el reactivo derivatizador voluminoso empleado. Adicionalmente, las propiedades ácidas del ácido trifluoroacético pueden determinar reacciones de apertura del epóxido de la Toxina T2 así como reacciones de eliminación de las cadenas laterales.

Tomando en cuenta los resultados obtenidos con las 5 diferentes reacciones de derivatización evaluadas, se determinó que la segunda reacción fue la más adecuada, ya que se obtuvieron los mejores resultados en cuanto al rendimiento de la Toxina T2 derivatizada y por tanto de mayor sensibilidad. Los resultados que se muestran más adelante fueron obtenidos empleando dicho método de derivatización.

ANÁLISIS DE LA TOXINA T2 MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS

La cuantificación de la Toxina T2 por medio del Cromatógrafo de Gases acoplado al Espectrómetro de Masas que se describe a continuación se agrupa de acuerdo a la derivatización de la toxina y al tipo de fragmentación que se llevó a cabo en el espectrómetro de masas, ya sea en modo de Barrido Completo o EM/EM. Cabe mencionar que los iones 304, 364 y 350 m/z, fueron elegidos en base a su alto peso molecular y a su especificidad respecto de la Toxina T2, lo cual se determinó en base a la literatura consultada (Rizzo et al, 1986; Radová et al, 1998; Langseth y Rundberget, 1998; Onji et al, 1998; Schollenberger et al, 1998; Gore et al, 1984; Moller y Gustavsson, 1992; Kotal et al, 1999; Tanaka et al, 2000; Schollenberger et al, 1998; Langseth y , 1992; Schothorst y Jekel, 2001; Mossoba et al, 1996; Trenholm, 1983; Jiménez et al, 2000).

A. Análisis de Toxina T2 sin derivatizar en modo de Barrido Completo.

Para la cuantificación de la Toxina T2 sin derivatizar en modo de Barrido Completo, se realizó una curva de calibración con un estándar de concentración conocida. Las condiciones empleadas en el sistema del Cromatógrafo de Gases acoplado al Espectro de Masas así como las diferentes diluciones de la curva de calibración se describen en la sección de materiales y metodologías. En la Tabla 5 se presentan las concentraciones de los estándares empleados en este experimento, así mismo se pueden observar los resultados del área de los picos obtenidos con la integración de los picos correspondientes a la Toxina T2. Adicionalmente, en la Figura 18 se presentan en forma gráfica los datos obtenidos de la curva de calibración, como se puede observar en esta gráfica, se encontró que existe una correlación lineal de $R^2=0.98$ entre la concentración de la toxina y la respuesta del equipo en un intervalo de 4 a 200 $\mu\text{g L}^{-1}$, concentraciones por arriba de 200 $\mu\text{g L}^{-1}$, se pierde la linealidad, probablemente se debe a la saturación del equipo.

Tabla 5. Curva de calibración de Toxina T2 sin derivatizar en modo Barrido Completo.

Concentración ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Area Bajo la Curva (ABC)
4	890
20	7198
40	7653
80	13872
200	31920
1000	45117

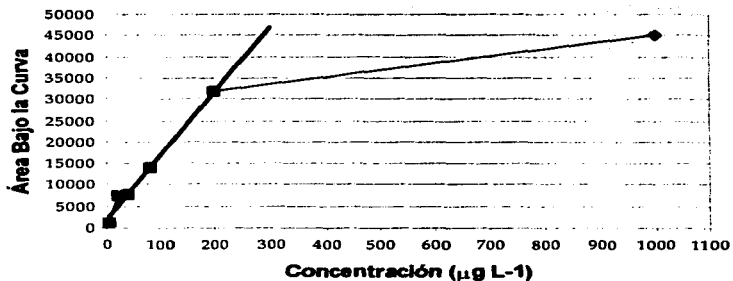


Figura 18. Curva de calibración de Tóxina T2 sin derivatizar en modo de Barrido Completo.

No obstante, de que la técnica descrita, indica un orden de magnitud de sensibilidad de $4 \mu\text{g L}^{-1}$, cuando se aplicó en el análisis de muestras reales de sorgo contaminadas no se detectó la presencia de la Toxina T2 en muestras que previamente habían sido valoradas mediante la técnica de ELISA. En la Tabla 6 se muestran los

resultados obtenidos del análisis de muestras reales de sorgo, donde se presentan valores en un intervalo de 10 a 387 $\mu\text{g Kg}^{-1}$, los cuales no fueron registrados mediante el análisis de la Toxina T2 sin derivatizar en modo de Barrido completo. Los resultados anteriores demuestran la importancia de la derivatización de la toxina para aumentar la volatilidad del compuesto y permitir distinguir su presencia en una matriz heterogénea como la que se obtiene de un extracto de sorgo. Por otro lado, la poca sensibilidad encontrada por esta técnica se puede explicar en base a que se requieren detectar cantidades muy pequeñas de la Toxina T2 en una matriz compleja y se observan muchas interferencias.

