



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

Laboratorio Nacional en Salud: Diagnóstico Molecular y
Efecto Ambiental en Enfermedades Crónico- Degenerativas

Área de Espectrometría de Masas

Determinación de la capacidad de degradación
enzimática sobre Zearalenona y Tricotecenos *in
vitro*.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Biólogo

PRESENTA

Magdaleno Rodríguez Ángela Daniela



Asesor: Dr. César Mateo Flores Ortíz

FES IZTACALA, UNAM.

Los Reyes Iztacala, Tlalnepanitla de Baz, Estado de México 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DE DEGRADACIÓN ENZIMÁTICA SOBRE
ZEARALENONA Y TRICOTECENOS *IN VITRO*

Autor: A.D Magdaleno-Rodríguez Tutor: C.M Flores-Ortiz

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO, FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA, LABORATORIO NACIONAL EN SAULD: DIAGNÓSTICO MOLECULAR Y EFECTO
AMBIENTAL EN ENFERMEDADES CRÓNICO- DEGENERATIVAS, ÁREA DE ESPECTROMETRÍA
DE MASAS

Av. De los Barrios N°1, Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México. C.P. 54090.

México. angelamagdaleno@comunidad.unam.mx ; cmflores@unam.mx

"En algún lugar, algo increíble está esperando ser conocido".

Carl Sagan

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. César Mateo Flores Ortiz quien me permitió realizar mi trabajo de tesis en su laboratorio. Por su paciencia, por su tiempo, por su dedicación, dirección, consejos y apoyo para la realización de este trabajo que aun con las dificultades ocasionadas por la pandemia siempre encontró la forma de apoyarme.

Al M. en FQ. Luis Barbo Hernández Portilla quien en todo momento me apoyó y asesoró en las artes de la química y del HPLC, por estar al pendiente de mis experimentos ya que sin su ayuda este trabajo aun no podría estar terminado, por ser tan amable y atento aun en mis peores días. Mi respeto y admiración.

A mi comité por ayudarme siempre que lo necesité, por sus consejos, recomendaciones y apoyo a lo largo de este trabajo, por sus siempre acertadas opiniones al escrito de esta tesis. Aprovecho para mostrar mi respeto y admiración a cada una de ellas: Dra. Margarita Canales, M en C. Josefina Vázquez y M. en C. Llaraí Gaviria.

Al M. en C. Fernando Abiram García García, por estar siempre que lo necesite, por su paciencia, asesorías, apoyo y atención en cada paso a lo largo de mi formación. Lo aprecio y valoro mucho, gracias, Abi.

DEDICATORIA

A mis padres, Guadalupe y Daniel por su gran apoyo durante toda mi formación académica, por darme aun mas de lo que necesitaba, por estar para mi aun en los momentos más difíciles y oscuros. Gracias, mamá por siempre despedirme y recibirme con una sonrisa, por nunca soltarme y siempre estar para sostenerme (incluso cuando no lo merecía), no sé qué haría sin ti, eres una mujer hermosa, valiente y fuerte, eres la razón de quien soy.

A mi hermano Dany, por ser un gran ejemplo, por sus chistes y burlas, por apoyarme aun a la distancia y estar siempre para mi. Gracias por tu guía y ejemplo, eres una persona súper brillante, inteligente y llena de vida. ¡Te quiero mucho!

A mi pequeña y hermosa hermana Sandy, por apoyarme, leer y desvelarse conmigo, por aguantar que le leyera cada párrafo de esta tesis para que tuviera sentido y no me sintiera mal. Por hacerme la vida más simple y bonita, enseñarme el valor de las cosas y hacerme feliz con cada una de sus ocurrencias, por escucharme, los consejos, por tanto y tanto apoyo, por compartir tanto conmigo. Eres un ser lleno de luz, de vida, tan puro; ojalá la vida nos de mucho tiempo juntas porque no me veo sin ti. Te adoro.

A mis abuelitos, que siempre me han apoyado y aconsejado para bien, por siempre tenerme un plato de comida y una camita suave y caliente siempre que lo necesité. Espero la vida me permita disfrutarlos por muchos años más. Los amo y admiro.

A mis amigos, por siempre estar ahí, por las risas y apoyo cuando más lo necesite, por hacerme creer y valorar la amistad. Tona, Omar, Marco, Roberto, Luis, Nat, Viri, Irlanda y Geraldine; muchas gracias por permitirme ser su amiga y enseñarme tanto, por escucharme y aconsejarme (aunque casi nunca les hiciera caso), siempre los llevaré conmigo. Los quiero

A mi linda Brenda Zarraga, por que, aunque la vida nos ha llevado por rumbos distintos, sigue estando para mi cuando la he necesitado. Por creer y confiar en mi, por permitirme ser su amiga por tantos años. Apachurro.

A Fernando, por estar en cada paso de mi formación, por las enseñanzas académicas y personales, por creer en mi incluso cuando yo no lo hacia, por preocuparse por mi educación. Por quedarse conmigo hasta tarde y por cada regaño sutil, por tu asesoría en los experimentos y solucionarme cualquier duda. Por permitirme estar a lo largo de la maestría, aunque yo la haya hecho más difícil y pesada de lo que ya era. Gracias por cerrar este gran ciclo conmigo. Te apreció y valoro mucho, gracias por estar.

Con todo mi cariño y gratitud.

ÍNDICE.....	6
RESUMEN.....	8
1. INTRODUCCIÓN.....	9
2. MARCO TEÓRICO.....	12
2.1 MICOTOXINAS.....	12
2.1.1 GENERALIDADES	12
2.1.2 FUSARIUM.....	13
2.1.2.1 ZEARALENONA.....	13
2.1.2.2 TRICOTECENOS	14
2.1.2.2.1 TOXINA T-2.....	16
2.1.2.2.2 TOXINA HT-2	19
2.2 INACTIVACIÓN DE MICOTOXINAS.....	20
2.3 ENZIMAS.....	21
2.3.1 ESTERASAS	23
2.4 LEVADURAS	24
3. JUSTIFICACIÓN	26
4. ANTECEDENTES	27
5. HIPÓTESIS	29
6. OBJETIVOS	29
6.1 OBJETIVO GENERAL	29
6.2 OBJETIVOS PARTICULARES	29
7. MATERIAL Y MÉTODOS.....	30
7.1 INACTIVACIÓN POR ESTERASAS	30

7.1.1 ZEARALENONA	30
7.1.2 TOXINA T-2	30
7.2 INACTIVACIÓN POR LEVADURAS	30
7.2.1 ZEARALENONA	30
7.2.2 TOXINA T-2	31
7.3 INACTIVACIÓN POR EXTRACTO DE LEVADURAS.....	31
7.3.1 ZEARALENONA	31
7.3.2 TOXINA T-2	31
7.4 CUANTIFICACIÓN DE ZEA Y TRICOTECENOS RESIDUALES	32
7.4.1 HPLC-ESI-TOF-MS	32
7.5 PROCESAMIENTO DE DATOS	32
<u>8. RESULTADOS</u>	<u>34</u>
8.1 ZEARALENONA	34
8.2 TOXINA T-2	39
8.2.1 TOXINA T-2 PH7	39
8.2.2 TOXINA T-2 PH 8	44
8.2.3 ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES DE INTERACCIONES DE TOXINA T2 CON LOS TRATAMIENTOS	44
8.3 TOXINA HT-2.....	47
8.3.1 ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES DE INTERACCIONES DE TOXINA HT2 CON LOS TRATAMIENTOS	48
<u>9. DISCUSIÓN</u>	<u>50</u>
9.1 ZEARALENONA	50
9.2 TOXINA T2	52
9.3 TOXINA HT2.....	54
9.4 CONSIDERACIONES FINALES.....	55
<u>10. CONCLUSIONES</u>	<u>57</u>
<u>11. LITERATURA CITADA.....</u>	<u>58</u>

RESUMEN

Las micotoxinas son metabolitos secundarios de alta toxicidad, producidos por una gran diversidad de hongos, principalmente de los géneros *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*. Estos metabolitos al ser ingeridos por el hombre y/o animales ocasionan la micotoxicosis generando efectos adversos para la salud. Por otro lado, se ha descrito la presencia de micotoxinas conjugadas, las cuales al modificar su estructura primaria se enmascaran durante su análisis, dando lugar a falsos negativos. En los últimos años, se han utilizado los microorganismos y/o enzimas en procesos de biodegradación de micotoxinas mostrando eficacia. Por lo que en este trabajo se plantea la biodegradación de zearalenona y toxina T-2, así como alguno de sus posibles conjugados, por esterases, extracto de levadura y *Saccharomyces* sp. Se realizaron tres ensayos a concentraciones de 5 (95 U) y 1.6 mg(25 U) de esterasa para zearalenona y toxina T-2 respectivamente, otro con 22 mg de *Saccharomyces* sp., así como 22 mg de extracto de levadura en buffer de fosfatos 150 mM a pH 7 y pH 8 y se incubaron durante 60 min a 41°C. El análisis de la zearalenona y toxina T-2 residual se realizó por HPLC-ESI-TOF-MS. En el caso de zearalenona, las esterases a pH 8 presentó el 60.54% de degradación y el 86.58% con *Saccharomyces* sp a pH 7. Mientras que para toxina T-2 la esterasa presentó hasta el 17.99% de degradación para las concentraciones más altas mientras que *Saccharomyces* sp. presentó hasta un 10.66% de degradación, respecto al tratamiento con extracto de levadura se muestra un incremento en la concentración final, lo cual indica la posible presencia de una forma conjugada de la toxina T-2, que al ser tratada con dicho extracto es liberada siendo así detectada. La biodegradación registrada por esterasa podría afectar tanto el grupo éster presente en la estructura de zearalenona como el grupo éster expuesto en la estructura de la toxina T-2, así mismo *Saccharomyces* sp. presenta estereasas que pueden tener actividad en el mismo grupo éster. Se concluye que la esterasa y *Saccharomyces* sp. presentan actividad biodegradante ante zearalenona y toxina T-2.

1. INTRODUCCIÓN

Mundialmente se desechan cada año enormes cantidades de alimentos por contaminación por hongos tóxicos o por sus metabolitos, esto ocurre con mayor frecuencia en las zonas cálidas (Flores *et al.*, 2016). Las micotoxinas son metabolitos secundarios de alta toxicidad, producidos por diversas especies de hongos pertenecientes principalmente a los géneros *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium* (Smith, Moss, 1985). Estos metabolitos ejercen su efecto principalmente por ingestión provocando en el hombre y en los animales disturbios en la salud, denominados micotoxicosis (Quiroga, 2002). Suelen encontrarse en una gran variedad de productos agrícolas, siendo los contaminantes naturales de los alimentos más extendidos a nivel mundial. Dichos metabolitos son altamente tóxicos, mutagénicos, cancerígenos, teratógenos e inmunosupresores. Debido a su gran variedad de efectos tóxicos y sobre todo a su extrema resistencia al calor, la presencia de las micotoxinas en los alimentos es considerada de alto riesgo para la salud humana y de los animales (Kennedy *et al.*, 1998; Laser *et al.*, 2003, Reed *et al.*, 2004; Skládanka *et al.*, 2011).

Las micotoxinas no están dispersas en todos los productos alimenticios, pero usualmente se presentan en focos llamados "hot spots" en el alimento. Esto representa una dificultad para el muestreo, ya que las micotoxinas pueden no ser detectadas analíticamente, aún con buenos procedimientos de muestreo (Flores *et al.*, 2012).

Las micotoxinas también pueden estar enmascaradas en la detección analítica por moléculas pequeñas como: glucósidos, glucurónidos, ésteres de ácidos grasos y proteínas, las cuales pueden estar conjugadas a la toxina, dando así un resultado falso negativo. Generalmente, presentan comportamientos químicos distintos a las micotoxinas de origen, siendo no detectadas en los análisis comunes (Arroyo-Manzanares, 2014). Sin embargo, las moléculas conjugadas pueden ser removidas durante la digestión, liberando la micotoxina para afectar al animal. Este fenómeno ocurre fundamentalmente en las toxinas de *Fusarium* sp. (tricotecenos, zearalenona y fumonisinas), aunque han sido descritas para otras micotoxinas.

La zearalenona (ZEA) es una micotoxina estrogénica no esteroidal, que contamina principalmente maíz y en un menor grado cebada, avena, trigo, sorgo, mijo y arroz. Induce efectos estrogénicos, provocando alteraciones en la reproducción, disminución de la fertilidad,

reducción del tamaño de camada, peso cambiante de las glándulas suprarrenales, tiroides y glándulas pituitarias, así como cambio en los niveles séricos de progesterona y estradiol (Marin *et al.*, 2010). Los tricotecenos han sido clasificados en dos grupos: Grupo A, el cual incluye a la Toxina T-2, Toxina HT-2 y al Diacetoxicirpenol (DAS); Grupo B: que incluye Deoxinivalenol (DON), Nivalenol (NIV) y Fusarenona X (Sweeney y Dobson, 1998). La toxina T2 presenta un anillo epóxido en los carbonos 12-13, un número variable de grupos hidroxilo y sustituciones acetoxi (Langseth y Rundberget, 1998; Schmale y Munkvold, 2019). La toxina T-2 es metabolizada rápidamente a través de diferentes formas de biotransformación que incluyen: la hidrólisis, la hidroxilación, de-epoxidación, glucorinidación y la acetilación. Los efectos tóxicos de las toxinas T-2 y HT-2 incluyen: reducción del peso, dermatotoxicidad, daño hepático, toxicidad reproductiva, neurotoxicidad, hemato e inmunotoxicidad.

Debido a la importancia económica y el impacto que representan para la salud, la prevención y eliminación de la contaminación producida por micotoxinas es de suma relevancia, por lo que se han desarrollado diferentes métodos para la detoxificación considerando las micotoxinas de mayor incidencia, su estructura, así como su capacidad de reaccionar con otras moléculas que permitan su transformación a otras estructuras no tóxicas (Borrel y Gimeno, 2003).

Dentro de estos métodos podemos encontrar a los métodos naturales, métodos físicos, los métodos químicos y los microbiológicos. Un método químico comúnmente utilizado son los adsorbentes, los cuales son polímeros de alto peso molecular con múltiples ramificaciones que carecen de nutrientes, no son digeribles y no son fermentables (Ramos *et al.*, 1996). Estos polímeros recorren el tracto digestivo sin degradarse y absorben pequeñas moléculas para impedir su absorción en el tracto digestivo. Los adsorbentes pueden ser materiales inorgánicos a base de aluminosilicatos como las zeolitas, la bentonita y la tierra diatomácea. Los adsorbentes orgánicos contienen carbón vegetal activado, lignina y polímeros glucomananos extraídos de la pared celular interna de la levadura. La naturaleza inespecífica de los adsorbentes los hace aptos para múltiples contaminantes de distintas estructuras químicas, tanto en formas libres como conjugadas presentes en los alimentos. No obstante, la falta de especificidad significa que los adsorbentes también tienen la capacidad de unirse a otras moléculas pequeñas, como las vitaminas, minerales, aminoácidos y ácidos biliares. En consecuencia, el nivel de

inclusión del adsorbente deberá ser apropiado para el grado de contaminación con micotoxinas de acuerdo con lo que se determine.

Como se menciona, existen métodos microbiológicos dentro de los cuales se encuentran las enzimas, los diferentes tipos de enzimas pueden ser clasificados de acuerdo con sus propiedades químicas. Las lipasas (glicerol-éster hidrolasas; EC 3.1.1.3) son enzimas que catalizan la hidrólisis de los enlaces éster presentes en los acilgliceroles *in vivo*. Además, pueden catalizar la hidrólisis o síntesis de un grupo amplio de ésteres carboxílicos (Bornscheuer *et al.*, 1994). Algunos organismos como las levaduras tienen dentro de alguna de sus estructuras celulares enzimas, las cuales pueden ser útiles en la degradación o adsorción de micotoxinas.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 MICOTOXINAS

2.1.1 GENERALIDADES

Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos por algunos tipos de hongos, los cuales son necesarios para su desarrollo en presencia de otros organismos (Motta,2009.) Estos metabolitos son producidos por hongos pertenecientes a la división Ascomycota,

Los organismos de la división Ascomycota conforman el grupo de hongos más grande, diverso e importante ecológicamente hablando; representan el 60% de las especies y el 72% de los géneros descritos (Medel *et al.*, 1999; González y Hanlin, 2008; Kirk *et al.*, 2008). La distribución de este grupo de organismos es cosmopolita y se han encontrado colonizando tanto hábitats continentales como marinos, ya sea como saprobios, parásitos o simbioses, lo que los hace participar en diferentes procesos e interacciones ecológicas para el funcionamiento de ecosistemas. Para el crecimiento de los hongos y la producción de micotoxinas existen tres factores fundamentales que son condicionantes (Zuloaga, 2013; Gimeno y Martins, 2011.):

1. Físicos
 - a. Humedad relativa
 - b. Temperatura
2. Químicos
 - a. pH (entre 4 y 8)
 - b. Composición del sustrato (nutrientes, minerales)
 - c. Relación O₂/CO₂
3. Biológicos
 - a. Cepas específicas
 - b. Presencia de otros organismos

Estos organismos pueden contaminar alimentos, forrajes o las materias primas utilizadas para la elaboración de alimentos, ya sea durante su almacenamiento, transporte o procesamiento (Soriano, 2007).

Dentro de los géneros productores de micotoxinas reportados se encuentran: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Claviceps*, *Stachybotrys*, *Trichoderma*, *Alternaria*, *Chaetium*, siendo los tres primeros los que presentan una mayor producción de micotoxinas, de las cuales destacan: aflatoxinas, citrinina, fumonisinas, ocratoxina A, patulina, **tricotecenos** y **zearalenona** (Bonifaz, 2012; Cabañes *et al.*, 2007).

Estos metabolitos son causantes de micotoxicosis por ingesta, tanto por vegetales (micotoxicosis primaria,) como por carne o leche provenientes de animales que hayan consumido las micotoxinas en forrajes (micotoxicosis secundaria) (Perusia y Rodríguez, 2011), lo que ocasiona repercusiones negativas en la salud del hombre como en diferentes especies de animales.

2.1.2 FUSARIUM

El género *Fusarium* está constituido por un grupo cosmopolita de hongos filamentosos con más de 100 especies descritas, las cuales se encuentran ampliamente distribuidas en zonas tropicales y subtropicales (Serrano-Colli y Cardona-Castro, 2015). Este mismo género forma parte de la flora de campo (fitopatógenos, en plantas vivas) y de la flora intermedia (sustratos de cereales recién cosechados y aún húmedos). Estos hongos crecen entre 6 y 40°C con temperatura óptima entre 18 y 30°C. Requieren de una humedad relativa mayor al 88% para crecer y proliferar y superior al 91% para la producción de micotoxinas. *Fusarium* es uno de los géneros con mayor capacidad genética para la producción de estos metabolitos cuando se tiene las condiciones físicas, químicas y biológicas propicias para ello.

Dentro de las micotoxinas producidas por el género *Fusarium* se encuentran: Moniliformina (MON), Fumonisinas B1 (FB1), Diacetoxiscirpenol (DAS), **Zearalenona (ZEA)** y los **Tricotecenos**, las cuales son causantes de micotoxicosis en especies de animales como pollos, gallinas, patos, pavos, cerdos, vacas lecheras y conejos (Gimeno y Martins, 2011); son capaces de inducir efectos tóxicos agudos y crónicos, los cuales dependen del tipo de micotoxina, la cantidad y el tiempo de exposición, la especie y edad del organismo (Antonissen *et al.*, 2014).

