

17

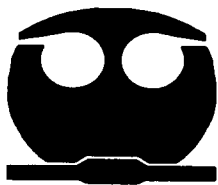


**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**ESTUDIOS DE DEGRADACIÓN
FOTOQUÍMICA DE FUMONISINAS B1 Y
B2 EN MAÍZ CONTAMINADO**

**T E S I S M A N C O M U N A D A
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO(A) DE ALIMENTOS
P R E S E N T A N
FLORES ARROYO OLGA GUADALUPE
JIMÉNEZ SURO ELOY BANACEK**



MÉXICO, D.F.



**EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

2002



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Paginación

Discontinua

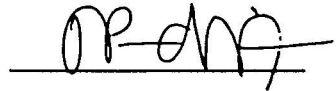
JURADO DESIGNADO

Presidente: Prof: Francisca Iturbe Chiñas
Vocal: Prof: Ma. Del Rocío Santillana Hinojosa
Secretario: Prof: Pandiyan Thangarasu
1 er Suplente: Prof: Berta Julieta Sandoval Guillén
2 do Suplente: Prof: Alfredo Salazar Zazueta

Sitio donde se desarrolló el tema:
Laboratorio 201, Departamento de Alimentos y Biotecnología
Facultad de Química, UNAM

ASESOR:

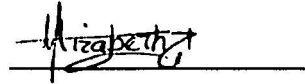
Pandiyan Thangarasu



Handwritten signature of Pandiyan Thangarasu on a horizontal line.

SUPERVISOR TÉCNICO:

Hilda Elizabeth Calderón Villagómez



Handwritten signature of Hilda Elizabeth Calderón Villagómez on a horizontal line.

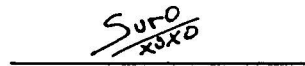
SUSTENTANTES:

Olga Guadalupe Flores Arroyo



Handwritten signature of Olga Guadalupe Flores Arroyo on a horizontal line.

Eloy Banacek Jiménez Suro



Handwritten signature of Eloy Banacek Jiménez Suro on a horizontal line, with the name 'Suro' and 'XXXD' written below it.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la **Universidad Nacional Autónoma de México** y a la **Facultad de Química** todas oportunidades y apoyo que nos han dado para nuestra formación profesional.

A nuestro asesor el **Dr. Pandiyan Thangarasu**, le agradecemos sus comentarios, enseñanzas, apoyo y amistad que nos brindó durante nuestra estancia en el laboratorio 201 "Tecnologías más limpias" de la Facultad de Química.

Especialmente queremos agradecer a nuestra asesora técnica, **M. en C. Hilda Elizabeth Calderón Villagómez** por el interés que puso en nosotros, su incondicional apoyo, sus observaciones, comentarios y el tiempo dedicado a este trabajo, pero sobre todo por brindarnos su amistad durante la realización de esta tesis en el laboratorio 201 de la Facultad de Química.

A la **Dra. Guillermina Burillo Amezcua** del Instituto de Ciencias Nucleares (ICN) de la UNAM, por todo el apoyo, orientación y tiempo brindado para el desarrollo de esta tesis.

Al **Físico Francisco García Flores** del Instituto de Ciencias Nucleares (ICN) de la UNAM departamento de química de radiaciones gamma, por su ayuda en la irradiación de las muestras.

A nuestros amigos **M. en C. María Elena Hernández Rojas** y **Miguel Magallanes Castillo** por todo el apoyo y ayuda que nos dieron en el manejo del equipo de cromatografía de líquidos.

A la **Q.F.B. Norma Trejo Medina** por su amistad y ayuda brindada en el laboratorio 201 "Tecnologías más limpias" de la Facultad de Química.

A la **M. en C. Imelda Velázquez Montes** por su valiosa ayuda en la obtención del material bibliográfico empleado en la realización de este trabajo.

AGRADECIMIENTOS

A la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI) de la Facultad de Química de la UNAM, especialmente a la **Química Georgina Duarte Liscl** por sus consejos y ayuda en la aplicación de la técnica de espectrometría de masas involucrada en este trabajo.

A los sinodales:

Profra: Francisca Iturbe Chiñas,
Profra: Ma. Del Rocío Santillana Hinojosa,
Prof: Pandiyan Thangarasu,

por el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo de tesis y por sus sugerencias que mejoraron substancialmente el contenido del mismo.

A todas las personas que incondicionalmente nos ayudaron durante la realización de nuestros estudios y en la elaboración de este trabajo.

Oly.

Ely.

DEDICATORIAS

*A mis padres **Olga Arroyo y Ezequiel Flores**
con todo mi amor y cariño, ya que gracias
a su apoyo, confianza, amor y dedicación
he logrado obtener una de las metas
más importantes de mi vida.*

*A mi hermano **Miguel A. Flores**
que siempre me ha apoyado
y al cual quiero y admiro mucho.*

*A **Eloy y su familia**, especialmente a sus papás por todas
sus amables atenciones que tuvieron conmigo durante
el tiempo que estuvimos escribiendo.*

*A todas las personas con las que compartí
grandes momentos durante el tiempo que
estudie en la Facultad de Química.*

Olga.