Las ventajas observadas en esta metodología son: el orden de magnitud de la sensibilidad encontrado es mejor respecto a la CCD, no se encontraron grandes interferencias en los experimentos debido a disolventes; el tiempo de proceso (100 min) es menor que para la CCD; entre las desventajas están las pérdidas de la toxina durante el procedimiento de la extracción ya que se requieren de muchos pasos intermedios para llegar al extracto final y la poca sensibilidad encontrada, así como su instrumentación.

Tabla 6. Muestras de sorgo reales analizadas por la técnica de CG-EM modo de Barrido Completo sin derivatizar y ELISA.

Muestra	ELISA ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)	CG-EM ($\mu\text{g L}^{-1}$)
1	280.85	ND
2	387.10	ND
3	14.88	ND
4	10.14	ND
5	36.90	ND
6	35.36	ND
7	13.50	ND
8	10.00	ND
9	44.00	ND
10	61.10	ND

ND. No detectado

B. Análisis de Toxina T2 sin derivatizar en modo de EM/EM.

Para la cuantificación de la Toxina T2 mediante Cromatografía de Gases y Espectrometría de Masas en modo de EM/EM, se realizó una curva de calibración (Tabla 7) con un estándar de concentración conocida en un intervalo de 5 a 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ como se describe en la sección de materiales y metodologías. Las diluciones obtenidas se inyectaron al cromatógrafo de gases acoplado al Espectrómetro de Masas, en este último se utilizó EM/EM, monitoreando el fragmento ión 304. Los resultados de la riqueza obtenidos por este método para cada dilución se presentan en la Tabla 7 y en la Figura 19, donde se indica que el coeficiente de correlación obtenido para los tres puntos detectados fue de $r^2=0.91$, la linealidad obtenida no es óptima, sin embargo la finalidad es observar la tendencia de la curva, ya que no se optimizó el método. De los resultados obtenidos, se encontró que el orden de magnitud de la sensibilidad es de 100 $\mu\text{g L}^{-1}$, por otro lado, se observa que los niveles de Toxina T2 en el intervalo de 5 a 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ no fueron detectados mediante esta técnica, lo cual podría ser explicado debido a las diferentes diluciones que se realizaron para obtener esas concentraciones tan bajas, aunado a la poca abundancia relativa que presenta el ión 304 (40%).

Tabla 7. Curva de calibración de Toxina T2 en EM/EM ión 304.

Concentración ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Riqueza
5	ND
25	ND
50	ND
100	31
250	37
500	100

ND. No detectado

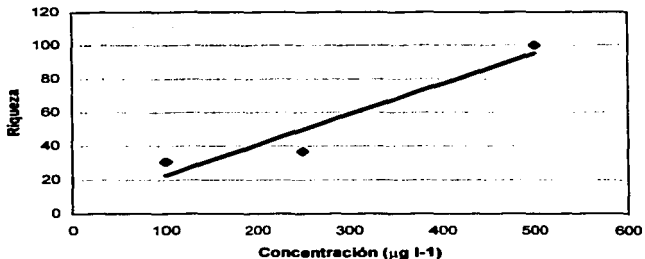


Figura 19. Curva de calibración de Toxina T2 sin derivatizar EM/EM ión 304.

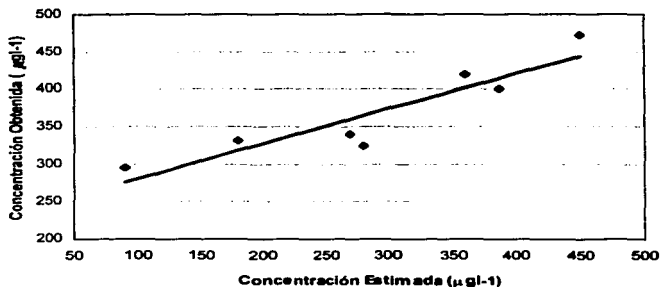
En la Tabla 8 se muestran los resultados obtenidos del análisis de muestras de sorgo de referencia. Estas muestras se prepararon asperjando una concentración conocida de Toxina T2 en sorgo previamente analizada la cual no contenía la toxina y posteriormente se realizaron diferentes diluciones, los niveles de Toxina T2 empleados en este experimento se encontraban en un intervalo de 90 a 450 $\mu\text{g L}^{-1}$. Los valores de Toxina T2 obtenidos mediante esta técnica concuerdan en un 91% con respecto a los valores esperados en las muestras de referencia (Figura 20). Los resultados indican que la técnica de EM/EM aumenta la sensibilidad para la Toxina T2, gracias a la eliminación de las interferencias presentes en la muestra a través de la selección de los fragmentos que son específicos en esta toxina como es el caso del ión 304.