2.1.2.1 ZEARELENONA

La zearalenona (ZEA) (ácido beta resorcídico (6-(10-hidroxi-6-oxo-trans-1-undecenil) lactona) (C₁₈H₂₂O₅ PM 318.3642) PM 318.4 g/mol) (Fig. 1) es una micotoxina estrogénica

no esteroidal producida por el género *Fusarium*, pero en mayor concentración por *F. roseum* (3000-15000 mg/kg), existen 16 derivados de zearalenona, donde el más importante es zearalenona y posteriormente el alfa y beta- zearalenol. Puede encontrarse como contaminante natural del maíz, cebada, trigo, avena, sorgo y semillas de sésamo, así como en ensilaje de heno y maíz (Gimeno y Martins, 2011; Marin *et al.*, 2010).

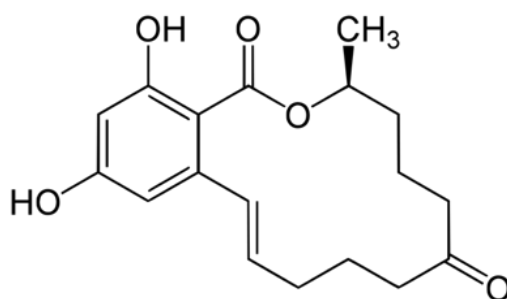


Figura 1. Estructura de la Zearalenona (ZEA)

Zearalenona presenta efectos hormonales (estrogénicos) dando lugar a casos muy significativos de hiperestrogenismo, causando alteraciones en la reproducción, cambios en el peso de las glándulas suprarrenales, tiroideas y pituitarias; disminución en el tamaño de la camada, alteraciones en los niveles séricos de progesterona y estradiol e infertilidad cuando la ingesta es elevada, principalmente en cerdos (Marin *et al.*, 2010; OMS, 2018).

El mecanismo de acción de ZEA es semejante al de los estrógenos, inhibe la maduración folicular y la ovulación por la disminución en la concentración de FSH (hormona foliculoestimulante), ya que la micotoxina, a pesar de la diferencia estructural puede adoptar una conformación semejante al 17-beta-estradiol y otros estrógenos de origen natural que permiten la unión a los receptores.

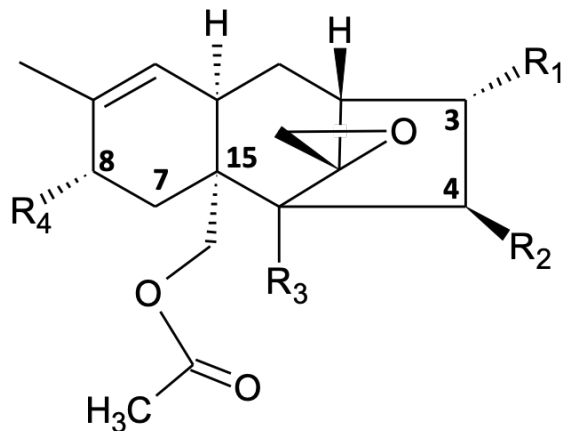
2.1.2.2 TRICOTECENOS

Los tricotecenos son producidos por hongos del género *Fusarium*, principalmente por las especies: *F. tricinatum*, *F. nivale*, *F. roseum*, *F. graminearum*, *F. solani*, *F. culmorum* y *F. poae* (Serrano-Colli y Cardona Castro, 2015).

Los tricotecenos son ésteres de alcoholes sesquiterpenoides (moléculas de 15 átomos de carbono) posicionados alrededor de un anillo tetracíclico, caracterizados por dos propiedades

funcionales críticas: un doble enlace entre C9 y C10 y un anillo epóxido en C12 y C13 (Fig. 2). De acuerdo con la sustitución de los grupos funcionales específicos, estas toxinas se dividen en cuatro grupos de toxicidad variada en relación con su estructura. El grupo A está conformado por la **Toxina T-2, HT-2**, Monoacetoxiscirpenol (MAS), Triacetoxiscirpenol (TAS), Escirpentriol (STO), Diacetoxiscirpenol (DAS), las cuales poseen un grupo hidroxilo, un grupo éster o ninguna cadena lateral en C8. El grupo B está compuesto por Deoxinivalenol (DON), Fugarenona X, Nivalenol (NIV), Tricodermina y tricotecina, que tienen un grupo ceto en su estructura; este grupo tiene una toxicidad relativamente baja en comparación al grupo A. El grupo C está comprendido por los tricotecenos que tienen un segundo anillo epóxido, mientras que el grupo D presenta un anillo macrocíclico (Bin-Umer *et al.*, 2011; Suzuki y Iwahashi, 2014; Serrano-Colli y Cardona Castro, 2015, Santillan *et al.*, 2017).

La toxicidad de los tricotecenos se caracteriza por alteraciones gastrointestinales como vómito y diarrea. Asimismo, estas toxinas presentan una interacción con la unidad ribosomal 60S, lo que genera la inhibición de la traducción. Esto provoca la inhibición de la regeneración celular, por lo que al estar en contacto con la toxina puede generar dichas alteraciones intestinales derivada de la inflamación celular (Suzuki y Iwahashi, 2014).



Tricoteceno	R1	R2	R3	R4
Toxina T2	OH	OAc	OAc	OCOCH ₂ CH(CH ₃) ₂
Toxina HT2	OH	OH	OAc	OCOCH ₂ CH(CH ₃) ₂
DAS	OH	OAc	OAc	H
NEO	OH	OAc	CH ₃	CH ₃

Figura 2. Estructura de Tricotecenos tipo A

2.1.2.2.1 TOXINA T-2

La toxina T-2 (Fig. 3) pertenece al grupo A de los tricotecenos, es un éster de alcohol sesquiterpenoide (moléculas de 15 átomos de carbono) posicionado alrededor de un anillo tetracíclico, presenta un doble enlace entre C9 y C10 y un anillo epóxido en C12 y C13, un grupo éster y sustituciones acetoxi, cuyo PM es 466.5 g/mol (Bin-Umer *et al.*, 2011; Schamale y Munkvold, 2014; Santillán *et al.*, 2017). Puede encontrarse como contaminante natural en cereales como: maíz, cebada, sorgo, avena, trigo, arroz, centeno y mijo; así como en subproductos de estos.

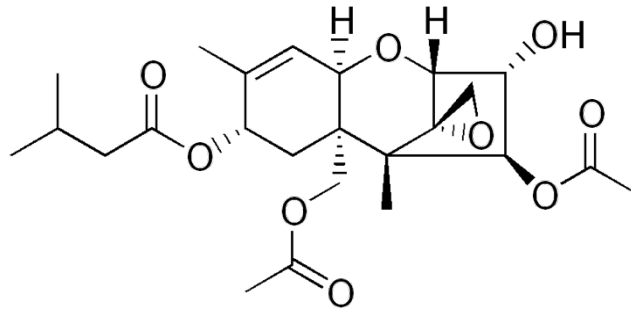


Figura 3. Estructura de la toxina T-2

El efecto de la toxina consiste en generar necrosis en los epitelios de las mucosas de la cavidad bucal cuando se entra en contacto con ella, por lo que se producen lesiones agudas en el tracto digestivo, atravesando el epitelio intestinal y llegando al compartimento sistémico, ocasionando degeneración de la médula ósea y una inhibición significativa en el sistema inmune. La inmunidad de la mucosa intestinal puede verse afectada por las micotoxinas del género *Fusarium*, por lo que la viabilidad y la proliferación de células epiteliales intestinales pueden verse afectadas negativamente (Fig. 4) (Antonissen *et al.*, 2014; Gimeno y Martins, 2011).

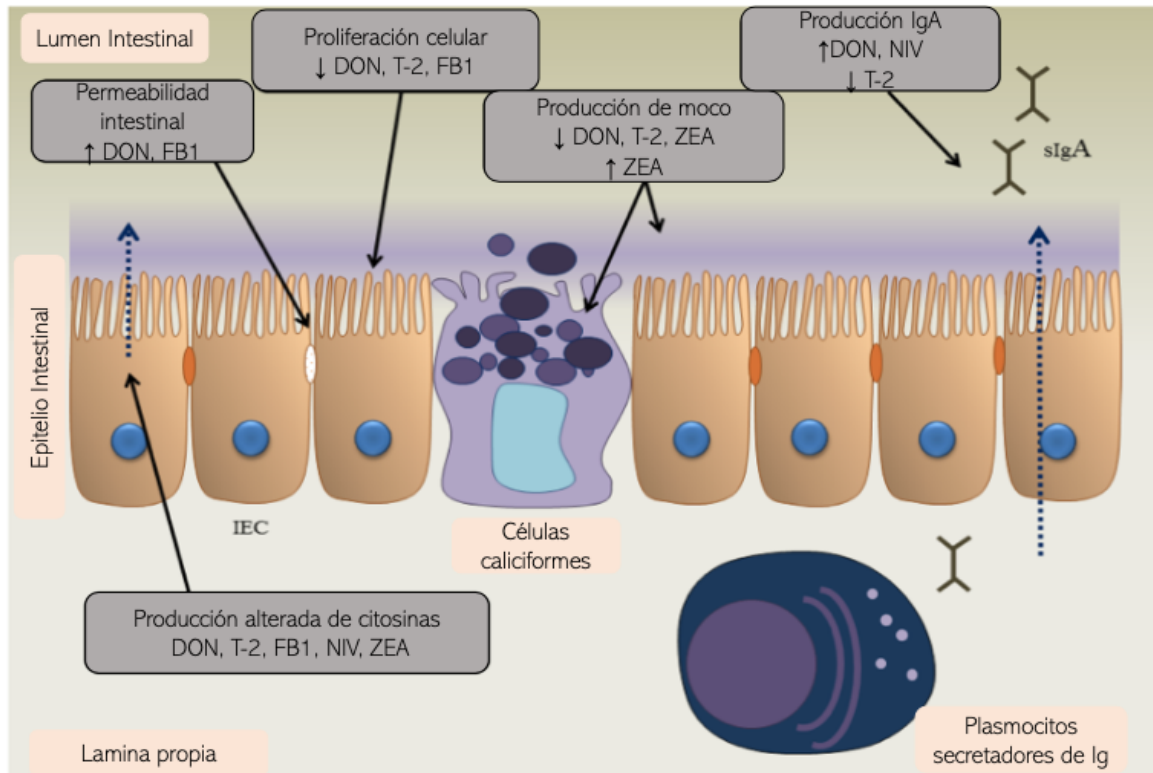


Figura 4. Efecto de las micotoxinas de *Fusarium* en el epitelio intestinal donde se observan las alteraciones de cada una de las micotoxinas a los diferentes mecanismos de defensa intestinal, incluida la integridad epitelial, la proliferación celular, la capa de moco, las inmunoglobulinas (Ig) y la producción de citosinas (Antonissen *et al.*, 2014)

Las principales afecciones provocadas por la toxina son gastrointestinales y sistémicas, afectando el sistema digestivo, nervioso, circulatorio y tegumentario (Gimeno y Martins, 2011). T-2 puede producir toxicidad aguda en humanos, provocando irritación de la piel o de la mucosa intestinal y diarrea. Los efectos crónicos descritos en animales incluyen la inmunodepresión (OMS, 2018). Se ha encontrado que T-2 inhibe la traducción al evitar la formación del enlace peptídico inicial (Bin-Umer *et al.*, 2011).

2.1.2.2.2 TOXINA HT-2

La estructura de la toxina HT-2 difiere de la toxina T-2 solo en el grupo funcional en la posición C4. La fórmula molecular de la toxina HT-2 es $C_{22}H_{32}O_8$ con un peso de 424,5 g/mol (Fig 5). Es producida principalmente por hongos del género *Fusarium*, en particular *F. tricinctum*, *F. sporotrichoides*, *F. poae*, *F. solani* y *F. equiseti*. La presencia en granos y semillas de la toxina HT-2 se encuentra ligada a la presencia de la toxina T-2; en animales, plantas y hongos esta relación se debe a la rápida metabolización de la toxina T-2 a toxina HT-2 (Resnik & Pacin, 2007; Petterson, 2010).

Debido a que la toxina HT-2 es un metabolito del metabolismo y/o degradación de la toxina T-2 por diferentes microorganismos y/o enzimas presentes en los granos y cereales contaminados, hay dificultad para distinguir los efectos de la toxina HT-2 de los efectos de la toxina T-2 en organismos vivos (Eriksen & Pettersson, 2004).

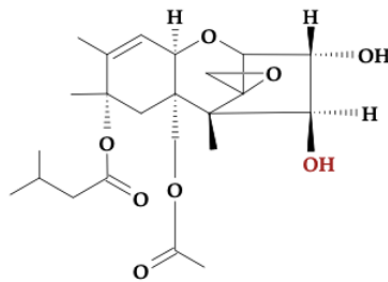


Figura 5. Estructura de la toxina T-2

2.2 INACTIVACIÓN DE MICOTOXINAS

Es importante tener en consideración que, los hongos pertenecientes al género *Fusarium* que pueden producir micotoxinas, crecen en diversos cultivos y alimentos. Aunque la producción de la micotoxina suele ser genótipicamente específica para la especie, el mismo compuesto puede ser también producido por especies distintas del mismo u otros géneros; aunado a esto, una especie tiene la capacidad de producir diferentes micotoxinas a la vez (Zain, 2011; Abarca *et al.*, 2000).

Generalmente los hongos no crecen en alimentos secos y almacenados correctamente, ya que necesitan de la presencia de humedad y temperatura específica para su crecimiento, proliferación y producción de micotoxinas, por lo que un buen almacenamiento y tratamiento de los productos y alimentos, son consideradas medidas adecuadas contra el crecimiento de mohos y la producción de micotoxinas (OMS, 2018). Sin embargo, se ha observado que estas medidas no son suficientes, ya que el hongo puede no estar presente y no obstante el metabolito permanecer en el sustrato (Gimeno y Martins, 2011).

Es por ello por lo que se han elaborado diferentes métodos para la detoxificación de granos y alimentos (Borrel y Gimeno):

1. Naturales

Donde se destaca la aplicación de los ácidos tauricólicos, glucurónico y sulfúrico, los cuales se conjugan con la micotoxina, dando lugar a metabolitos inocuos que se eliminan por bilis y orina.

2. Físicos

- a. Radiaciones: Los rayos X pueden emitir una elevada cantidad de energía, la cual produce la ruptura de estructuras moleculares estables. Se ha encontrado que las aflatoxinas son más sensibles a este tipo de tratamientos.
- b. Calor: El calor resulta poco eficaz, ya que las altas temperaturas que se alcanzan durante el proceso de detoxificación afectan a las vitaminas y proteínas del alimento. En cambio, esta misma temperatura puede ser utilizada para aumentar la capacidad reactiva de moléculas como ácidos, álcalis y otros agentes.

3. Químicos

- a. Insecticidas: Actualmente no se emplea este método debido a la problemática de los residuos derivada de los mismos.
- b. Solventes: Debido a la solubilidad de las micotoxinas se han realizado combinaciones de solventes orgánicos, tales como hexano-acetona-agua o isopropanol-agua, entre otros para arrastrar micotoxinas.
- c. Agentes químicos reactivos: Aquellos que reaccionan con la estructura de las micotoxinas.
 - i. Ácidos.
 - ii. Alcalis.
 - iii. Agentes oxidantes.
 - iv. Agentes reductores.
- d. Agentes químicos inertes: Aquellas sustancias capaces de adsorber las moléculas de micotoxina en su estructura.
 - i. Polímeros de polivinilpirrolidona
 - ii. Arcillas, silicatos sintéticos.

4. Microbiológicos

- a. Enzimas
- b. Flora ruminal
- c. Bacterias
- d. Hongos

2.3 ENZIMAS

Una enzima es un catalizador biológico. Es una proteína que facilita y acelera la velocidad de una reacción química específica. La enzima no se destruye durante la reacción y se utiliza una y otra vez (<https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Enzima>). Las enzimas tienen una enorme variedad de funciones dentro del organismo (Cuadro 1).

CLASIFICACIÓN	REACCIÓN CATALIZADA	REACCIÓN TÍPICA
Oxidorreductasas (EC 1.x.x.x)	Reacciones de oxidación/reducción y de transferencia de átomos de H, O, así como de electrones desde una sustancia a otra.	$AH + B \rightarrow A + BH$ (reducido) $A + O \rightarrow AO$ (oxidado)
Transferasas (EC 2.x.x.x)	Transferencia de un grupo funcional desde una sustancia a otra. El grupo puede ser metil-, acil-, amino- o fosfato.	$AB + C \rightarrow A + BC$
Hidrolasas (EC 3.x.x.x)	Formación de dos productos de un sustrato por hidrólisis.	$AB + H_2O \rightarrow AOH + BH$
Liasas (EC 4.x.x.x)	Adición o eliminación no hidrolítica de grupos de los sustratos. Pueden romper los enlaces C-C, C-N, C-O o C-S.	$RCO_2COOH \rightarrow RCOH + CO_2$
Isomerasas (EC 5.x.x.x)	Isomerización de una molécula.	$AB \rightarrow BA$
Ligasas (EC 6.x.x.x)	Unión de dos moléculas por síntesis de nuevos enlaces C-O, C-S, C-N o C-C con la ruta simultánea de ATP.	$A + B + ATP \rightarrow AB + ADP + P_i$
Translocasas (EC 7.x.x.x)	Catalizar el movimiento de iones o moléculas a través de las membranas o su separación dentro de las membranas.	$ATP + H_2O + H^+ = ADP + P_i + H^+$

Cuadro 1. Clasificación de enzimas: reacción catalizada y reacción típica (McDonald *et al.*, 2009)

2.3.1 ESTERASAS

Las esterasas son enzimas que catalizan reacciones de hidrólisis (Fig. 6). Hay diferentes tipos y con muy diferente distribución en los tejidos y organismos. Las carboxiesterasas (esterasas tipo B) son un grupo de enzimas en mamíferos que hidrolizan a grupos éster, amida, tioéster, ésteres de fosfato y anhídridos de ácido (Fig. 7).

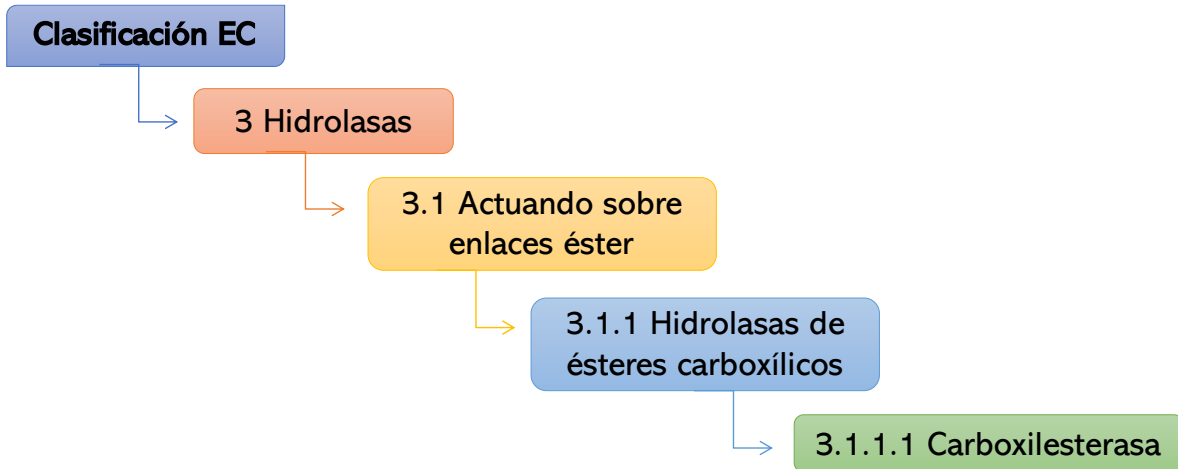


Figura 6. Clasificación de enzimas (<https://www.brenda-enzymes.org>)

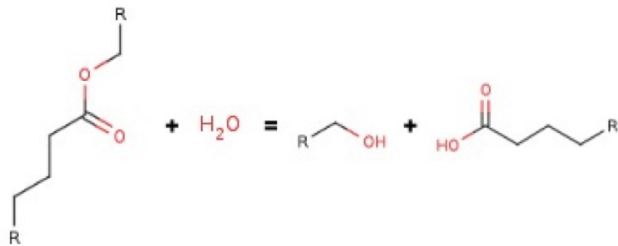


Figura 7. Esquema de reacción (<https://www.brenda-enzymes.org>)

2.4 LEVADURAS

El reino de los hongos está conformado por organismos eucariontes, heterótrofos que poseen una gran diversidad de estructuras, funciones, formas de crecimiento, tamaños y formas de vida. Sus células son alargadas y al alinearse unas con otras forman filamentos denominados hifas; éstas se entrelazan para formar el micelio; a estos hongos se les denomina filamentosos. Su pared celular está formada por polisacáridos, polipéptidos y quitina, lo que le confiere una mayor rigidez. Sin embargo, algunos hongos pueden estar formados por una sola célula y se les conoce como levaduras (Cuevas, 2016).

Las levaduras son hongos que forman sobre los medios de cultivo colonias pastosas, constituidas en su mayor parte por células aisladas que suelen ser esféricas, ovoides, elipsoideas o alargadas. El tamaño de las levaduras oscila de 1 a 9 μm de ancho y de 2 a más de 20 μm de longitud según la especie, nutrición, edad y demás factores. Los principales componentes de las paredes celulares de las levaduras (Fig. 8) son los β -glucanos, glucomananos y manoproteínas (Fig. 9). Alrededor del 75% del peso seco de la pared celular de las levaduras está formado por polisacáridos (Castañeda *et al.*, 2012).

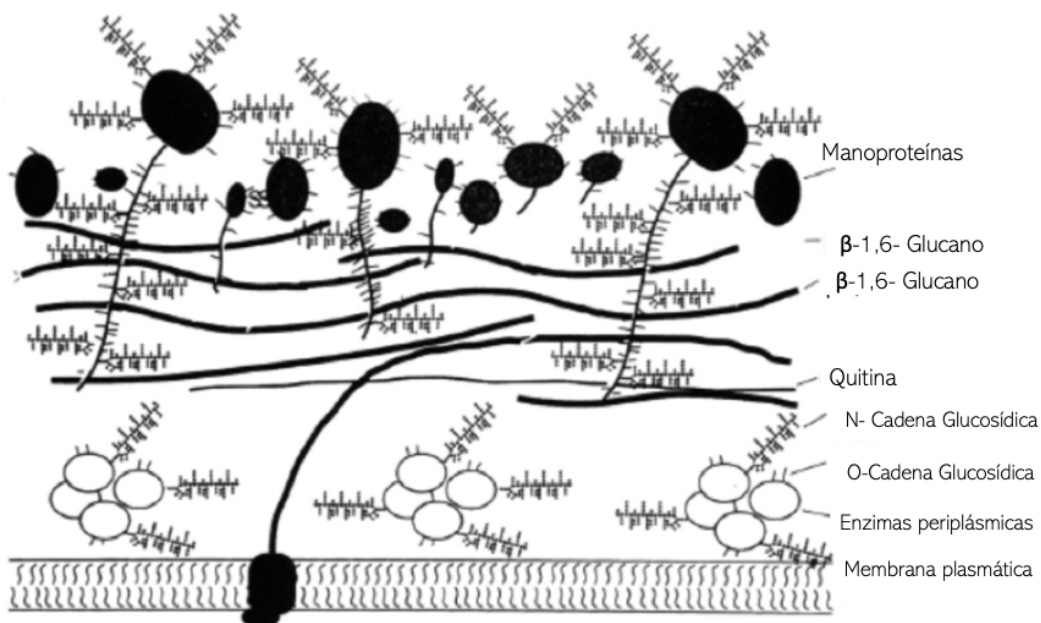


Figura 8. Ilustración de la composición de las paredes celulares de levaduras (Osumi, 1998).

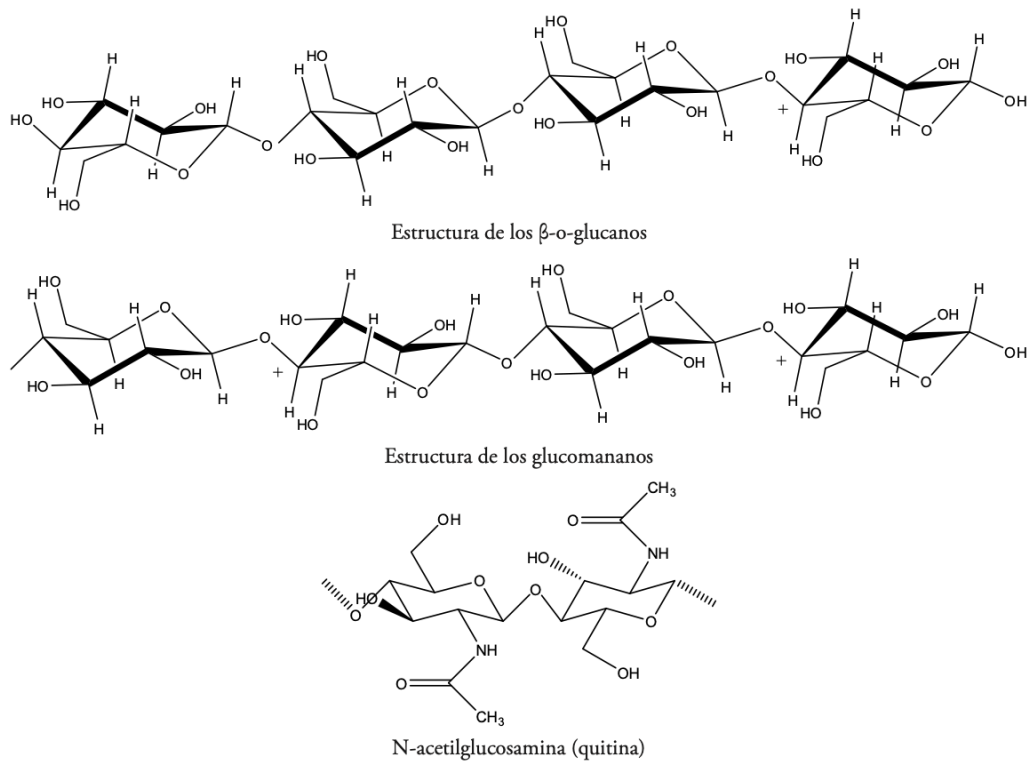


Figura 9. Ilustración de las estructuras químicas de los polisacáridos que componen las paredes celulares de las levaduras (Kogan y Kocher, 2007).

Las levaduras son organismos aerobios y aunque muchas especies son fermentadoras (suelen fermentar unos pocos glúcidos, principalmente hexosas y disacáridos), otras no lo son (Carrillo *et al.*, 2007).

Estos organismos son esenciales en la producción de algunos alimentos y bebidas, tales como pan, cerveza, vino y sidra. También pueden estar involucradas en la degradación de algunos alimentos, por procesos de fermentación o contaminación durante la postcosecha de la materia prima (Senses-Ergul, 2005).

3. JUSTIFICACIÓN

Debido a la gran capacidad que presentan los hongos pertenecientes al género *Fusarium* de contaminar diversos tipos de cultivos al mismo tiempo y la posibilidad de producir más de una micotoxina a la vez, es necesario desarrollar e implementar estrategias de bajo costo que nos permitan detoxificar granos y semillas que serán utilizados en la producción de alimentos, es por ello que en este trabajo se buscó implementar el uso de enzimas ya que éstas ofrecen una forma de desintoxicación específica, a menudo irreversible, eficiente y respetuosa con el medio ambiente, que no deja residuos tóxicos ni subproductos no deseados. Así mismo, se optó por emplear microorganismos con los mismos beneficios.

4. ANTECEDENTES

Se han realizado trabajos en los que se busca realizar una detoxificación mediante la utilización de métodos microbiológicos, de estos encontramos los realizados por:

Denli y Pérez en 2006 realizan una revisión de las recomendaciones propuestas por el Codex Comité on Food Additives and Contaminants (CCFAC) para la reducción de micotoxinas en los ingredientes destinados a la alimentación animal, donde la adopción general de estas medidas minimizaría el riesgo de contaminación a lo largo del proceso de producción y permitiría identificar los posibles lotes o productos contaminados. Sin embargo, mencionan métodos de tratamiento para evitar los efectos de las micotoxinas, los cuales incluyen la descontaminación biológica mediante la utilización de microorganismos como bacterias lácticas o levaduras, ya que poseen estructuras de pared con capacidad para adherir micotoxinas.

En 2010, Pozas y Abad propusieron una alternativa al uso de acillas como adsorbentes de micotoxinas, ya que éstas en ocasiones generan problemas en la digestión de los animales. El adsorbente utilizado fue el alginato de calcio, un biopolímero natural que no presenta ninguna problemática a los animales ni al ambiente. Determinaron que el alginato de calcio tiene una capacidad de adsorción determinada de 0.6 mg/g para ZEA, valor superior a la capacidad de adsorción determinada para montmorillonita, arcilla utilizada para la eliminación de micotoxinas. Para DON obtuvieron una capacidad de adsorción determinada de 0.843 mg/g, consiguiéndose un 94% de eliminación de la micotoxina. Respecto a Fumonisina se obtuvo un 98% de eliminación.

Armando y colaboradores en 2012, estudiaron cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, debido a su capacidad de unión con Aflatoxina B1, la capacidad de remoción de Ocratoxina A (OTA) y Zearalenona y estudiaron la relación entre el grosor de la pared celular y la capacidad de detoxificación de las cepas de levadura. Evaluaron un ensayo de interacción de micotoxinas a diferentes concentraciones y el efecto en condiciones gastrointestinales. Realizaron estudios estructurales de células de levadura con microscopía electrónica de transmisión, demostrando una correlación entre cantidad de pared celular (diámetro celular/grosor de la pared) y la capacidad de remoción de toxina. Una vez que las levaduras fueron sometidas a condiciones

gastrointestinales, se observó un aumento en la interacción levadura-toxina. Sin embargo, la adsorción física sería el principal mecanismo involucrado en la eliminación de OTA y ZEA.

En 2012 Valencia y colaboradores realizaron un estudio donde neutralizaron micotoxinas por sustancias adsorbentes utilizando extractos de paredes celulares de levaduras y derivados de bentonitas, permitiendo aumentar la selectividad en la retención de micotoxinas y evitando la captación de nutrientes esenciales. Respecto a los resultados obtenidos con los extractos de paredes celulares de levadura, mencionan que se deben al tamaño de las macromoléculas de β -glucanos en solución, que les permiten actuar como agentes secuestrantes.

Roig en 2013, realizó un estudio de descontaminación de micotoxinas emergentes (beauvericina (BEA), las eniatinas (ENs) y la fusaproliferina), mediante el procesado de alimentos donde encontró que todos los microorganismos estudiados presentaron actividad reductora de las ENs, si bien 8 de ellos con actividad superior al 90%. Los porcentajes de reducción oscilan entre 99 % por acción de *Streptococcus thermophilus* sobre ENA (eniatina A), y el 5 % por acción de *Bifidobacterium breve* sobre ENB (eniatina B) . En el caso de ENA (eniatina A1) y ENA1 (eniatina A1) *Streptococcus thermophilus* fue el microorganismo que produjo una mayor reducción. En el caso de ENB (eniatina B) y ENB1 (eniatina B1), *Saccharomyces cerevisiae* ISPA13756 fue el microorganismo más descontaminante.

Saavedra y colaboradores en 2014, evaluaron el efecto de un adsorbente comercial de micotoxinas (SM) con base en glucomananos sobre la producción de gas y degradación ruminal *in vitro*, incubaron harina de granos de maíz en licor ruminal con concentraciones de aflatoxina B1 (AFB1) de 4, 8 y 12 ppb, respectivamente, y proporciones de AFB1:SM de 1:75000 (SM-75), 1:150000 (SM-150) y 1:225000 (SM225). La información fue analizada utilizando un diseño completamente aleatorizado con arreglo factorial 3x4. La capacidad adsorbente se midió a las 3 hrs de incubación y fue del $86 \pm 3,34\%$, sin diferencias ($P > 0,05$) debida al nivel de AFB1 o a la relación AFB1:SM.

En 2018 Correa, desarrolló una mezcla microbiana para la inclusión como probiótico en la industria avícola, comprobando que *L. plantarum* tiene capacidad para la captura de Aflatoxina B1, la cual disminuye en relación con el aumento de la concentración de AFB1 en la solución.

5. HIPÓTESIS

- Si las moléculas de zearalenona y los tricotecenos presentan ésteres en su estructura, éstos pueden ser hidrolizados al incubarlos con esterasas y levaduras, degradando su estructura y reduciendo su toxicidad

6. OBJETIVOS

6.1 OBJETIVO GENERAL

- ∞ Determinar la capacidad de inactivación enzimática de esterasas y levaduras sobre Zearalenona y Tricotecenos *in vitro*.

6.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- ∞ Evaluar la actividad de esterasas puras (E.C. 3.1.1.1) sobre la inactivación de zearalenona y Toxina T-2.
- ∞ Evaluar la actividad enzimática de *Saccharomyces* sp. sobre la inactivación de zearalenona y Toxina T-2.
- ∞ Evaluar la actividad enzimática del extracto de levaduras sobre la inactivación de zearalenona y Toxina T-2.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 INACTIVACIÓN POR ESTERASAS

7.1.1 ZEARALENONA

En la figura 10 se muestra de manera esquemática que se llevó a cabo para este trabajo. Para el ensayo de modificación enzimática se preparó una mezcla con un volumen final de 1 mL, conteniendo: 5 mg de esterasa (95U) (Sigma-Aldrich, Alemania), estándar puro de ZEA a una concentración de 1 ppm (Trilogy Analytical Laboratory, Rusia) y buffer de fosfatos 150 mM a pH 7 y pH 8. La mezcla se incubó durante 60 min a 41°C con agitación orbital de 150 rpm; se realizaron 5 repeticiones por ensayo. Por cada ensayo se preparó un control de buffer, un control de buffer con esterasa y un control de buffer con ZEA

7.1.2 TOXINA T-2

Para el ensayo de modificación se preparó una mezcla con un volumen final de 1 mL, la cual contenía: 1.6 mg de esterasa (25U) (Sigma-Aldrich, Alemania), fracción purificada de toxina T-2, proporcionada por el Laboratorio de Biogeoquímica de la Unidad de Biotecnología y Prototipos de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, a tres concentraciones: 100 ppb, 300 ppb y 3000 ppb; y buffer de fosfatos 150 mM a pH 7 y pH 8. La mezcla se incubó durante 60 min a 41°C con agitación orbital de 150 rpm; se realizaron 5 repeticiones por ensayo. Por cada ensayo se preparó un control de buffer, un control de buffer con esterasa y un control de buffer con cada una de las concentraciones de T-2.

7.2 INACTIVACIÓN POR LEVADURAS

7.2.1 ZEARALENONA

Para el ensayo de degradación se preparó una mezcla con un volumen final de 1 mL, la cual contenía: 0.022g de levadura comercial marca Tradi-Pan, estándar puro de zearalenona a una concentración de 1 ppm (Trilogy Analytical Laboratory, Rusia) y buffer de fosfatos 150 mM a pH 7 y pH 8. La mezcla se incubó durante 60 min a 41°C con agitación orbital de 150 rpm. Posteriormente, la mezcla de adsorción se centrifugó en microfuga a 14,000 rpm durante 5 min, tomando toda la solución y dejando el sobrenadante en el tubo; se realizaron 5 repeticiones por ensayo. Por cada ensayo se preparó un control de buffer, un control de buffer con ZEA y

un control con levaduras previamente esterilizadas para determinar las concentraciones reales y las diferencias en estas.

7.2.2 TOXINA T-2

Para el ensayo de degradación se utilizó una mezcla con un volumen final de 1 mL, la cual contenía: 0.022g de levadura comercial marca Tradi-Pan, fracción purificada de toxina T-2 proporcionada por el Laboratorio de Biogeoquímica de la Unidad de Biotecnología y Prototipos de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, a tres concentraciones: 100 ppb, 300 ppb y 3000 ppb; y buffer de fosfatos 150 mM a pH 7 y pH 8. La mezcla se incubó durante 60 min a 41°C con agitación orbital de 150 rpm. Posteriormente, la mezcla de adsorción se centrifugó en microfuga a 14,000 rpm durante 5 min, tomando toda la solución y dejando el sobrenadante en el tubo; se realizaron 5 repeticiones por ensayo. Por cada ensayo se preparó un control de buffer, un control de buffer con cada una de las concentraciones de T-2, así como un control con levaduras previamente esterilizadas para determinar las concentraciones reales y las diferencias en estas.

7.3 INACTIVACIÓN POR EXTRACTO DE LEVADURAS

7.3.1 ZEARELENONA

Para el ensayo de degradación se preparó una mezcla con un volumen final de 1 mL, la cual contenía: 0.022g de extracto de levadura marca SIGMA, estándar puro de ZEA a una concentración de 1 ppm (Trilogy Analytical Laboratory, Rusia) y buffer de fosfatos 150 mM a pH 7 y pH 8. La mezcla se incubó durante 60 min a 41°C con agitación orbital de 150 rpm. Posteriormente, la mezcla de adsorción se centrifugó en microfuga a 14,000 rpm durante 5 min, tomando toda la solución y dejando el sobrenadante en el tubo; se realizarán 5 repeticiones por ensayo. Por cada ensayo se preparó un control de buffer, un control de buffer con extracto de levadura y un control de buffer con ZEA.

7.3.2 TOXINA T-2

Para el ensayo de degradación se preparó una mezcla con un volumen final de 1 mL, la cual contenía: 0.022g de extracto de levadura marca SIGMA, fracción purificada de toxina T-2 proporcionada por el Laboratorio de Biogeoquímica de la Unidad de Biotecnología y Prototipos de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala a tres concentraciones: 100 ppb, 300 ppb y 3000 ppb; y buffer de fosfatos 150 mM a pH 7 y pH 8. La mezcla se incubó durante 60 min

a 41 °C con agitación orbital de 150 rpm. Posteriormente, la mezcla de adsorción se centrifugó en microfuga a 14,000 rpm durante 5 min, tomando toda la solución y dejando el sobrenadante en el tubo; se realizarán 5 repeticiones por ensayo. Por cada ensayo se preparó un control de buffer, un control de buffer con extracto de levadura, un control de buffer con cada una de las concentraciones de T-2 para determinar las concentraciones reales y las diferencias en estas.