Entre las ventajas observadas en este método de análisis, se encuentran el orden de magnitud de la sensibilidad encontrado es mejor respecto a la CCD y a la CG-EM modo de Barrido Completo, respecto a la sensibilidad mejora al doble respecto a la CG-EM modo de Barrido Completo, no se encontraron grandes interferencias en los experimentos debido a disolventes; el tiempo de proceso es menor que para la CCD e

igual al modo de Barrido Completo (100 min.); entre las desventajas están la pérdidas de la toxina durante el procedimiento de la extracción ya que se requieren de muchos pasos intermedios para llegar al extracto final, así como su instrumentación.

**Tabla 8. Muestras de sorgo de referencia analizadas por la técnica de CG-EM
EM/EM ión 304 sin derivatizar**

No. de muestra	Concentración Estimada ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Concentración Obtenida ($\mu\text{g L}^{-1}$)
1	90	295
2	180	331
3	270	340
4	360	419
5	450	472
6	280	324
7	387	400



**Figura 20. Correlación entre los valores Estimados y Obtenidos de Toxina T2
mediante CG-EM modo EM/EM ión 304 sin derivatizar.**

C. Cuantificación de la Toxina T2 derivatizada en modo de Barrido Completo.

Para la cuantificación de la Toxina T2 derivatizada mediante la técnica de CG-EM en modo de Barrido Completo, se realizó una curva de calibración con un estándar de concentración conocida, de la cual se llevaron a cabo diversas diluciones que previamente se derivatizaron (Tabla 9) las cuales se describen el el apartado de material y metodología, se empleó el procedimiento descrito en la segunda derivatización. El producto obtenido de la derivatización fue analizado en el Espectrómetro de Masas en modo de Barrido Completo y las áreas correspondientes a cada dilución se muestran en la Tabla 9. Adicionalmente, en la Figura 21, se presenta la curva obtenida en forma gráfica, donde se observa que la linealidad del método posiblemente se encuentra en el intervalo de 50 a 250 $\mu\text{g L}^{-1}$ y la linealidad obtenida ($R^2=0.91$) no es óptima, sin embargo la finalidad es observar la tendencia de la curva, ya que no se optimizó el método. Se observa que el orden de magnitud de la sensibilidad se encuentra alrededor de 50 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Tabla 9. Curva de calibración de Toxina T2 derivatizada en CG-EM en modo de Barrido Completo.

Concentración ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Área Bajo la Curva (ABC)
50	776
300	1658
2000	2934

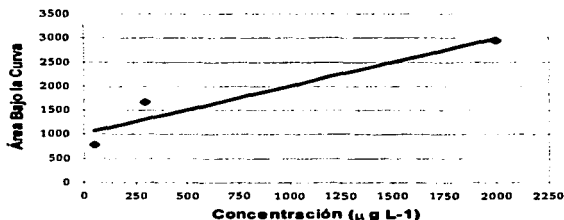


Figura 21. Curva de calibración de Toxina T2 derivatizada en CG-EM en modo de Barrido Completo.

De las muestras reales de sorgo analizadas por esta metodología no se obtuvieron resultados ya que no se registró la presencia de la Toxina T2 en los cromatogramas correspondientes. Probablemente esto se debió a la reacción de derivatización, ya que al llevar a cabo este tipo de reacción en una mezcla tan heterogénea como es el extracto de muestras de sorgo, es posible que reaccionen más componentes de ésta mezcla haciendo deficiente la derivatización de la Toxina T2 y generando gran variedad de compuestos que no permiten una adecuada separación en el cromatógrafo de gases así como una deficiente identificación en el detector de masas.

Entre las ventajas encontradas en este método de análisis se encuentran el orden de magnitud de la sensibilidad determinado, el cual es mejor respecto a la CCD y a la CG-EM modo de Barrido Completo y modo EM/EM sin derivatizar la cual es de $50 \mu\text{g L}^{-1}$, el tiempo de proceso es menor que para la CCD; entre las desventajas están las pérdidas de la toxina durante el procedimiento de la extracción, ya que se requieren de muchos pasos intermedios para llegar al extracto final, su tiempo de proceso es mayor (140 min.) al análisis de la toxina sin derivatizar, se tienen muchas más interferencias que se derivan del tipo de reacción y finalmente su costosa instrumentación.