7.4 CUANTIFICACIÓN DE ZEA Y TRICOTECENOS RESIDUALES

7.4.1 HPLC-ESI-TOF-MS

El análisis se realizó en fase reversa en un HPLC-ESI-TOF-MS (High Pressure Liquid Chromatography-Electrospray-Time of Flight-Mass spectrometry), en modo iones positivos usando un sistema HPLC (que consiste en un desgasificador de vacío, automuestreador y bomba binaria) (Agilent 1260 Infinity, Agilent Technologies), equipado con una columna Kinetex 2.6U-C-18 100Q 2.1 X 150mm (Phenomenex, USA). La temperatura de la columna se mantuvo a 25 °C. La fase móvil consiste en Agua: Ácido fórmico al 0.1% (A) y Acetonitrilo: Ácido fórmico al 1% (B). El gradiente inicia con un 70% de A y 30% de B, posteriormente cambia al minuto 15 a 95% de B y se mantiene durante 10 min. La velocidad de flujo es de 0.200 mL /min. El tiempo de estabilización de la columna al finalizar el análisis es de 5 min. El volumen de inyección fue de 30 µL

El HPLC está acoplado a un TOF/MS (Agilent 66230B) con interfaz electrospray. La temperatura del gas a 350 °C, el flujo del gas 6 L/min y la presión del nebulizador 50 psig, el fragmentor 105 V, skimmer 60 V y OCT RF Vpp 750 V, voltaje del capilar 4000 V. El software empleado fue Mass Hunter Workstation LC/MS Data Acquisition for 6200 series versión B.05.01 Build 5.01.5125.3 y de análisis Qualitative Analysis versión B.06.01 Build 6.0.633.10 (2012, Agilent Technologies).

7.5 PROCESAMIENTO DE DATOS

Para los datos obtenidos en los ensayos realizados para Zearalenona se realizó una ANOVA (Análisis de varianza), para los resultados obtenidos de los ensayos de Toxina T-2 se realizó ANOVA por bloques (Zar 2010) y para saber si hay una correlación entre los tratamientos, el pH y la toxina (Zearalenona y Toxina t2) se realizó un PCA (Principal Components Analysis por sus siglas en ingles) utilizando el software Paleontological Statistic (PAST v. 3.25) (Hammer *et al.*, 2001).

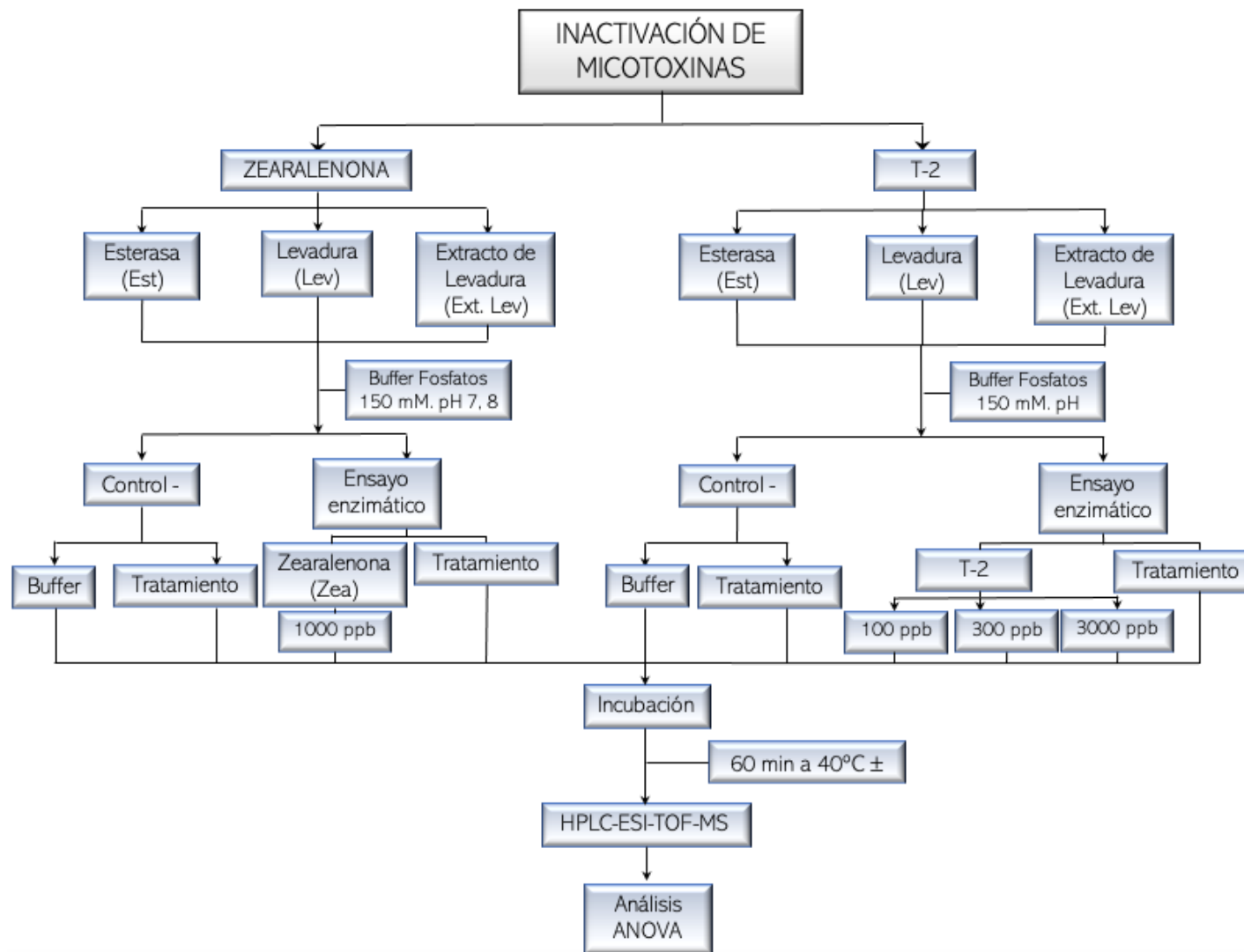


Figura 10. Diseño Experimental.

8. RESULTADOS

8.1 ZEARALENONA

Se determinó la presencia de ZEA de los tratamientos a partir de su ion molecular ($M^+ + 1$ uma) a su pH correspondiente, registrando 319.1587 m/z en pH 7 (Figura 11) y 319.1598 m/z en pH 8. (Figura 12). Se puede observar un ligero cambio en el ion molecular, dependiendo de las condiciones de pH empleadas.

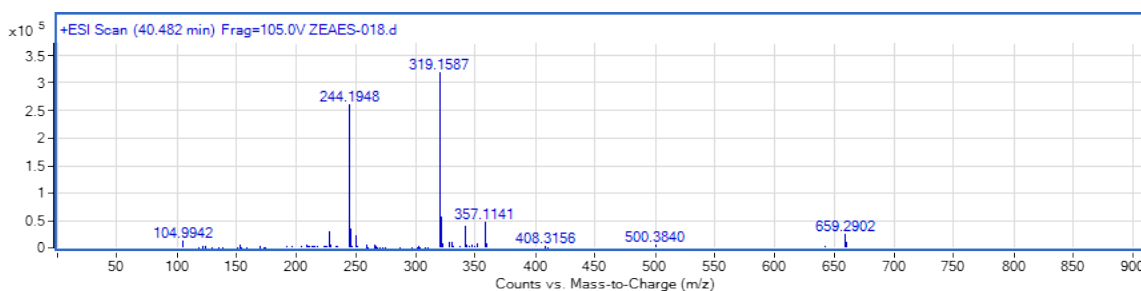


Figura 11. Ion molecular correspondiente a Zearalenona en pH 7 (319.1587 m/z)

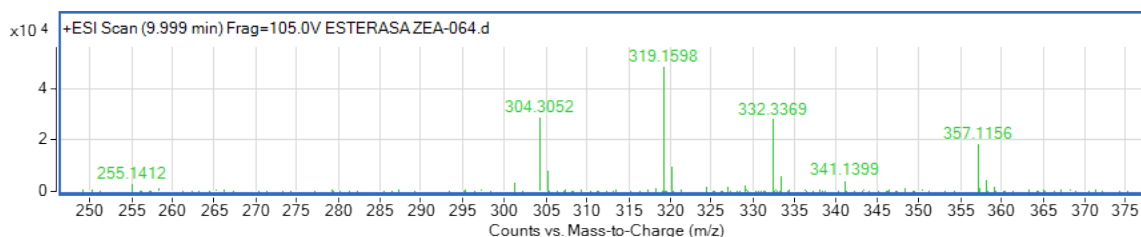


Figura 12. Ion molecular correspondiente a Zearalenona en pH 8 (319.1598 m/z)

En las Figuras 13 y 14 se muestran los cromatogramas de los ensayos realizados con ZEA en presencia de esterasa y levadura, respectivamente. Se puede observar que a pH 7, esterasa y levadura al entrar en contacto con ZEA, cambia el tiempo de retención en comparación con el STD. En el caso de esterasa, al interaccionar con ZEA se puede notar una mayor retención (1 min) con respecto al STD (Figura 13) y en el caso de levadura, aunque se identificó ZEA 0.5 min antes que el estándar, el área del STD se solapa con la de levadura (Figura 14).

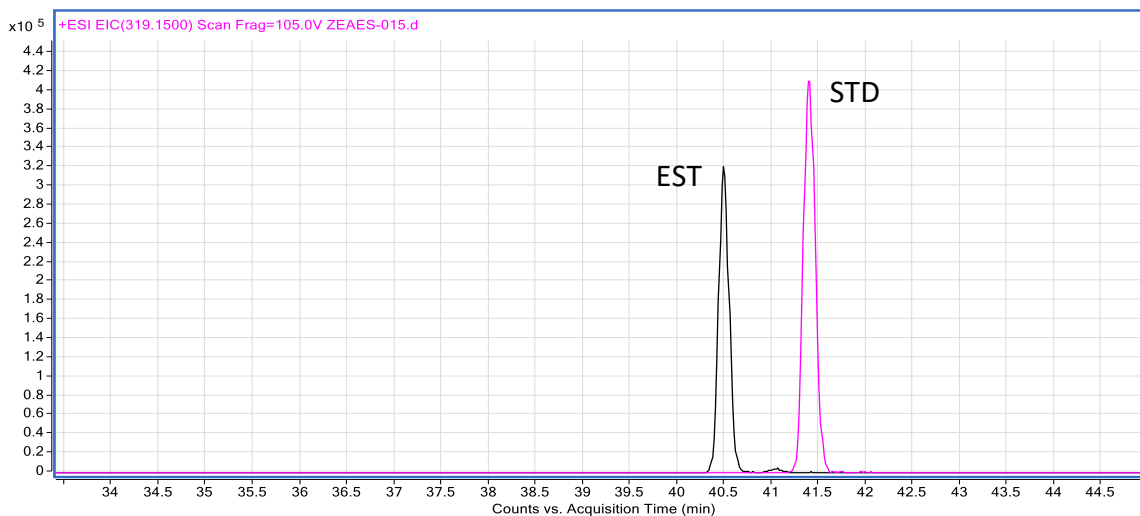


Figura 13. Cromatograma de degradación de Zearalenona [1ppm] (STD) con esterasa (EST) a pH 7.

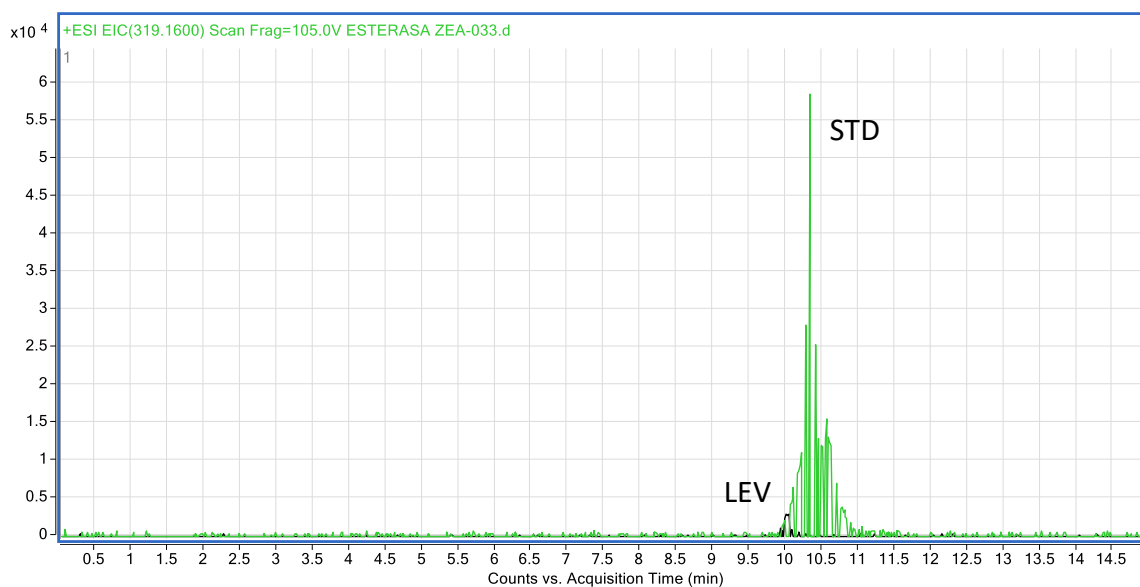


Figura 14. Cromatograma de degradación de Zearalenona [1ppm] (STD) con levadura (LEV) a pH 7.

Por otro lado, en las Figuras 15 y 16, se presentan los cromatogramas obtenidos de la interacción de ZEA con esterasa y levadura a pH 8, respectivamente. Los tiempos de retención en ambos cromatogramas muestran elevada similitud, con lo cual fue posible confirmar la identidad química de ZEA residual.

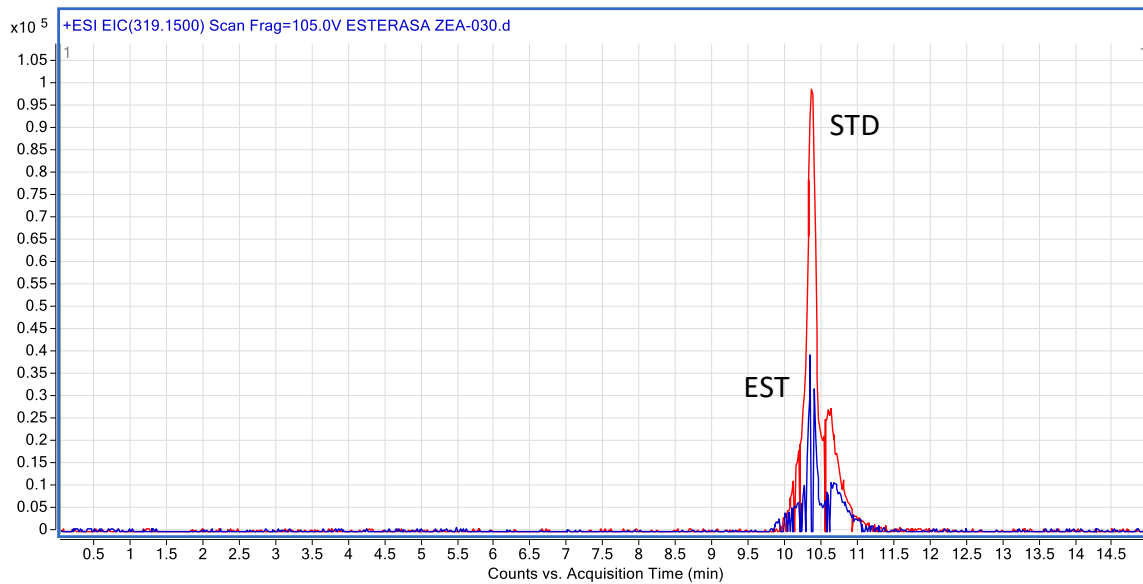


Figura 15. Cromatograma de degradación de Zearalenona [1ppm] (STD) con Esterasa (EST) a pH8.

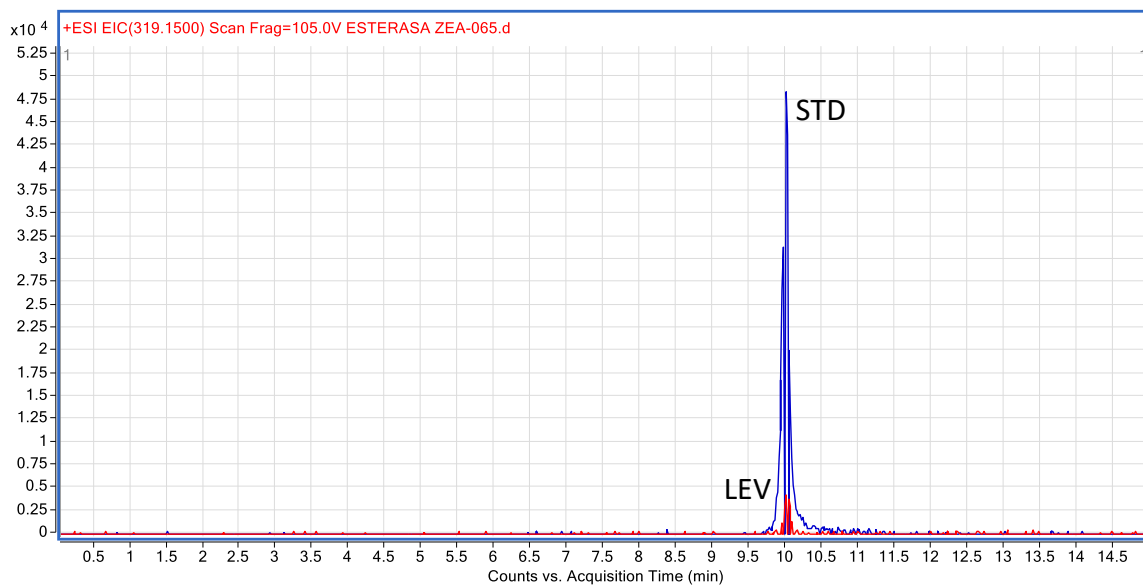


Figura 16. Cromatograma de degradación de Zearalenona [1ppm] (STD) con levadura (LEV) a pH 8.

Con base en las integraciones de los cromatogramas, fue posible llevar a cabo el análisis cuantitativo de ZEA residual y de esta forma determinar la degradación específica mediante los tratamientos y el porcentaje de reducción de la micotoxina.

De acuerdo con los ensayos realizados, la levadura biodegrada a ZEA en 2.7193 nMol/mg y 2.6957 nMol/mg para pH 7 y pH 8, respectivamente (Figura 17), lo que corresponde al 86.58% para pH 7 y 85.82% para pH 8 (Figura 18); mientras que esterasa degrada 1.9017 nMol/mg y 1.9060 nMol/mg para pH 7 y pH 8, respectivamente, (Figura 17), lo equivalente al 60.54% para pH 7 y 60.68% para pH 8 (Figura 18) de los 3.141 nM totales de toxina presente en cada uno de los ensayos. Por otro lado, el extracto de levadura degrada a ZEA con 2.4313 nMol/mg para pH 7 y 0.2462 nMol/mg para pH 8, lo que corresponde al 98.82% y 7.84% para pH 7 y pH 8, respectivamente. De acuerdo con el análisis estadístico, no se encontraron diferencias significativas entre los pH de los tratamientos de esterasa y levadura, sin embargo, si se encontraron diferencias entre los tratamientos a pH 8.

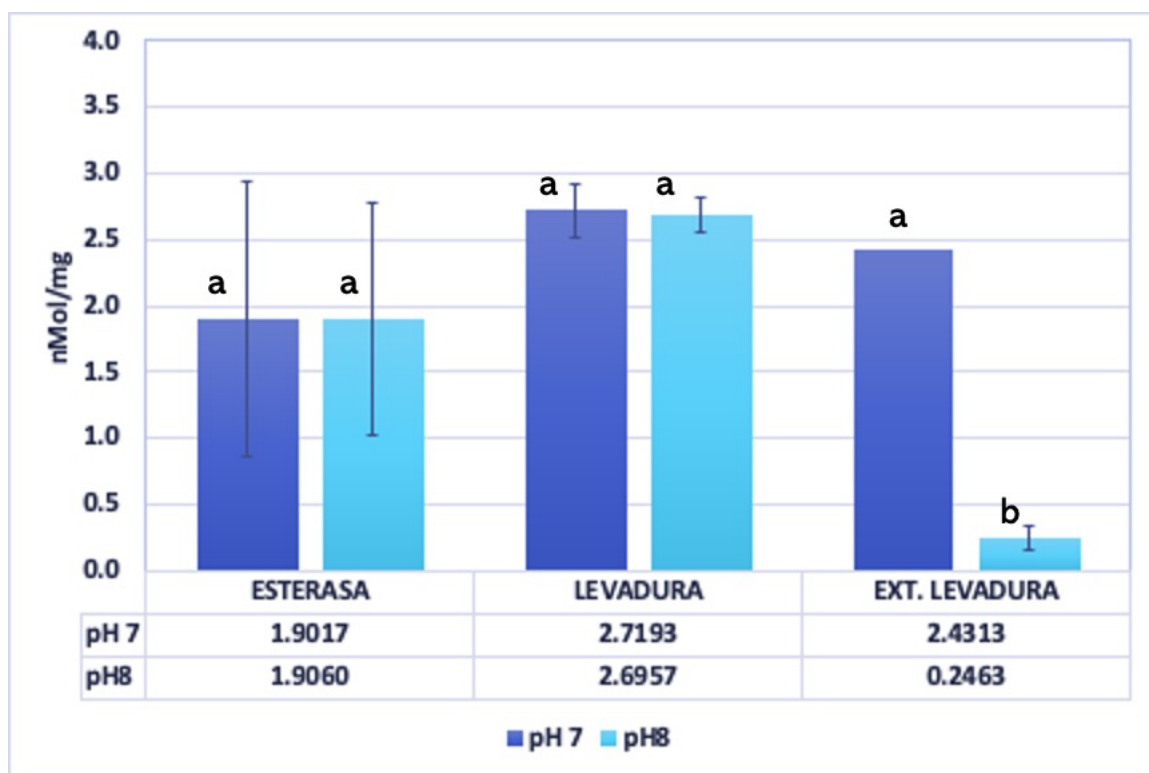


Figura 17. Nanomoles de degradación de Zearalenona por tratamiento a pH 7 y pH 8 a una concentración de 1ppm [3.141 nM] (pH 7: α 0.05 P=0.0538, pH 8; α 0.05 P<0.0001)

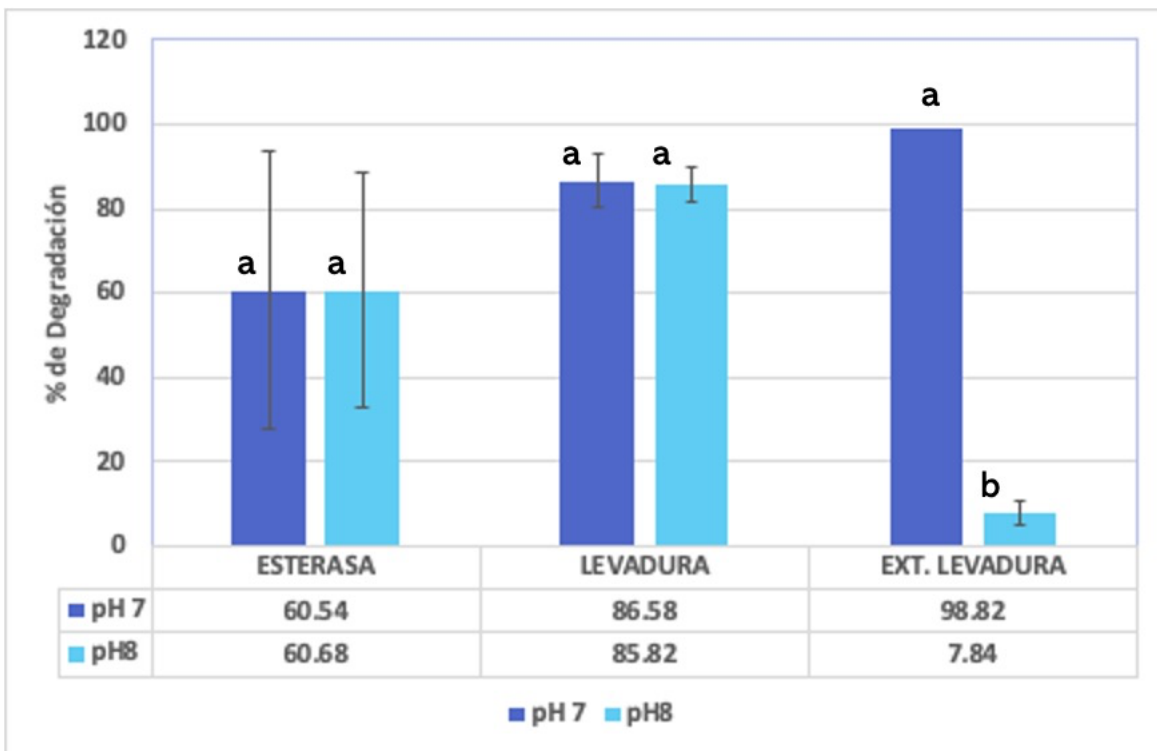


Figura 18. Porcentaje de degradación de Zearalenona por tratamiento a pH 7 y pH 8 a una concentración de 1ppm [3.141 nM] (pH 7: α 0.05 $P=0.0537$, pH 8: α 0.05 $P<0.0001$).

8.2 TOXINA T-2

Se confirmó la presencia de toxina T-2 en cada uno de los tratamientos a partir de su ion molecular. En la Figura 19 se presenta el patrón de fragmentación obtenido para el estándar de Toxina T2, obteniendo 484.2538 m/z, el cual corresponde a la derivatización con amonio NH_4^+ ($\text{M}^+ + 18$ uma).

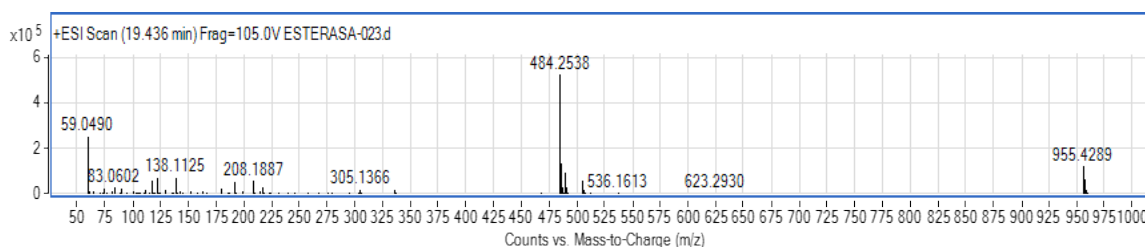


Figura 19. Ion molecular correspondiente a toxina T-2 (484.2538 m/z)

8.2.1 TOXINA T-2 PH7

En la Figura 20 se pueden observar los cromatogramas de las tres concentraciones del estándar de toxina T2 utilizados para la realización de los ensayos. La integración del área bajo la curva de esta serie de concentraciones mostró una elevada linealidad ($R=0.9999$) en el rango de trabajo de 100 a 3000 ppm usadas en el presente trabajo

En las Figuras 21 a la 23 se muestran cromatogramas representativos del análisis de interacción de los tratamientos con los estándares de 100, 300 y 3000 ppb de toxina T2, respectivamente. En todos los casos se observa una elevada coincidencia en los tiempos de retención de los picos cromatográficos. Adicionalmente, se debe mencionar que en todos los casos fue confirmado el ion molecular de 484.25 m/z, con lo cual, fue posible un análisis cualitativo y cuantitativo adecuado de toxina T2 residual.

Los cromatogramas indican la interacción de los tratamientos con la toxina T-2. Tanto en esterasa como en levadura se aprecia la disminución de la toxina T-2. En contraste, en el extracto de levadura, la concentración final en cada uno de los ensayos incrementa respecto al valor del estándar.

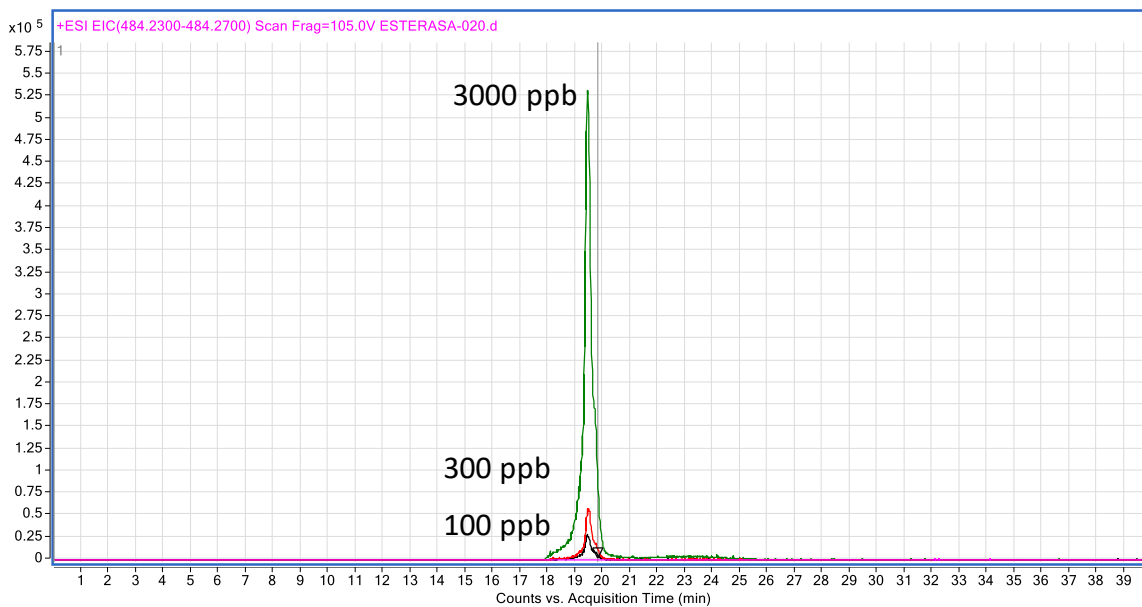


Figura 20. Cromatograma de estándares (STD) de Toxina T-2 a 100 ppb, 300 ppb, 3000 ppb a pH 7.

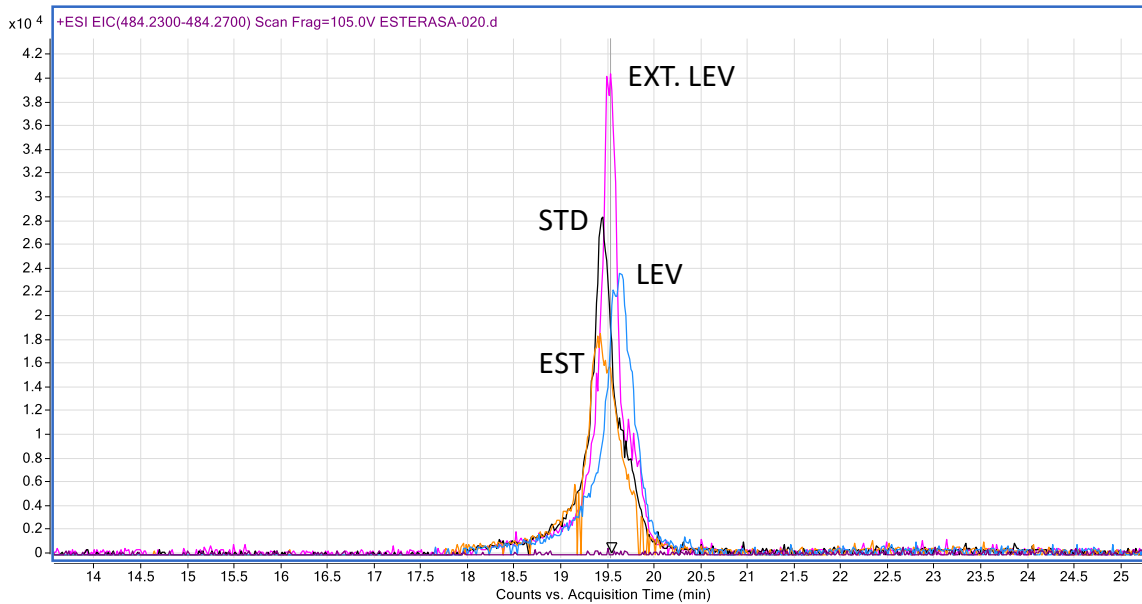


Figura 21. Cromatograma degradación de T-2 a 100 ppb con Esterasa (EST), Levadura (LEV), Extracto de Levadura (EXT. LEV) a pH 7.

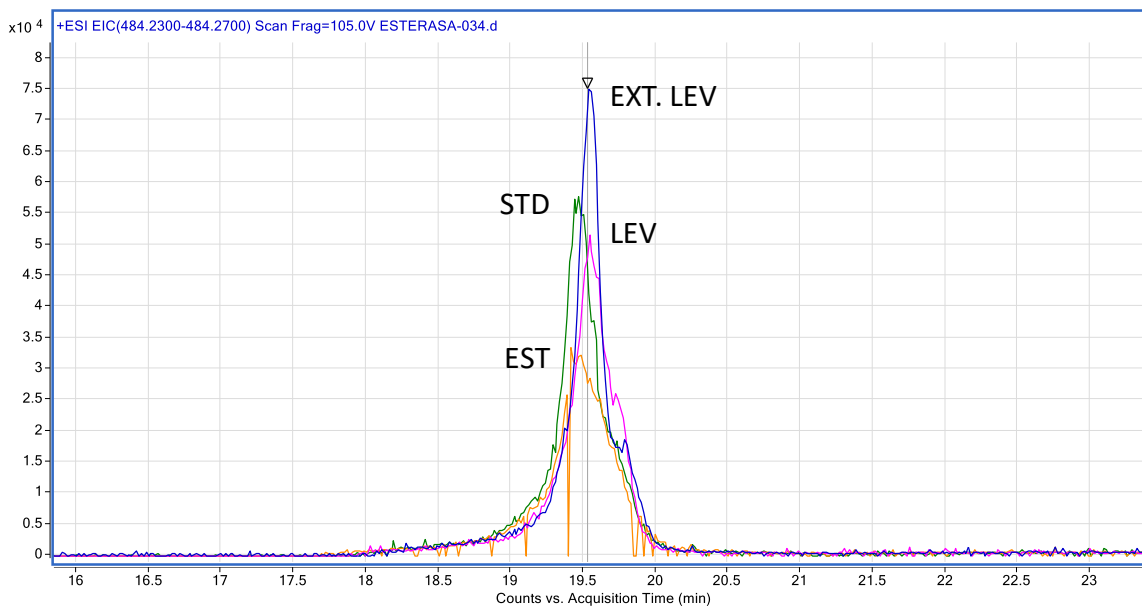


Figura 22. Cromatograma de degradación de Toxina T-2 a 300 ppb con Esterasa (EST), Levadura (LEV), Extracto de Levadura (EXT. LEV) a pH 7.

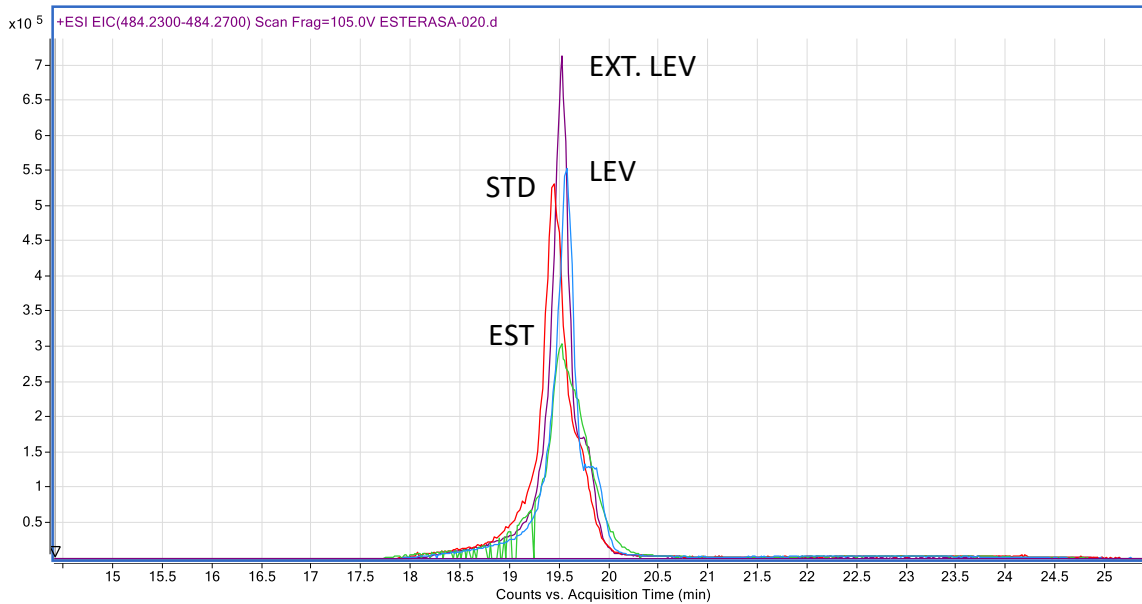


Figura 23. Cromatograma de degradación de T-2 a 3000 ppb con Esterasa (EST), Levadura (LEV), Extracto de Levadura (EXT. LEV) a pH 7.

De acuerdo con los ensayos realizados para determinar la eficiencia de los tres tratamientos (Esterasa, Levadura y Extracto de Levadura,) a las tres diferentes concentraciones de Toxina T2 (100 ppb, 300 ppb y 3000 ppb) a pH 7, se demostró que esterasa tiene un efecto superior sobre los otros tratamientos, mostrando una degradación específica mayor a una concentración de 3000 ppb, siendo esta de 1.1575 nMol/mg (Figura 24), lo que equivale a 17.99% (Figura 25), así mismo, en las otras dos concentraciones utilizadas también presentó un efecto superior, el cual fue de 0.0259 mMol/mg en 100 ppb y 0.1625 nMol/mg para 300 ppb (Figura 24), correspondientes al 12.1 y 25.26% (Figura 25). La levadura mostró una degradación mayor a una concentración de 3000 ppb, siendo del 10.66% (Fig. 25) correspondiente a 0.6860 nMol/mg (Figura 24), sin efecto importante en las concentraciones menores de toxina T2. Finalmente, el Extracto de Levadura registró un efecto negativo en la concentración de toxina T-2, incrementado hasta en un 15.51% la concentración final de la toxina para la concentración de 100 ppb (Figura 25), mientras que a mayor concentración disminuyó este incremento, siendo de 2.57% correspondiente a 0.1657 nMol/mg (Figura 24). El comportamiento observado en el tratamiento del extracto de levadura debe interpretarse como un incremento de la Toxina T2.

De acuerdo con el análisis estadístico no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos.