D. Cuantificación de la Toxina T2 derivatizada en modo EM/EM del ión 350.

Para la cuantificación de la Toxina se realizó una curva de calibración con un estándar de concentración conocida, de la cual se llevaron a cabo diversas diluciones que previamente se derivatizaron (Tabla 10), las cuales se describen el apartado de material y metodología, se empleó el procedimiento descrito en la segunda derivatización. Estas diluciones se inyectaron al Cromatógrafo de Gases acoplado al Espectrómetro de Masas en modo EM/EM ión 350. En la Figura 22 se presenta la curva de calibración obtenida mediante este experimento, en la cual se observan las diferentes diluciones así como la respuesta del equipo para cada una de ellas donde se indica que el coeficiente obtenido para los tres puntos detectados fue de $r^2=0.94$, la linealidad obtenida no es la óptima, sin embargo la finalidad es observar la tendencia de la curva, ya que no se optimizó el

método.. De los resultados obtenidos, se encontró que el orden de magnitud de la sensibilidad es de $100 \mu\text{g L}^{-1}$, por otro lado, se observa que los niveles de Toxina T2 en el intervalo de 5 a $50 \mu\text{g L}^{-1}$ no fueron detectados mediante esta técnica, lo cual podría ser explicado debido a las diferentes diluciones que se realizaron para obtener esas concentraciones tan bajas, a la técnica de extracción y esto aunado a la poca abundancia relativa que presenta el ión 350 (40%).

Tabla 10. Curva de Calibración del estándar de Toxina T2 derivatizado en modo EM/EM ión 350.

Concentración ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Área Bajo la Curva (ABC)
5	ND
25	ND
50	ND
100	97
300	216
500	512

ND= No Detectado

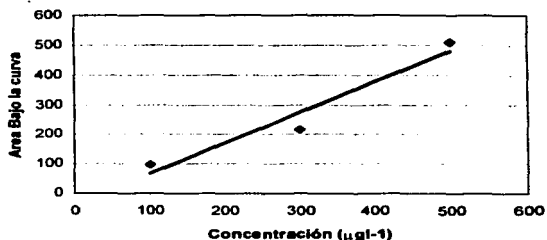


Figura 22. Curva de Calibración del estándar de la Toxina T2 derivatizada en modo EM/EM del ión 350.

De las muestras reales de sorgo analizadas por esta metodología no se obtuvieron resultados ya que no se registró la presencia de la Toxina T2 en los cromatogramas correspondientes. Se esperaba que la técnica de EM/EM aumentara la sensibilidad para la Toxina T2, debido a la eliminación de las interferencias presentes en la muestra a través de la selección de los fragmentos que son específicos en esta toxina como es el caso del ión 350. sin embargo, esto no se observó probablemente debido a la gran cantidad de pasos intermedios que se realizan durante el proceso de extracción de las muestras y a la reacción de derivatización, ya que al llevar a cabo este tipo de reacción en una mezcla tan heterogénea como es el extracto de muestras de sorgo, es posible que reaccionen más componentes de ésta mezcla haciendo deficiente la derivatización de la Toxina T2 y generando gran variedad de compuestos que no permiten una adecuada separación en el cromatógrafo de gases así como una deficiente identificación en el detector de masas.

Los resultados obtenidos del análisis de la Toxina T2 derivatizada mediante Espectrometría de Masas en modo de Barrido Completo y en modo EM/EM, permitieron establecer que el orden de magnitud encontrado es de 50 y 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ para modo de Barrido Completo y EM/EM respectivamente. Lo anterior puede ser explicado en función de la reducida abundancia relativa que presenta el ión específico seleccionado (m/z 350). No obstante, de que los niveles de detección son menores en el modo de EM/EM, se observa que la selección de un solo ión para su fragmentación secundaria permite obtener una mayor pureza electrónica en la detección de la Toxina T2. En la Figura 23 se observan los cromatogramas obtenidos empleando las dos técnicas descritas.

Entre las ventajas encontradas en este método de análisis se encuentran el orden de magnitud de la sensibilidad encontrado, el cual es mejor respecto a la CCD y a la CG-EM modo de Barrido Completo sin derivatizar, no se encontraron grandes interferencias en los experimentos debido a disolventes; el tiempo de proceso es menor que para la CCD; y la correlación encontrada de la curva de calibración ($r^2=0.94$) es mejor que la obtenida en la misma técnica pero sin derivatizar ($r^2=0.91$). Entre las desventajas están la pérdidas de la toxina durante el procedimiento de la extracción ya que se requieren de

muchos pasos intermedios para llegar al extracto final, el tiempo de proceso es considerablemente mayor (140 min.) debido al proceso de derivatización, se observa una menor sensibilidad respecto al modo de Barrido Completo derivatizado, y finalmente su instrumentación es complicada.

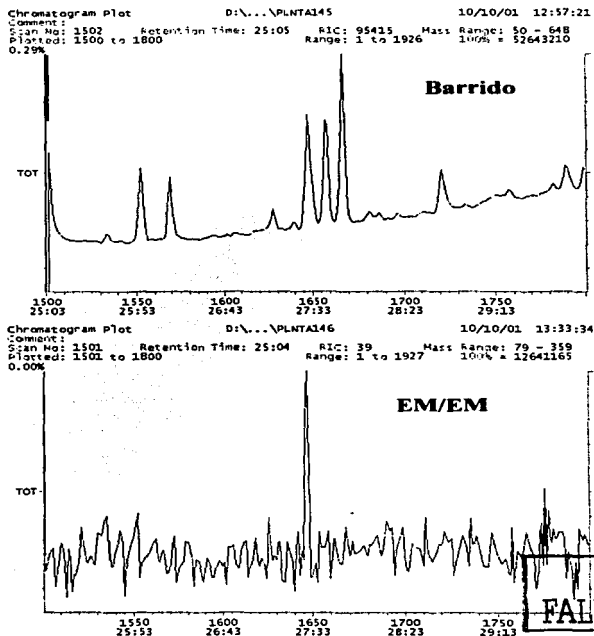


Figura 23. Cromatogramas de Toxina T2 derivatizada y analizada en modo Barrido Completo y EM/EM ión 350 m/z.

Cuantificación de la Toxina T2 Sin derivatizar por Inserción Directa-EM.

Para el análisis de la Toxina T2 mediante inserción directa en Espectrómetro de Masas, inicialmente se determinó la rampa de temperatura óptima para la desorción de la muestra en la cámara de ionización. En la Figura 24 se presentan los resultados obtenidos con diferentes velocidades de calentamiento del filamento del inserto directo, las cuales se variaron en un intervalo de 2 a 50 mA seg⁻¹, se puede observar que la mezcla presente en la muestra analizada se resuelve en forma óptima con una velocidad de 5 mA seg⁻¹.

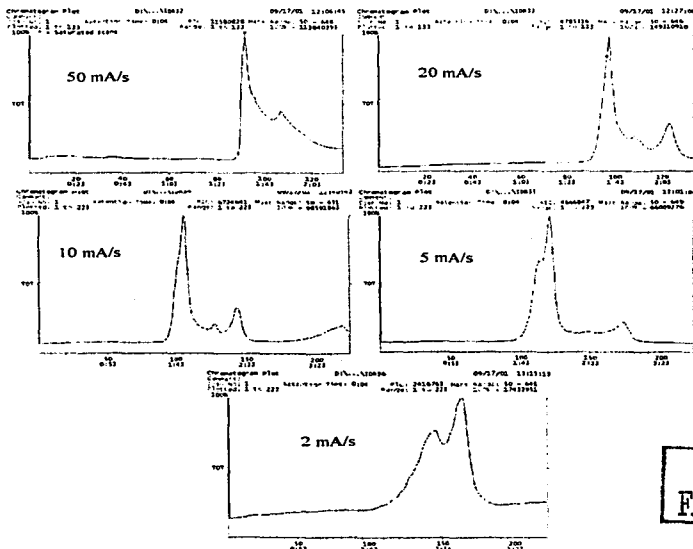


Figura 24. Termogramas de la Toxina T2 en Inserción Directa a diferentes velocidades de calentamiento del inserto directo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

Una vez establecida la velocidad óptima para el análisis de Toxina T2 mediante el Inserto Directo del Espectrómetro de Masas, se procedió a la cuantificación de muestras de estándar de Toxina T2 y de muestras de sorgo de referencia conteniendo niveles de toxina en un rango de 18 a 3000 $\mu\text{g L}^{-1}$, en los modos de Barrido Completo y EM/EM monitoreando la fragmentación de los iones 185, 304 y 364 m/z. En la Figura 25 se presentan los termogramas obtenidos del análisis de muestras mediante la inserción directa, a partir de estos análisis se puede observar que los mejores resultados en cuanto a sensibilidad y resolución, se obtienen a través de la fragmentación del ión 364, con el cual se registra la Toxina T2 hasta niveles de 45 $\mu\text{g L}^{-1}$ y presenta una variación entre los valores esperados en las muestras de referencias y los valores experimentales de 13%. Cabe mencionar que estos parámetros analíticos son aceptables considerando que las muestras no fueron derivatizadas, ni fueron separadas en el Cromatógrafo de Gases.