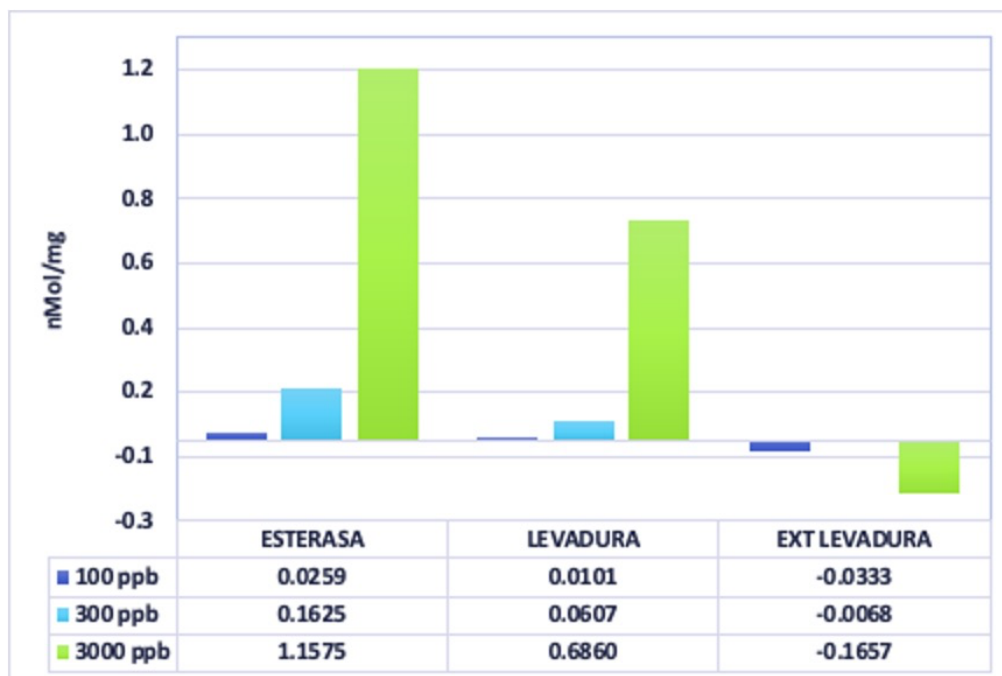


Figura 24. Nanomoles de degradación de Toxina T-2 por tratamiento a una concentración de 100 ppb [0.2134 nM], 300 ppb [0.64308 nM] y 3000 ppb [6.4308 nM] a pH 7 (α 0.05 P=0.02282 pH 7).

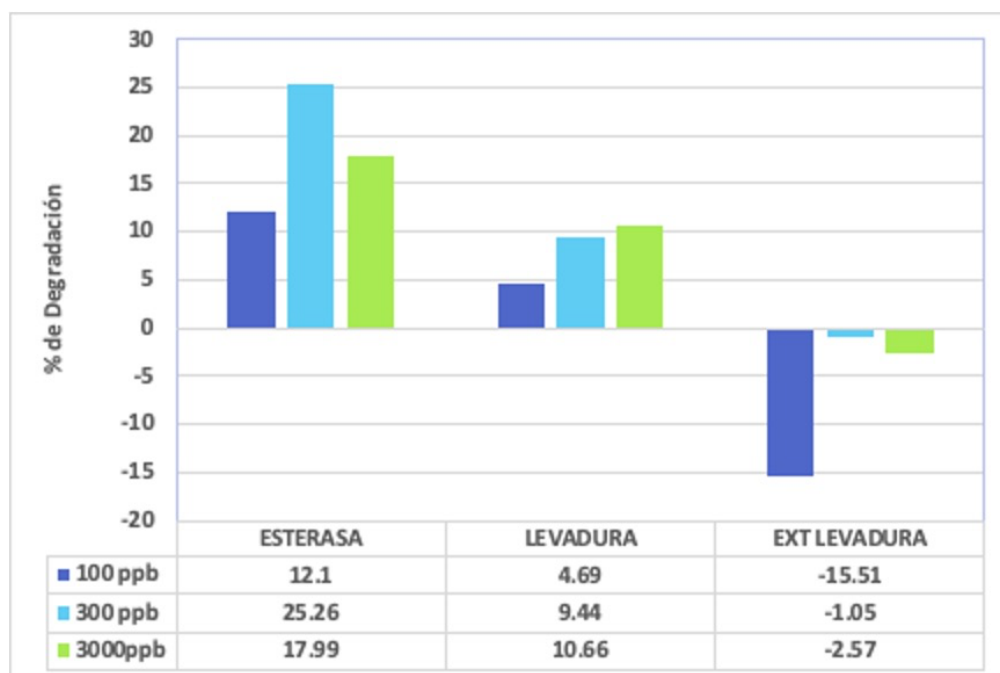


Figura 25. Porcentaje de degradación de Toxina T-2 por tratamiento a una concentración de 100 ppb [0.2134 nM], 300 ppb [0.64308 nM] y 3000 ppb [6.4308 nM] a pH 7 y (α 0.05 P=0.0324 pH 7).

8.2.2 TOXINA T-2 PH 8

De acuerdo con los ensayos realizados para determinar la eficiencia de los tres tratamientos (Esterasa, Levadura y Extracto de Levadura) a las tres diferentes concentraciones de toxina T2 (100 ppb, 300 ppb y 3000 ppb) a pH 8 sobre la degradación de ésta, se demostró que esterasa tiene un efecto superior sobre los otros tratamientos, mostrando una degradación mayor a una concentración de 300 ppb siendo esta de 1.6885 nMol/mg (Figura 26), lo que equivale al 26.26% (Figura 27), sin embargo en las otras dos concentraciones utilizadas también presento un efecto positivo, el cual fue del 0.1325 nMol/mg correspondiente a 61.84% y 0.5037 nMol/mg equivalente a 78.33%, para 100 ppb y 300 ppb, respectivamente. *Saccharomyces sp* mostró una degradación mayor a una concentración de 300 ppb, siendo su valor máximo en los ensayos del 72.01% (Figura 27) correspondiente a 0.4631 nMol/mg (Figura 26) y registró un efecto mínimo a concentraciones del 100 ppb. Finalmente, el extracto de levadura presentó un efecto negativo en la concentración de Toxina T-2, incrementado hasta un 23.85% la concentración final de la toxina para la concentración de 100 ppb (Figura 27), mientras que a 300 ppb de concentración disminuyó este incremento específico, siendo de 0.0511 nMol/mg (Figura 26), sin embargo, mostró un efecto positivo en la degradación de la toxina T-2 a una concentración de 300 ppb alcanzando 0.3766 nMol/mg equivalente al 58.56%. De acuerdo con el análisis estadístico se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos y las concentraciones de cada uno de ellos (α 0.05 $P < 0.0001$. pH 8).

8.2.3 ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES DE INTERACCIONES DE TOXINA T2 CON LOS TRATAMIENTOS

El análisis de PCA se puede explicar a partir del componente 1 (concentración) y el componente 2 (el pH). Podemos observar que los conglomerados se forman en función de la concentración y el pH que tenga la muestra. En el caso de los materiales a 3000 ppb no son dependientes del pH y a concentraciones bajas (100 y 300) se puede observar que el pH si tiene un efecto en la inactivación de la toxina T-2 con cada uno de los tratamientos (Figura 28)

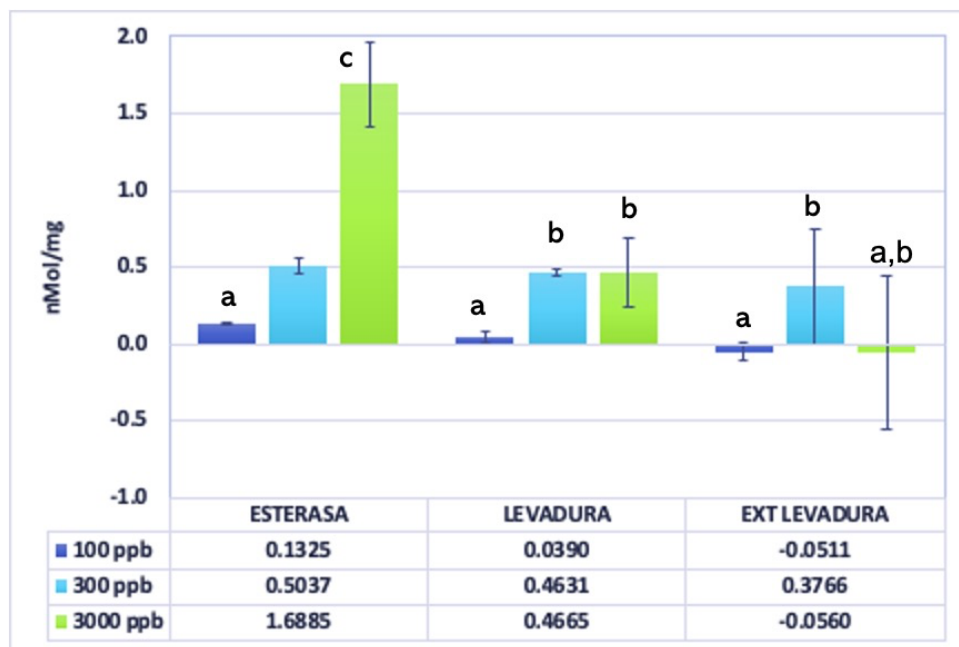


Figura 26. Nanomoles de degradación de Toxina T-2 por tratamiento a una concentración de 100ppb [0.2134 nM], 300ppb [0.64308 nM] y 3000 ppb [6.4308 nM] pH 8 (α 0.05 $P < 0.0001$, pH 8).

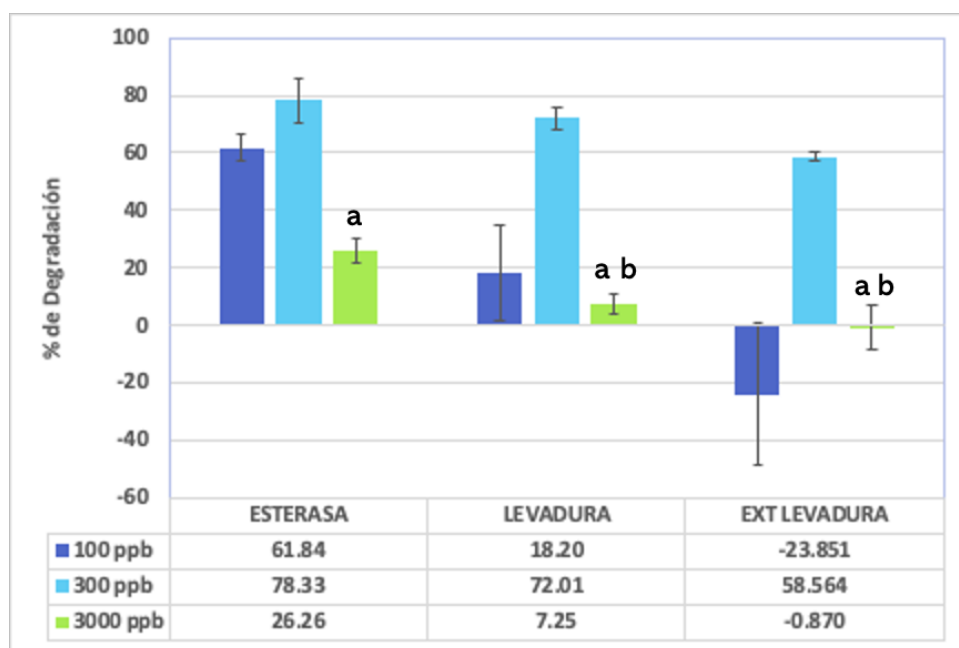


Figura 27. Porcentaje de degradación de Toxina T-2 por tratamiento a una concentración de 100ppb [0.2134 nM], 300ppb [0.64308 nM] y 3000 ppb [6.4308 nM] pH 8 (α 0.05 $P < 0.0001$, pH 8).

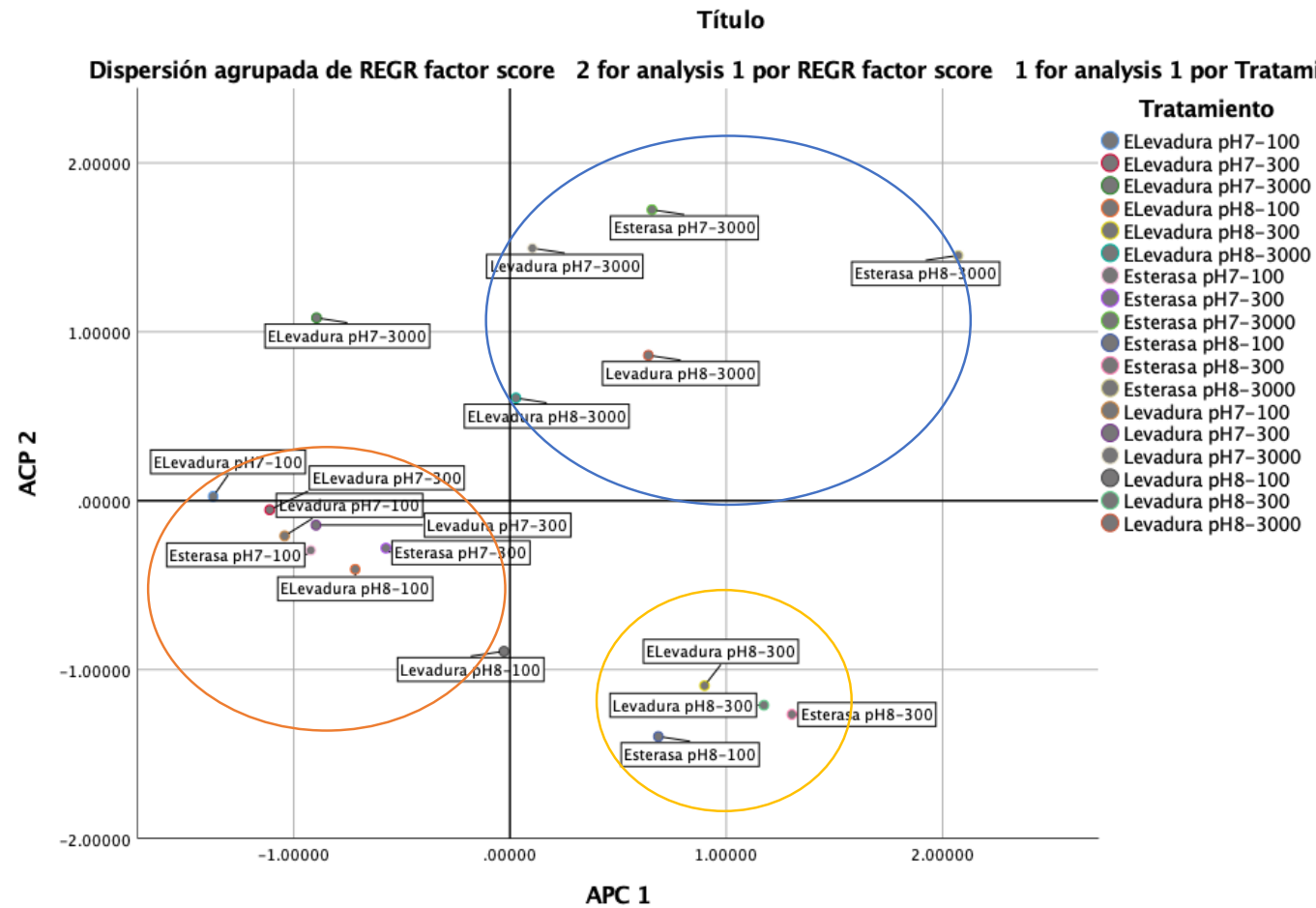


Figura 28. Análisis de Componentes Principales (PCA por sus siglas en inglés) de Toxina T-2.

8.3 TOXINA HT-2

Se determinó la presencia de toxina HT-2 en cada uno de los tratamientos a partir de su ion molecular 442.2349 m/z (Figura 29), el cual corresponde a la derivatización con ion amonio NH_4^+ ($\text{M}^+ + 18$ uma).

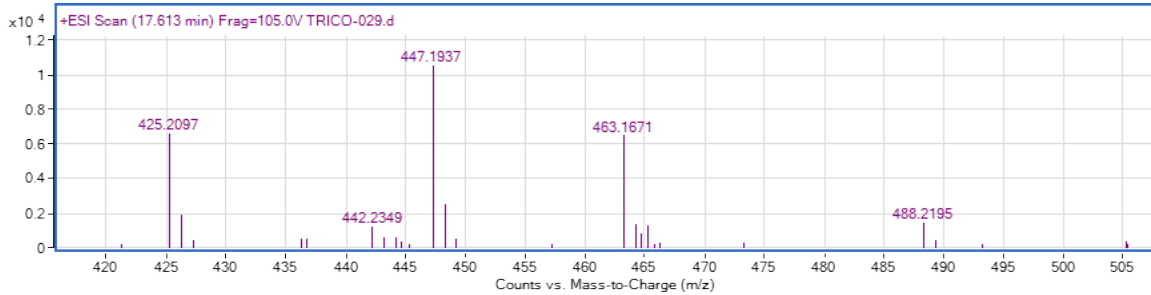


Figura 29. Ion molecular correspondiente a la Toxina HT-2 (442.2349 m/z) (c).

En el análisis de los cromatogramas de cada uno de los ensayos con esterasas, se observó un incremento de la toxina HT-2 con respecto a la concentración inicial (Figura 30).

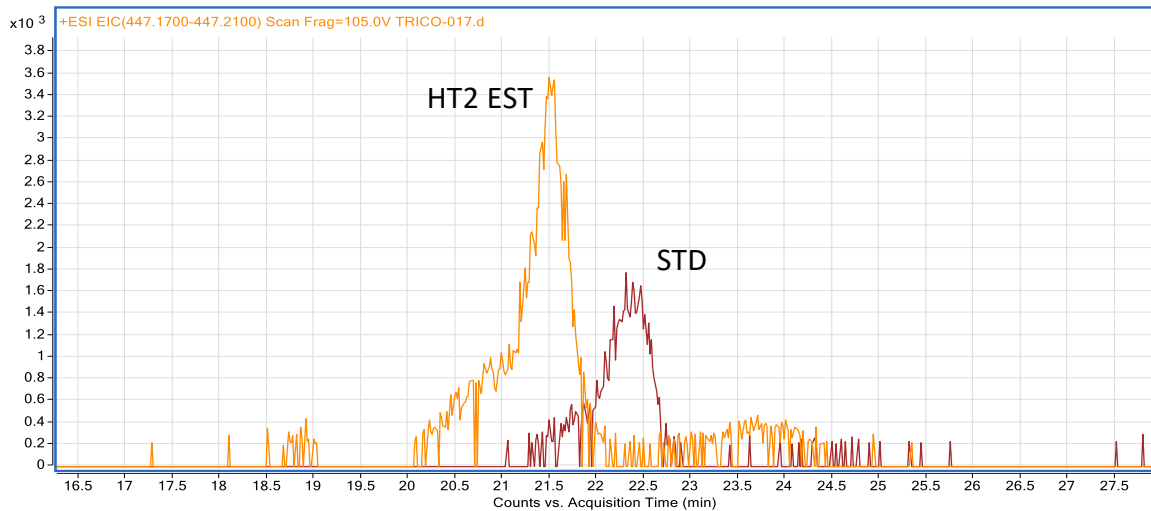


Figura 30. Cromatograma donde se muestra la concentración inicial de la toxina HT-2 y el incremento presentado por esterasas

En la Figura 31 podemos observar, que existe una relación inversa entre la disminución de la toxina T2 de 4.7423 nMol/mg y un aumento en HT-2 de 0.5073 nMol/mg, lo cual indica una biotransformación de la toxina T-2 en su metabolito HT-2.