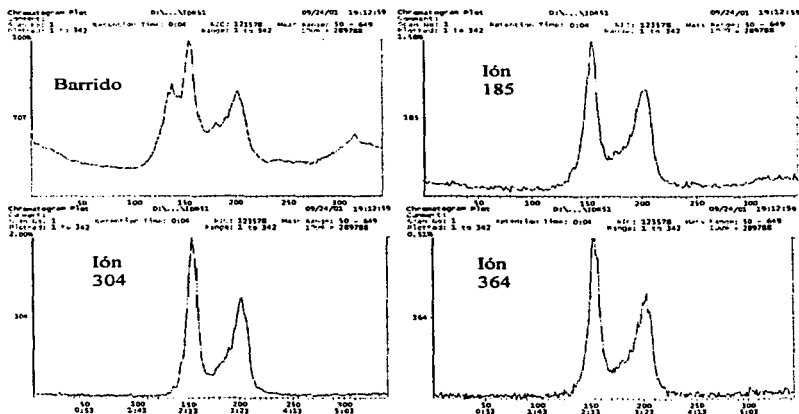


Figura 25. Termogramas de Toxina T2 sin derivatizar analizada en Inserto Directo en modo Barrido Completo y EM/EM iones 185, 304 y 364 m/z.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Entre las ventajas encontradas mediante ésta técnica se encuentran la detección de la Toxina T2 a niveles por debajo de todas las técnicas analizadas, no se requiere la derivatización de la toxina, ni la separación en el cromatógrafo de gases, su tiempo de proceso es muy corto. Una de las grandes desventajas de este método es su costosa implementación, ya que se requiere una configuración del equipo de análisis de masas que permita la inserción directa de las muestras a la cámara de ionización, así como los filamentos del inserto directo los cuales son frágiles y costosos.

Comparación de las Técnicas utilizadas para el análisis de Toxina T2

Finalmente, en la Tabla 11, se presenta la comparación de las diferentes técnicas instrumentales que fueron evaluadas para el análisis de la Toxina T2. Cabe mencionar que el límite máximo permitido por las Normas de Regulación en México es de $150 \mu\text{g L}^{-1}$.

En la Tabla 11 se observa que la técnica con el mejor orden de magnitud de sensibilidad encontrado es la Inserción Directa en el espectro de masas con $45 \mu\text{g L}^{-1}$, en contraste, la técnica de CCD presenta un orden de magnitud mínimo encontrado de $900 \mu\text{g L}^{-1}$. Adicionalmente, de todas las técnicas evaluadas, la que requiere el menor tiempo de proceso es la técnica de Inserción Directa, ya que el procedimiento se completa en 65 min en tanto que la técnica de CCD requiere de 155 min. Cabe mencionar que la técnica de ELISA presenta un orden de magnitud mínimo de $50 \mu\text{g L}^{-1}$ y un tiempo de proceso de 60 min, lo cual la convierte en una opción aceptable, sin embargo, su utilización como método de prueba no es aceptado en las Normas Oficiales que regulan los Niveles Máximos de Micotoxinas (SAGARPA, 2001), debido a que el grupo A de tricotecenos agrupa a una gran cantidad de derivados con el mismo núcleo principal (Miller, Trenholm H.L. 1994), con lo cual es posible que se presenten interacciones inespecíficas con el anticuerpo, lo que resulta en falsos positivos.

Por otro lado, la técnica de CG-EM es considerada como una de las mejores técnicas para la identificación y cuantificación de la Toxina T2 y otras toxinas del Tipo A, como ventaja de esta técnica podemos mencionar la alta sensibilidad y especificidad del equipo, entre las desventajas de esta técnica se pueden mencionar su alto costo de instrumentación y mantenimiento.

Por otro lado, la técnica de Inserción Directa no requiere una separación exhaustiva, además con esta técnica no se requiere el consumo de gases, ni se utilizan columnas, las cuales normalmente sufren un desgaste importante como sería el caso en CG-EM. Con la técnica de inserción directa no es necesario llevar a cabo la derivatización de la Toxina T2 y el tiempo de proceso es relativamente corto comparándolo con la CG-EM. La desventaja que presenta la técnica de Inserción Directa es que el costo para instrumentarla es muy elevado.

Finalmente, en el presente trabajo se muestra la técnica de Inserción Directa como una técnica con gran potencial para el análisis de la Toxina T2 y posiblemente para el análisis de otras micotoxinas.

Tabla 11. Comparación de las diferentes técnicas utilizadas para la cuantificación de la Toxina T2.

Técnica utilizada			Sensibilidad Orden de Magnitud mínima encontrada ($\mu\text{g l}^{-1}$)	Tiempo de proceso (min.)
CCD			900	155
ELISA			50	60
CG/MS	S/D (Barrido)		200	100
	D (Barrido)		50	140
	S/D (Ms/Ms)		100	100
	D (Ms/Ms)		100	140
ID	S/D (Ms/Ms)	364	45	65

VII. CONCLUSIONES

Del análisis y discusión de los resultados del presente trabajo se desprenden las siguientes conclusiones:

Se determinó el orden de magnitud de la sensibilidad de las diferentes técnicas analíticas siendo, la Inserción Directa la técnica con la cual se obtuvo la mejor sensibilidad para la cuantificación de la Toxina T2 ($45\mu\text{g L}^{-1}$).

La Inserción Directa se muestra como una técnica con gran potencial para su uso en el análisis de la Toxina T2 y posiblemente para otras micotoxinas.

La CCD es una técnica muy barata y accesible, sin embargo, está fuera de los requerimientos de la Norma para utilizarse como método de prueba.

La CG-MS es de las mejores técnicas para la determinación de Toxina T2, sin embargo el tiempo de proceso es muy largo y su instrumentación costosa.

La técnica de ELISA tiene un buen límite de detección y requiere de menos tratamiento de las muestras, pero no se admite su uso como método de prueba por las Normas Regulatoras de los Niveles Máximos de Micotoxinas.

Respecto al método de extracción es importante su optimización, especialmente en el número de pasos realizados, así como en la utilización de las columnas de extracción en fase sólida.

Cabe mencionar que el objetivo de esta tesis no fue optimizar ni validar la metodología estudiada, sin embargo, se debe mencionar como conclusión:

- Es conveniente optimizar las curvas de calibración realizadas con intervalos de concentración más amplios y más cercanos para mejorar la región lineal.
- Optimizar el recobro de las muestras.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

Bennett G.A., Megalla S.E., Shotwell O.L.. Method of analysis for deoxinivalenol and zearalenone from cereal grains. *JAOCS*, Vol. 61, No.9 (September 1984) 1449-1451.

Bérdy J., *Adv. Appl. Microbiol.*, 18, 309-406. (1974).

Betina Vladimír. *Micotoxins, Production, isolation, separation and purification*. Department of Environmental Chemistry and Technology, Slovak Polytechnical University, Bratislava, Czechoslovakia. Elsevier Science Published B.V., 1984.

Betina Vladimír. *Bioactive secondary metabolite of microorganisms*. Department of Microbiology, Biochemistry and Biology, Slovak Technical University, Bratislava, Slovak Republic. Volume 30. Elsevier Science Published B.V., 1994.

Brown R.F., *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 46 (1969) 119.

Bu'Lock J.D., *Adv. Appl. Microbiol.*, 3, 293-342. (1961).

D'Mello J.P.F., Macdonald A.M.C. *Mycotoxins*. *Animal Feed Science Technology*, 69, (1997) 155-166.

Flores Ortiz Cesar M. y Díaz de León M. Jorge D., *Micotoxinas: Métodos de análisis y alternativas de manejo*. Temas de actualidad para la industria porcina 1999. Topics of present and future interest for the swine industry. Editado por: Midia Relaciones S.A.de C.V., México. D.F. Iván R. Balconi, PHD Editor, (1999) 204-210.

Forsell, J., Kately, J.R., Yoshisawa, T., and Pestka, J.J. Inhibition of mitogen-induced blastogenesis in human lymphocytes by T-2 toxin and its metabolites. *Appl. Environ. Microbiol.* 49: 1523-1526, (1985).

Gabal M.A., Awad Y.L., Morcos M.B., Barakat A.M., and Malik G. Fusariotoxins of farm animals and micotoxic leukoencephalomalacia of the equine associated with the finding of trichothecenes in feedstuffs. *Vet. Human Toxicol.* 28:207-212, (1986).

Gore J., Rougereau A. and Person O. Determination of five trichothecenes as trimethylsilyl derivatives by gas chromatography. *Journal of Chromatography*. 291 (1984) 404-408.

Hack, R., et al.; *Lett. Appl. Microbiology* 9. A monoclonal antibody-based enzyme immunoassay for the detection of T-2 toxin at picogram levels, 133 (1989).

Heathcote J.G. and Hibbert J.R. *Aflatoxins, chemical and biological aspects*. Elsevier, Amsterdam, Oxford, New York. (1994).

Hoerr F.J., Carlton W.W., Yagen B. and Joffe A.Z. Mycotoxicosis caused by either T-2 toxin or diacetoxyscirpenol in the diet of broiler chickens. *Fundam. Appl. Toxicol.* 2:121-124. (1982).

Hsia C.C., Wu J.L., Lu X.Q., and Li Y.S. Natural occurrence and clastogenic effects of nivalenol, deoxinivalenol, 3-acetyl- deoxinivalenol, 15-acetyl- deoxinivalenol, and zearalenone in corn from a high-risk area of esophageal cancer. *Cancer Detect. Prev.* 13:79-86. (1988).

Jiménez Misericordia, Mateo Rufino. Determination of mycotoxins produced by *Fusarium* isolated from banana fruits by capillary gas chromatography and high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 778 (1997) 363-372.

Jiménez M., Mateo J.J., Mateo R. Determination of tipe A trichothecenes by high-performance liquid chromatography with coumarin-3-carbonyl chloride derivatisation and fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 870 (2000) 473-481.

Kotal F., Holadová K., Hajslová J., Poustka J., Radová Z. Determination of trichothecenes in cereals. *Journal of Chromatography A*, 830gg (1999) 219-225.

Krogh P., Hasselager E. and Friis P. *Acta Pathol. Microbiol. Scand., Sect. B*, 78 (1970) 401-413.

Krska Rudolf. Performance of modern sample preparation techniques in the analysis of *Fusarium* mycotoxins in cereals. *Journal of Chromatography A*, 815 (1998) 49-57.

Kuiper-Goodman T. Risk assessment to humans of mycotoxins in animal-derived food products. *Vet. Hum. Toxicol.* 33:325-333. (1991).