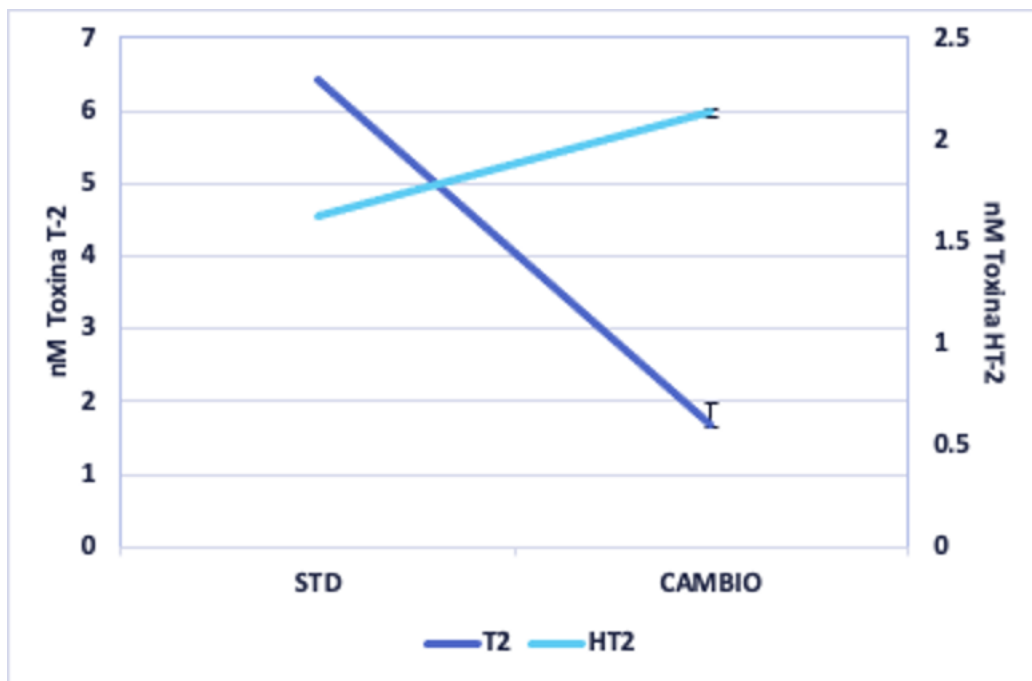


Figura 31. Nanomoles incrementados de Toxina HT-2 por esterasas a una concentración de 300ppb [0.64308 nM] pH 8 (α 0.05 P<0.0001. pH 8).

8.3.1 ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES DE INTERACCIONES DE TOXINA HT2 CON LOS TRATAMIENTOS

El análisis de PCA se puede explicar a partir del componente 1 (concentración) y el componente 2 (tratamiento). Podemos observar que los conglomerados se forman en función de la concentración y el tratamiento que tenga la muestra. En el caso de los materiales a 3000 ppb no son dependientes del tratamiento y a concentraciones bajas (100 y 300) se puede observar que la concentración si tiene un efecto en la inactivación de la toxina T-2 con cada uno de los tratamientos (Figura 32.)

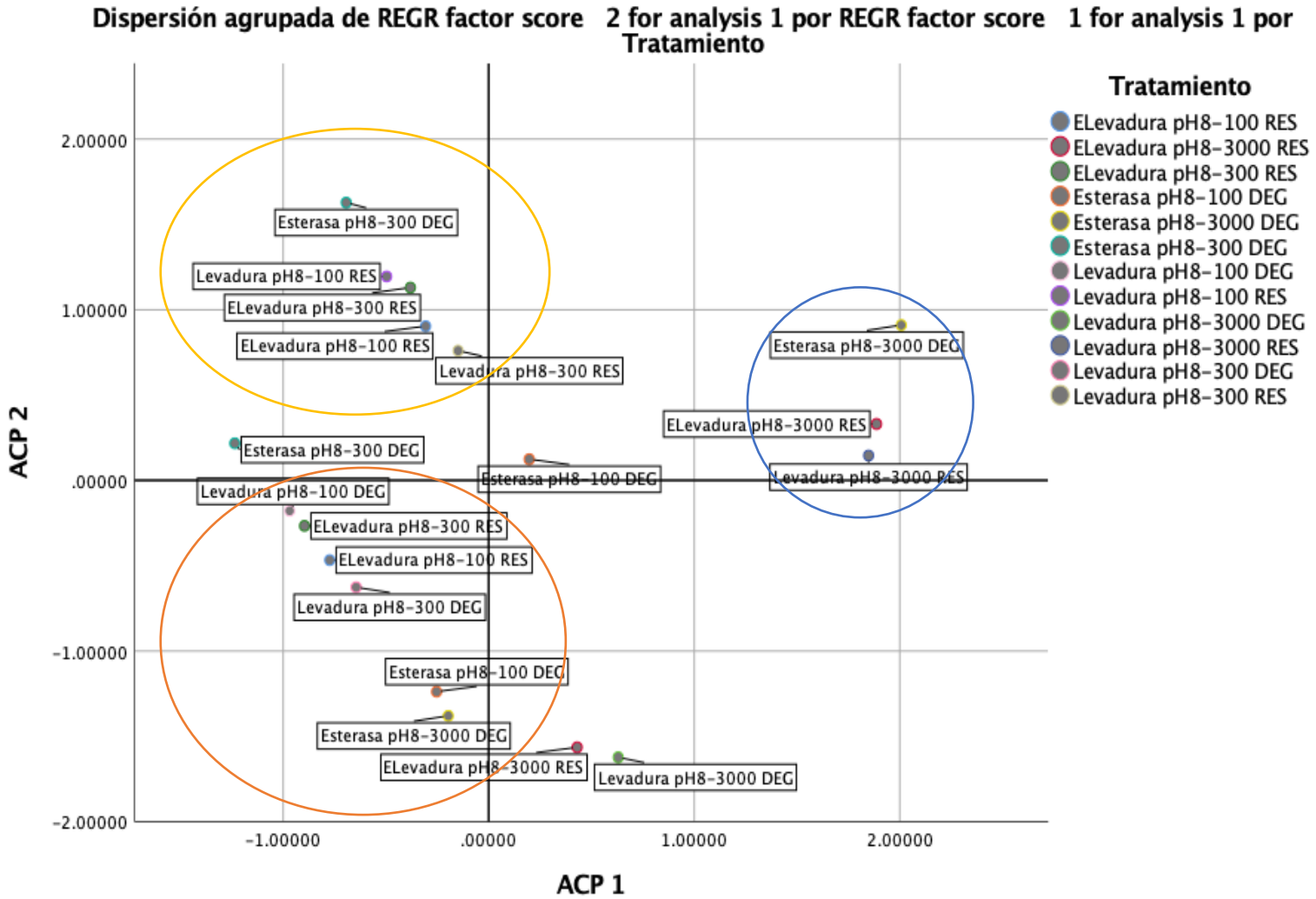


Figura 32. Análisis de Componentes Principales (PCA por sus siglas en inglés) de Toxina HT-2.

9. DISCUSIÓN

9.1 ZEARELENONA

Los tratamientos evaluados en el presente estudio indican una interacción de degradación de la zearalenona y constituyen una contribución a la caracterización de alternativas de manejo de granos y materias primas contaminadas con esta micotoxina.

La identificación química de ZEA fue establecida mediante su ion molecular derivatizado 319,1587 m/z ($(M^+ + 1)$ uma) y por el fragmento secundario 304.3052 m/z correspondiente a la fragmentación del metilo terciario presente en la cadena lactónica de la estructura de ZEA.

El desplazamiento que se observa en el tiempo de retención del estándar de ZEA entre pH 7 y pH 8 se puede asociar al equilibrio ácido básico que ocurre en la micotoxina. La ZEA es reconocida como un ácido débil por la presencia de fenoles ionizables en su estructura resorcinólica (Fang, et al, 2016). El pKa de 8.5, se aproxima al pH de 8 empleado y eso puede provocar el equilibrio ácido-básico, con lo cual, se amplía el pico cromatográfico por la diversidad de especies químicas presentes, así como su retención en la fase estacionaria de la columna del HPLC.

La biodegradación de zearalenona por esterasas puede ocurrir en el éster lactónico presente en su estructura, Wang *et al.*, 2017 evaluaron la degradación de zearalenona por *Bacillus pumilis* ES-21, determinando que el sitio de acción de las esterasas presentes en *B. pumilis* es el grupo éster presente en el anillo de lactona de zearalenona. Posteriormente describieron una posible vía de degradación, donde Zearalenona presenta una ruptura en el anillo de lactona, seguida de una descarboxilación, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en los ensayos realizados, ya que se muestra una degradación del 60% para ambos pH.

La biodegradación dada por *Saccharomyces sp.* se puede atribuir de igual manera a la actividad enzimática de esterasas presentes en el microorganismo. Sin embargo, el aumento con respecto a la esterasa puede deberse a otros factores como lo puede ser la biosorción de zearalenona, Zhang *et al.*, (2016) menciona que *Saccharomyces sp.* presenta una biodegradación gradual de zearalenona, produciendo la degradación total a las 48 horas, ya que al estar en contacto la zearalenona con la levadura incrementa la síntesis de una mayor

cantidad de enzimas, entre las cuales pueden estar presentes las esterasas. Por otro lado, la disminución en la concentración inicial de zearalenona también puede explicarse por la biosorción del compuesto por los β -D-glucanos presentes en las paredes de la levadura (Loi *et al.*, 2017).

Por otro lado, el incremento en la degradación de ZEA mediante levaduras respecto a la esterasa puede verse influido por las enzimas presentes en el microorganismo, así como sus componentes celulares, Loi (2017) menciona que una lactonohidrolasa (EC 3.1.1) de origen fúngico ha mostrado capacidad para degradar a ZEA. Dicha enzima fue purificada y su gen clonado y caracterizado en *E. coli* BL 21 y *S. cerevisiae* INVSc1, con ello se demostró que la proteína recombinante tiene un mayor efecto, ya que es capaz de degradar 2 μ g/mL de ZEA en ensayos *in vitro*. Yi et al., 2011 realizaron un estudio donde confirman lo anterior, demostrando que *B. licheniformis* CK1 es capaz de producir diferentes enzimas como xilanasas, caboximetilcelulasas y proteasas, las cuales tienen la capacidad de degradar a Zearalenona.

La adsorción por β -D-glucanos puede verse reflejada en los resultados obtenidos en el presente trabajo con el extracto de levadura, donde se pudo obtener una disminución de 98.83% de zearalenona. El extracto de levadura está conformado principalmente por paredes celulares que contiene los β -D-glucanos, Yiannikouris *et al.*, (2004) mencionan que la biosorción de zearalenona se da principalmente por los β -D-glucanos presentes en la pared celular. Se han realizado diversos estudios con la pared celular y los manano-oligosacáridos modificados de *S. cerevisiae* 1026, donde Devgowda *et al.*, 1996 demuestran una gran unión a zearalenona de aproximadamente el 80%, lo cual también concuerda con los resultados del presente trabajo. En este mismo sentido, se fortalece la hipótesis de biosorción por la diferencia significativa de disminución de zearalenona que se observa entre pH 7 y pH 8 con el tratamiento de extracto de levadura. Lo anterior, puede asociarse con la aproximación del pH 8 con el pKa1 8.54 de la zearalenona, en el cual, el fenol presente en el anillo de resorcinol presenta su primera ionización, produciendo un anión fenolato, el cual hace incompatible la adsorción en una superficie cargada de las paredes celulares del extracto de levadura. El efecto del pH observado en el presente trabajo concuerda con estudios previos de adsorción de zearalenona, en los cuales se reporta que, en condiciones de acidez se registran valores altos de capacidad de

adsorción y en valores neutrales o ligeramente alcalinos disminuye drásticamente esa capacidad (Wang, et al 2017, 2018; Sun, et al, 2018).

9.2 TOXINA T2

Los resultados obtenidos en la interacción de Toxina T2 con los tratamientos, muestran un efecto específico de bioinactivación, a través de la degradación de la toxina en sus grupos funcionales de ésteres laterales.

El análisis de Toxina T2 mediante espectrometría de masas es la elección adecuada debido a la baja polaridad de la toxina T2 y la elevada volatilidad que tiene el compuesto, por lo cual se han empleado métodos de ionización directa para el análisis, equivalentes al método empleado en este trabajo (Landa, 2003; 2012). Con base en la técnica espectrométrica empleada, la toxina fue identificada en forma inequívoca, a través del ion molecular en su forma derivatizada con amonio NH_4^+ 484.2538 m/z, ($\text{M}^+ + 18$ uma). La fragmentación característica del tricoteceno previamente fue descrita por Nielsen y Smedsgaard (2003), quienes mencionan el fragmento 305 m/z, el cual corresponde a la pérdida del éster isovalérico en posición 8 y el éster de acetato presente en la posición 4 del anillo tricoteceno. En los resultados obtenidos en el presente estudio se confirmó la presencia de los iones indicadores mencionados de la toxina T2.

Con relación a los cromatogramas obtenidos en los experimentos realizados para la inactivación de toxina T2, en contraste con la variabilidad observada para ZEA, se observa una elevada simetría de los picos y consistencia en los tiempos de retención del estándar y los residuales. La calidad cromatográfica observada se explica por la ausencia de grupos ionizables en la molécula, los cuales pueden producir una diversidad de especies químicas que amplían la base de los picos cromatográficos. Los parámetros de calidad cromatográfica, límite de detección, y linealidad del presente estudio concuerdan con los publicados por Tanaka, et al (2006), quienes reportan el desarrollo del método de análisis de tricotecenos empleado HPLC-TOF-MS, similar al empleado en este trabajo.

El tratamiento con esterasa fue el que registró los valores más elevados de degradación tanto en actividad específica como en porcentaje de degradación. Los resultados obtenidos en este trabajo se pueden comparar con antecedentes que reportan la ruta de degradación de Toxina

T2, la cual sufre una hidrólisis del acetilo presente en la posición 4 del anillo de tricotieno (Dohnal *et al.*, 2008). La misma reacción de deacetilación ha sido reconocida como parte del mecanismo toxicocinético de los tricotienos por carboxiesterasas (Johnsen *et al.*, 1988).

En adición a lo anterior, la suposición de interacción específica de la esterasa con la toxina T2, se complementa por el efecto concentración-dependiente observado en la actividad específica, así como el comportamiento de saturación esperado en el caso de una reacción catalizada por un enzima, el cual se observa en el porcentaje de degradación, presentando un máximo a 300 ppb y disminuye proporcionalmente a 3000 ppb en ambos pHs en este trabajo.

El pH óptimo registrado para la reacción de esterasa en este trabajo fue de 8, el cual es consistente con el reportado para la degradación de tricotienos como Deoxivalenol con esterazas de *Oryza sativa* (Wetterhorn, *et al.* 2016) y en cepas de *Fusarium sporotrichioides* y *Fusarium graminearum* (Garvey, *et al.*, 2008). Al parecer el pH ligeramente alcalino, favorece la completa desprotonación del grupo imidazolico de la histidina presente en el centro activo, lo cual, favorece la ionización de un cosustrato de Acetil-CoA, requerido para esta reacción como ha sido descrito por Lyagin y Efremenko, 2019.

El efecto de disminución de toxina T2 observado con el tratamiento de levadura también puede estar favorecido por la interacción de la toxina con los carbohidratos estructurales de la pared celular, la cual está constituida principalmente por fracciones de β -glucanos, glucomanos y mananoproteínas (Kogan y Kocher, 2007), éstos han demostrado tener un efecto eficiente en la adsorción específica de micotoxinas, especialmente de tricotienos, lo cual se reporta en mayor proporción a pH 8 (Avantaggiato *et al.*, 2004). Los resultados obtenidos en el presente trabajo son consistentes con los previamente citados y el efecto de mayor interacción a pH 8, en contraste con lo observado con zearalenona, puede ser explicado por la ausencia de grupos ionizables en la estructura de la toxina T2.

Con respecto al tratamiento de toxina T2 con extracto de levadura, se observan valores negativos, tanto en actividad específica como en porcentaje de degradación, especialmente en la concentración más baja empleada de 100 ppb. Dichos valores negativos deben ser interpretados como el aumento en la cantidad de toxina T2, lo cual se puede asociar con la presencia de una fracción de menor de conjugados de toxina T2 presentes en el extracto

empleado para el estudio. En este sentido, se ha documentado la acumulación de conjugados de tricoticenos con aminoácidos y carbohidratos (Berthiller *et al.*, 2013) y en el caso particular de toxina T2, se ha demostrado la formación y acumulación de glucósidos a partir de la cepa *Fusarium sporotrichioides* (Busman, et al, 2011), la cual, fue empleada en la producción de los tricoticenos de este trabajo. Tomando en cuenta lo anterior, el extracto de levadura presenta una variedad de enzimas carbohidrasas, las cuales pueden liberar la fracción de toxina T2 enmascarada por la conjugación y de esa manera producir los incrementos registrados.

En análisis de componentes principales de las interacciones de los tratamientos con toxina T2 indica que los factores que contribuyen en mayor proporción son: la concentración de la toxina y el pH del medio. En este sentido, se confirman los resultados discutidos previamente, en los cuales, el pH tiene un efecto importante en los óptimos de actividad de las reacciones catalizadas por la esterasa y el fenómeno de adsorción descrito, en el cual el comportamiento ácido-básico de la estructura de la pared celular de la levadura y la ionización de los glucomanos, genera una superficie de mayor interacción electrostática con la toxina. Adicionalmente, el componente de la concentración de toxina T2, se observa como un factor que consolida los conglomerados por el efecto dosis dependiente de la actividad y la saturación de la actividad enzimática.

9.3 TOXINA HT2

Los resultados obtenidos de toxina HT2 indican una relación significativa de biotransformación, la cual, confirma la ruta de degradación de la toxina T2 por la actividad enzimática.

La toxina HT2 fue identificada por la presencia de su ion molecular derivatizado por ion amonio ($M^{+}+18$ uma). La derivatización y el patrón de fragmentación obtenido concuerda con los reportes previos de análisis de la toxina (Nielsen y Smedsgaard 2003; Tanaka *et al.*, 2006), en el cual, se describen los fragmentos característicos observado en el presente trabajo.

La relación inversa observada entre la disminución de la concentración de toxina T2 y el aumento de toxina HT2 registrados en el presente trabajo, confirman la biotransformación enzimática que previamente ha sido descrita para los tricotecenos (Dohnal *et al.*, 2008; Johnsen *et al.*, 1988), en el cual, se produce una hidrólisis enzimática de éster acetilo presente en la

posición 4 de anillo tricotíceno, tal como fue confirmado por el ion molecular y el patrón de fragmentación de la toxina obtenidos en este estudio.

Por otro lado, el análisis de componentes principales, indica que los factores que determinan la formación de conglomerados son la concentración y el tipo de tratamiento. Lo cual concuerda con la suposición del mecanismo enzimático de la biotransformación, ya que ocurre principalmente a concentraciones bajas de la toxina, en las cuales suponemos la mayor afinidad por el sustrato y el factor del tratamiento determina, la prevalencia del efecto catalítico sobre la biosorción.

9.4 CONSIDERACIONES FINALES

Los resultados obtenidos en el presente trabajo indican eficiencia en la degradación y adsorción de la toxina T2 en los tratamientos evaluados y aportan evidencias el comportamiento de estas interacciones ante variables como el pH y la concentración de la toxina,

Es importante mencionar que las condiciones de acidez empleadas en este trabajo son compatibles con el pH del tracto gastrointestinal de especies monogástricas y permiten evaluar en forma adecuada la interacción de los tratamientos con la toxina (Lemke *et al.*, 2001), ya que condiciones de mayor acidez sobrestiman la disminución de la toxina, debido a los artefactos de adsorción inducidos por la ionización de las especies químicas y no contemplan el fenómeno de desorción al momento de la neutralización del pH. Tomando en cuenta lo anterior, los resultados obtenidos en este trabajo son una buena aproximación del comportamiento esperado de estos tratamientos en condiciones *in vivo*.