Langseth W. and Clasen P.-E. Automation of a clean-up procedure for determination of trichothecenes in cereals using a charcoal-alumina column. *Journal of Chromatography*, 603 (1992) 290-293.

Langseth Wenche, Rundberget Thomas. Instrumental methods for determination of nonmacrocylic trichothecenes in cereals, foodstuffs and cultures. *Journal of Chromatography A*, 815 (1998) 103-121.

Lin Leming, Zhang Jun, Wang Ping, Wang Yuesong, Chen Jiping. Thin-layer chromatography of mycotoxins and comparison with other chromatographic methods. *Journal of Chromatography A*, 815 (1998) 3-20.

Marasas, W.F.O., Nelson, P.E., and Toussoun. *Toxigenic Fusarium species: identity and Mycotoxicology*. Pennsylvania State University Press, University park. (1984).

Miller, J.D., Pages 65-67 in: *Issues in Food Safety, Toxicology Forum*, Washington, DC. (1988).

Miller J.D., Trenholm H.L., *Mycotoxins In Grain Compounds other than Aflatoxin*. Eagan press. St. Paul, Minnesota, USA. 1994.

Miller, K., and Atkinson, H.A.C. The in vitro effect of trichothecenes on the immune system. *Arch. Toxicol.* 11 (suppl.): 321-324, (1987).

Mossoba Magdi M., Adams Sarah, Roach John A.G. and Trucksess Mary W. Analysis of trichothecenes mycotoxins in contaminated grains by gas chromatography/matrix isolation/fourier transform infrared spectroscopy and gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of AOAC International*, Vol.79, No.5, (1996) 1116-1123.

Onji Yoshiki, Aoki Yoshinari, Tani Naoto, Umebayashi Kiyoshi, Kitada Yoshimi, Dohi Yoshiko. Direct analysis of several Fusarium mycotoxins in cereal by capillary gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 815 (1998) 59-65.

Pestka J.J., and Bondy G.S. Alteration of immune function following dietary mycotoxin exposure. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 68:1009-1016, (1990).

Petrie L., Robb J., and Stewart A.F. The identification of T-2 toxin and its association with a haemorrhagic syndrome in cattle. *Vet. Rec.* 101:326, (1977).

Phillips T.D., Chan P.K. and Hayes A.W. *Biochem. Pharmacol.* 29 (1980) 19-26.

Radová Z., Holadová K., Hajslová J. Comparison of two clean-up principles for determination of trichothecenes in grain extract. *Journal of Chromatography A*, 829 (1998) 259-267.

Rizzo A.F., Saari L. and Lindfors E. Derivatization of trichothecenes and water treatment of their trimethylsilyl ethers in an anhydrous apolar solvent. *Journal of Chromatography*, 368 (1986) 381-386.

SAGARPA. 2001. Proyecto de Norma Oficial. Límites máximos permisibles de micotoxinas en granos de cereales y alimentos balanceados para consumo de aves.

Schollenberger M., Lauber U., Jara H. Terry, Suchy S., Drochner W., Müller M.H. Determination of eight trichothecenes by gas chromatography-mass spectrometry after sample clean-up by a two-stage solid-phase extraction. *Journal of Chromatography A*, 815 (1998) 123-132.

Schothorst R.C., Jekel A.A. Determination of trichothecenes in wheat by capillary gas chromatography with flame ionisation detection. *Food Chemistry*, 73 (2001) 111-117.

Tanaka Toshitsugu, Yoneda Atsushi, Inoue Shigeto, Sugiura Yoshitsugu. Simultaneous determination of trichothecene mycotoxins and zearalenone in cereal by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 882 (2000) 23-28.

Tord E. Moller and Hakan F. Gustavsson. Determination of type A and B trichothecenes in cereals by gas chromatography with electron capture detection. *Journal of AOAC International*, Vol.75, No.6, (1992) 1049-1053.

Trenholm H. Locksley, Cochrane William P., Cohen Huguette, Elliot James I., Farnworth Edward R., Friend Douglas W., Hamilton , Standish James F. and Thompson Brian K. Survey of vomitoxin contamination of 1980 Ontario white winter wheat crop: results of survey and feeding trials. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, Vol.66, No.1, (1983) 92-97.

Turner W.B. *Fungal Metabolites*, Academic Press, London. (1971).

Vidal, D.R. Propriétés immunosuppressives des mycotoxines du groupe des trichothecenes. *Bull. Inst. Pasteur*, 88:159-192, (1990).

Vesonder R.F., and Hesseltine C.W. Vomitoxin, natural occurrence on cereal grains and significance as a refusal and emetic factor to swine. *Process Biochem.* 16:12-15, (1980).

Wilson B.J., Wilson C.H. and Hayes A.W. *Nature London*, 220 (1968) 77-78.