Por otro lado, las interacciones observadas en todos los tratamientos indican una fuerte correlación con la concentración de las micotoxinas empleadas, tanto en su efecto específico como en su disminución porcentual. En este sentido, se debe resaltar que las concentraciones empleadas en los diseños experimentales son compatibles con los rangos de ocurrencia natural de micotoxinas que se llegan a presentar en materias primas y alimentos balanceados de uso pecuario en México (Flores *et al.*, 2006; Flores *et al.*, 2011). Así mismo, están en concordancia con los niveles máximos permitidos en las regulaciones nacionales e internacionales para zearalenona y tricotícenos (Flores *et al.*, 2012).

En términos generales se puede mencionar que el tratamiento con mejor desempeño en la degradación de zearalenona y toxina T2, fue la esterasa, lo cual, indica una interacción eficiente y específica de la enzima, con los grupos funcionales de tipo éster presentes en las toxinas. No obstante lo anterior, los tratamientos con levadura y extracto de levadura muestran efectos importantes en la disminución de las toxinas, especialmente, cuando la concentración de la toxina T2 es más elevada. Lo anterior es de relevancia desde el punto de vista práctico y aplicado de los resultados de este trabajo, ya que, la relación costo beneficio obtenidos se mejora significativamente con la levadura y el extracto de levadura, debido a sus precios significativamente menores en comparación con la esterasa.

Adicionalmente, los resultados obtenidos sobre la biotransformación de toxina T2 en toxina HT2, indican la hidrólisis del éster presente en la posición 4 del anillo tricoticénico, lo cual, deja expuesto el epóxido de la toxina, para la reacción de agentes nucleófilos y así la producción de un metabolito inocuo. En este sentido, los resultados permiten la definición de nuevas estrategias de tratamientos eslabonados a través de reacciones consecutivas de degradación parcial e inactivación.

Finalmente, los resultados obtenidos en este trabajo, en su conjunto constituyen una contribución al conocimiento básico de las interacciones bioquímicas y fisicoquímicas de la zearalenona y la toxina T2 con los tratamientos y se plantean como alternativas prácticas y aplicadas para el manejo de granos y materias primas contaminadas con estas micotoxinas.

10. CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos de este trabajo, se pueden plantear las siguientes conclusiones:

- ◆ Se demostró que los tratamientos con Esterasa, Levadura y Extracto de Levadura tienen capacidad de degradación de Zearalenona y Toxina T2.
- ◆ Se determinó la mayor inactivación con el Extracto de Levadura para zearalenona y la Esterasa para Toxina T2.
- ◆ El estableció que el pH tiene un efecto significativo en la degradación de las micotoxinas evaluadas., siendo óptimo el pH7 para zearalenona y el pH 8 para Toxina T2.
- ◆ Se identificó a la toxina HT2 como metabolito de la degradación de Toxina T2
- ◆ Se reconoce el potencial de los tratamientos evaluados en este estudio, como alternativas para la inactivación de granos y materias primas contaminadas con zearalenona y Toxina T2

11. LITERATURA CITADA

- ◆ Abarca Ma. L., Bragulat Ma. R., Castellá G., Accensi F., Cabañes F. J. 2000. Hongos productores de micotoxinas emergentes. *Revista Iberoamericana Micol* 2000; 17:S63-S68
- ◆ Antonissen G., Martel A., Pasmans F., Ducatelle R., Verbrugghe E., Vandenbroucke V., Li S., Haesebrouck F., Van Immerseel F., Croubels S. 2014. The impact of *Fusarium* mycotoxins on human and animal host susceptibility to infectious diseases. *Toxins* 2014, 6, 430-452.
- ◆ Armando M. R., Pizzolitto R. P., Dogi C. A., Cristofolini A., Merkis C., Poloni V., Dalcero A. M. y Cavaglieri L.R. 2012. Adsorption of ochratoxin A and zearalenone by potential probiotic *Saccharomyces cerevisiae* strains and its relation with cell wall thickness. *Journal of Applied Microbiology*.
- ◆ Arroyo-Manzanares N., J.F. Huertas-Pérez, A.M. García-Campaña, L. Gámiz-García. 2014. Simple methodology for the determination of mycotoxins in pseudocereals, spelt and rice. *Food Control*. 36: 94-101.
- ◆ Avantaggiato, G., Havenaar, R., Visconti, A. 2004. Evaluation of the intestinal absorption of deoxynivalenol and nivalenol by an in vitro gastrointestinal model, and the binding efficacy of activated carbon and other adsorbent materials. *Food and Chemical Toxicology*. 42:817-824.
- ◆ Berthiller, F., Crews, C., Dall'Asta, C., Saeger, S. D., Haesaert, G., Karlovsky, P., Oswald, I. P., Seefelder, W., Speijers, G., & Stroka, J. 2013. Masked mycotoxins: a review. *Molecular nutrition and food research*, 57: 165–186.
- ◆ Bin-Umer, M. A., McLaughlin, J. E., Basu, D., McCormick, S., & Tumer, N. E. (2011). Trichothecene mycotoxins inhibit mitochondrial translation--implication for the mechanism of toxicity. *Toxins*, 3(12), 1484–1501.
- ◆ Bonifaz A. *Micología clínica básica*. 4 edición McGraw Hill. 2012
- ◆ Bornscheuer, U., O.W. Reif, R. Lausch, R. Freitag, T. Scheper, F.N. Kolisis, U. Menge. 1994. Lipase of *Pseudomonas cepacia* for biotechnological purposes: purification, crystallization and characterization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- General Subjects*. 1201: 55-60.
- ◆ Borrell J., Gimeno G. 2003. Micotoxinas en los alimentos: medidas de prevención y detoxificación. *Selecciones Avícolas*, 2003, 567-572.

- ◆ Busman, M., Poling, SM., Maragos, CM. 2011. Observation of T-2 Toxin and HT-2 Toxin glucosides from *Fusarium sporotrichioides* by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LCMSM). *Toxins*. 3:1554–1568.
- ◆ Cabañes, F.J.; M.L ABARRA; M. R. Bragulat y G. Castilla. 2007. Especies productoras de micotoxinas. En: *Micotoxinas en alimentos*. Soriano del Castillo, J. M. Diaz de Santos. España. 29-61.
- ◆ Carrillo L. y Audisio M. C. 2007. *Manual de microbiología de los alimentos*. Asociación cooperadora de la Facultad de Ciencias Agrarias, UNJU. Argentina. 1º Edición. Pp: 40- 46
- ◆ Correa F. M. 2018. Desarrollo de una mezcla microbiana para la inclusión como probiótico en la industria avícola. Estudio de su acción sobre hongos contaminantes y micotoxinas. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de la Plata.
- ◆ Cuevas M. J. A. 2016. Los hongos: héroes y villanos de la prosperidad humana. *Revista digital universitaria*. <http://www.revista.unam.mx/vol.17/num9/art69/art69.pdf>
- ◆ Denli M. y Pérez J. F. 2006. Contaminación por micotoxinas en los piensos: efectos, tratamientos y prevención. Departamento de Ciencia Animal y de los Alimentos. XXII Curso de especialización FEDNA. Barcelona.
- ◆ Dohnal, V., Jezkova, A., Jun, D., Kuca, K.. 2008. Metabolic pathways of T-2 toxin. *Curr Drug Metab*. 9:77-82.
- ◆ Eriksen, G. S. & Pettersson, H. 2004. Toxicological evaluation of trichothecenes in animal feed. *Animal Feed Science and Technology*, 114: 205-239.
- ◆ Fang, JS., Weng, H., Xiao, LI., Jin, P., Pan, W. 2016. Study on adsorption of zearalenone by hydroxy-Fe intercalated montmorillonite, *Funct. Mater*. 47:8143–8148.
- ◆ Flores C. M., M.J. Vázquez, M.D. Manzanares, A. Pineda. 2012. Muestreo de granos. Primera etapa para un correcto análisis de micotoxinas. *Los Avicultores y su Entorno*. Año 15, No. 87: 8-16.
- ◆ Flores, C.M., Quintanar, R.E., Manzanares, M.D., Pineda, A. 2012. Regulaciones sobre niveles de micotoxinas en alimentos para cerdos. *Los Porcicultores y su Entorno*. 90: 78-80.
- ◆ Flores Ortíz, C. M., Hernández, L. B., Vázquez, J. 2006. Contaminación con Micotoxinas en Alimentos y Granos de Uso Pecuario en México en el Año 2003. *Técnica Pecuaria en México*. 44: 247-256.

- ◆ Flores-Ortiz, C.M., Hernández-Portilla, L.B., Manzanares-Gómez, M.D. 2011. Ocurrencia natural de micotoxinas en granos y alimentos de uso pecuario en México en los años 2007-2009. *Los Porcicultores y su Entorno*. 83: 106-110.
- ◆ Garvey, G.S.; McCormick, S.P.; Rayment, I. 2008. Structural and functional characterization of the TRI101 trichothecene 3-O-acetyltransferase from *Fusarium sporotrichioides* and *Fusarium graminearum*: Kinetic insights to combating Fusarium head blight. *J. Biol. Chem.* 283: 1660–1669.
- ◆ Gimeno A, Martins ML. 2011. *Micotoxinas y micotoxicosis en animales y humanos*. 3 edición. 2011.
- ◆ González, M. C. y R. T. Hanlind. 2008. Distribution and occurrence of Ascomycetes in Mexico. *North America Fungi* 3(7): 139-145.
- ◆ Hammer, Harper DAT, Ryan PD. 2001. Past: Paleontological Statics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica*. :4(1):9pp. Version: 3.25.
- ◆ Johnsen, H., E. Odden, O. Lie, B. A. Johnsen y F. Fonnum. 1988. Metabolism of T-2 toxin by rat liver carboxylesterase. *Biochemical Pharmacology*. 9 (35): 1469-1473
- ◆ Kennedy, D.G., D.G. McEvoy, W. J. Blanchflower, S.A. Hewitt, W.J. McCaughey, C.T. Elliott. 1995. Possible naturally occurring zeranol in bovine bile in northern ireland. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*. 42: 1-10.
- ◆ Kirk, P. M., P. F. Cannon, D. W. Minter y J. A. Stalper. 2008. *Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi*. 10th ed. CAB International. Wallingford, USA. 784 pp.
- ◆ Kogan, G., Kocher, A. 2007. *Livestock Science*, 109, pp. 161-165.
- ◆ Lancova K., J. Hajslova, J. Poustka, A. Krplova, M. Zachariasova, P. Dostalek, L. Sachambula. 2008. Transfer of *Fusarium* mycotoxins and 'masked' deoxynivalenol (deoxynivalenol-3-glucoside) from field barley through malt to beer. *Journal of Food Additives and Contaminants*. 25: 732-744.
- ◆ Landa, P. 2003. Analisis de toxina t2 en cereales mediante insercion directa en espectrometria de masas. Tesis Licenciatura, QFB, UNAM.
- ◆ Landa-Nava, P., Hernández- Portilla, L.B., Flores-Ortiz, C.M., Manzanares-Gómez, M.D. 2012. Análisis de Toxina T2 en cereales mediante inserción directa en espectrometría de masas. *Los Avicultores y su Entorno*. 84: 128-134.

- ◆ Langseth W., A. Bernhoft, T. Rundberget, B. Kosiak, M. Gareis. 1988. Mycotoxin production and cytotoxicity of *Fusarium* strains isolated from Norwegian cereals. *Mycopathologia*. 144(2): 103-113.
- ◆ Lemke, SL., Ottinger, SE., Mayura, K., Ake, CL., Pimpukdee, K., Wang, N., Phillips, TD. 2001. Development of a multi-tiered approach to the in vitro prescreening of clay-based enterosorbents. *Animal Feed Science and Technology*. 93:17-29.
- ◆ Lyagin, I., Efremenko, E. 2019. Enzymes for Detoxification of Various Mycotoxins: Origins and Mechanisms of Catalytic Action. *Molecules*. 24 2362; doi:10.3390/molecules24132362
- ◆ Loi, M., F. Fanelli, V. Liuzzi, A.E. Logrieco, G. Mulé. 2017. Mycotoxin biotransformation by native and commercial enzymes: present and future perspectives. *Toxins*. 9: 1-31.
- ◆ Marín, P. 2010. *Análisis de factores ecofisiológicos que influyen en la expresión de genes relacionados con la biosíntesis de toxinas en especies de fusarium*. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de ciencias biológicas. 237
- ◆ Medel, R., G. Guzmán y S. Chacón. 1999. Especies de Macromicetos citadas de México IX. Ascomycetes, parte III: 1983-1996. *Acta Botánica mexicana* 46: 57-72.
- ◆ Nielsen, F., Smedsgaard, F. 2003. Fungal metabolite screening: database of 474 mycotoxins and fungal metabolites for dereplication by standardised liquid chromatography–UV–mass spectrometry methodology. *Journal of Chromatography A*. 1002:111–136.
- ◆ Osumi, M. 1998. The ultrastructure of yeast: cell wall structure and formation, *Micron*. 29, pp. 207-233.
- ◆ Perusia, O. R y A. R. Rodríguez. 2001. Micotoxicosis. *Rev Inv Vet Perú*. 12(2):87-116
- ◆ Petterson, H. 2010. Toxicity and risks with T-2 and HT-2 toxins in cereals. *Plant Breeding and Seed Science*. 1-13.
- ◆ Pozas S. R., Abad A. J. 2010. Adsorción de micotoxinas presentes en los alimentos mediante biopolímeros. Proyecto final de carrera de Ingeniería Técnica Industrial Especialidad Química. Universitat Politècnica de Catalunya.
- ◆ Quiroga, M.A. 2002. Efectos de la intoxicación aguda por micotoxina T2 en el ratón. Estudios histopatológicos, ultraestructurales, inmunohistoquímicos y lectinhistoquímicos. Tesis Doctor en Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata.

- ◆ Ramos, A. J., J. Fink-Gremmels, E. Hernandez. 1996. Prevention of toxic effects of mycotoxins by means of non-nutritive adsorbent compounds. *J. Food Prot.* 29: 631 - 641.
- ◆ Resnik, S. & A. Pacin. 2007. Toxinas T-2 y HT-2. En: Soriano del Castillo, J. M. (Ed.). *Micotoxinas en alimentos*. España. 293-312 p.
- ◆ Roig P. M. 2013. Descontaminación de micotoxinas emergentes mediante el procesado de alimentos. Tesis Doctoral. Universitat de València. Facultat de Farmàcia.
- ◆ Saavedra D., Ojeda A., Luzón O. y Mazzani C. 2014. Efecto de un secuestrante de micotoxinas sobre la producción de gas y degradación rumial *in vitro* de harina de maíz con aflatoxina B1. *Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias, UCV*. Venezuela.
- ◆ Santillán M. R., Rodríguez A. G., Fernández P. S. P., Vázquez M. G., Montero C. J. C. Benítez M. J. 2017. Micotoxinas: ¿Qué son y cómo afectan a la salud pública?. *Revista Digital Universitaria*. Vol.18, Num.6 http://www.revista.unam.mx/vol.18/num6/art46/PDF_art46.pdf
- ◆ Schmale D.G. III, G.P. Munkvold. 2019. Mycotoxins in crops: a threat to human and domestic animal health. *American Phytopathological Society*. Consultado 20/Nov/2019 en <https://www.apsnet.org/edcenter/disimpactmngmnt/topc/Mycotoxins/Pages/default.aspx>
- ◆ Senses-Ergul S., Ägoston R., Belák Ä., Deák T. 2005. Characterization of some yeast isolated from foods by traditional and molecular tests. *International Journal of Food Microbiology*.
- ◆ Serrano-Colli HA., Cardona-Castro N. Micotoxicosis y micotoxinas: generalidades y aspectos básicos. *Rev CES Med* 2015; 29(1):143-152.
- ◆ Smith, J. E. y M.O. Moss. 1985. *Mycotoxins: formation, analysis, and significance*. Wiley, Chichester; New York. 148 p.
- ◆ Soriano, J., Resnik, S. y Pacin, A. (2007). Toxinas T-2 y HT-2. En *Micotoxinas en alimentos*. pp 4. España: Ediciones Díaz de Santos.
- ◆ Suzuki Tadahiro y Iwahashi Yumiko. 2014. Phytotoxicity evaluation of type B trichothecenes using a *Chlamydomonas reinhardtii* model System. *Toxins*. 6, 453-463.
- ◆ Sun, Z., Song, A., Wang, B., Wang, G., Zheng, S. 2018. Adsorption behaviors of aflatoxin B1 and zearalenone by organo-rectorite modified with quaternary ammonium salts. *Journal of Molecular Liquids*. 264: 645-651.
- ◆ Sweeney MJ., A.D.W. Dobson. 1998. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. *International Journal of Food Microbiology*. 43: 141-158.

- ◆ Tanaka H, Takino M, Sugita-Konishi Y, Tanaka T. 2006. Development of a liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometric method for the simultaneous determination of trichothecenes, zearalenone and aflatoxins in foodstuffs. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 20:1422-8.
- ◆ Tran, S. T., T.K. Smith, G.N. Girgis. 2012. A survey of free and conjugated deoxynivalenol in the 2008 corn crop in Ontario, Canada. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* 92: 37 - 41.
- ◆ Yiannikouris, A., J. Francois, L. Poughon, C.G. Dussap, G. Bertin, G. Jeminet, J.P. Jouany. Adsorption of Zearalenone by beta-D-glucans in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Journal Food Protection.* 67: 1195-1200.
- ◆ Wang, G., Lian, C., Xi, Y., Sun, Z., Zheng, S. 2018. Evaluation of nonionic surfactant modified montmorillonite as mycotoxins adsorbent for aflatoxin B1 and zearalenone, *J. Colloid Interface Sci.* 518: 48–56.
- ◆ Wang, G., Miao, Y., Sun, Z., Zheng. S. 2017. Simultaneous adsorption of aflatoxin B1 and zearalenone by mono and di-alkyl cationic surfactants modified montmorillonites, *J. Colloid Interface Sci.* 511: 67–76.
- ◆ Wang, G., M. Yu, F. Dong, J. Shi, J. Xu. 2017. Esterase activity inspired selection and characterization of zearalenone degrading bacteria *Bacillus pumilus* ES-21. *Food Control.* 77: 57-64.
- ◆ Wetterhorn, K.M.; Newmister, S.A.; Caniza, R.K.; Busman, M.; McCormick, S.P.; Berthiller, F.; Adam, G.; Rayment, I. 2016. Crystal Structure of Os79 (Os04g0206600) from *Oryza sativa*: A UDP-glucosyltransferase Involved in the Detoxification of Deoxynivalenol. *Biochemistry.* 55:6175–6186.
- ◆ Zar, J. 2010. *Biostatistical Analysis*. 5ta edición. Pearson Education. New Jersey. United Estates. P.944
- ◆ Zhang, H., M. Dong, Q. Yang, A.M Tibiru, J. Li, X. Zhang. 2016. Biodegradation of zearalenone by *Saccharomyces cerevisiae*: Possible involvement of ZEN responsive proteins of the yeast. *Journal of Proteomics.* 143: 416-423.

- ◆ Zinedine, A., Soriano, J. M. y Molto, J. C. 2006. Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: An oestrogenic mycotoxin. Food and chemical Toxicology. Ppg. 1-18.
- ◆ Zuloaga, J. (2013). Toxinas T-2 y HT-2. 2015, de ELIKA Sitio web: www.elika.eus/es/