DEDICATORIAS

*A mis padres **Eloisa Suro** y **Roberto Jiménez**
por el apoyo y por la confianza que siempre tuvieron
en mi pero sobre todo por su amor y comprensión.*

*A mis hermanas **Diana** y **Karen**
Que han estado conmigo y
siempre me apoyaron.*

*A mi amiga **Olga Flores** que ha estado
conmigo en las buenas y en las malas,
ya que sin ella no hubiera sido posible
la culminación de esta tesis.*

*A la memoria de **Any Jiménez Suro**,
Quien a pesar de no estar a mi lado hoy,
Siempre ha estado y estará, en mi corazón.*

*A todas aquellas personas que
han colaborado de una u otra forma
para la culminación de este trabajo
y que no he nombrado.*

Eloy.

ÍNDICE

	Página
RESUMEN	II
ABREVIATURAS	III
1 INTRODUCCIÓN	1
1.1 Actividad Biológica de las fumonisinas	4
1.2 Métodos de Análisis	7
1.3 Técnicas para la reducción del contenido de fumonisinas en maíz y alimentos derivados.	9
1.4 Mecanismos de acción de las radiaciones.	16
2 OBJETIVOS	22
3 TRABAJO EXPERIMENTAL	23
4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
4.1 Comportamiento de estándares de fumonisinas B1 y B2 irradiados con luz ultravioleta	33
4.2 Efecto del TiO ₂ como formador de radicales en la degradación de fumonisinas B1 y B2 con radiación ultravioleta en harina de maíz y en harina de maíz suspendida en agua	34
4.3 Harina de maíz tratada con radiación ultravioleta a diferentes tiempos y temperaturas	37
4.4 Comportamiento de estándar de FB1 irradiado con gamma	42
4.5 Espectros de masas de estándares de fumonisina B1	43
4.6 Degradación de las fumonisinas B1 y B2 presentes en harina de maíz mediante radiación gamma en presencia y ausencia de dióxido de titanio	48
4.7 Comparación de los tratamientos realizados con radiación ultravioleta y gamma	56
5 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	55
BIBLIOGRAFÍA	57
ANEXO I	64
ANEXO II	77

RESUMEN

Las fumonisinas son un grupo de micotoxinas cuya incidencia en maíz y efectos tóxicos se han documentado durante los últimos diez años. *Fusarium moliniforme* y *Fusarium proliferatum* son dos de las más comunes especies del género de *Fusarium* que han sido aisladas de semillas de maíz, sorgo, arroz y otros cereales. Estos hongos producen ciertos metabolitos secundarios conocidos como fumonisinas. La presencia de altos niveles de fumonisinas provoca encefalomalacia en equinos cuando el alimento contiene más de 3 ppm de fumonisinas, edema pulmonar en cerdos alimentados con cereales con un contenido mayor a 10 ppm de fumonisinas, y en humanos se asocia con una alta incidencia de cáncer de esófago cuando se consumen alimentos contaminados con fumonisinas en concentraciones mayores a 4 ppm. Por el potencial tóxico que estos compuestos poseen se ha buscado una tecnología eficiente para eliminarlos. Las radiaciones electromagnéticas se usaron por ser métodos potencialmente poderosos, capaces de transformar éstas micotoxinas en sustancias menos tóxicas. Un proceso que ha presentado éxitos considerables, es la irradiación con luz ultravioleta $\lambda < 380$ nm o con radiación gamma. En la presente investigación se estudió la degradación de la fumonisina B1 y la fumonisina B2 con radiación gamma o ultravioleta en presencia y ausencia de dióxido de titanio, ya que éste es considerado un productor de radicales hidroxilo cuando interacciona con la luz ultravioleta y agua, los reactivos y productos generados fueron analizados por técnicas de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) y espectrometría de masas. Los resultados muestran que la concentración inicial de las fumonisinas decreció de forma similar en ambas fumonisinas. Los resultados de las técnicas de degradación indican que, si se usa radiación ultravioleta se tiene una mayor eficiencia en ausencia de óxido de titanio cuando la humedad del alimento es baja, mientras que cuando la humedad del alimento es alta el proceso es más eficiente en presencia de óxido de titanio, si se usa radiación gamma, la reducción en el contenido de fumonisinas es la misma si se irradia con o sin óxido de titanio una muestra de harina de maíz con baja humedad. Empleamos radiación gamma y ultravioleta con la finalidad de determinar cual lograba el mayor efecto de disminución en el contenido de las fumonisinas, obteniéndose reducciones muy parecidas con ambas radiaciones.

ABREVIATURAS

AOAC	Association of Analytical Communities.
BS	Base seca
CLAR	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
e ⁻	Electrón
E	Energía
e ⁻ _{BC}	Electrón de la banda de conducción (fotogenerados)
erg	Ergio
eV	Electrón-volts.
FAB	Fast Atomic Bombardment (Bombardeo Atómico Rápido)
FB1	Fumonisina B1
FB2	Fumonisina B2
FB3	Fumonisina B3
Gy	Gray
h	Constante de Planck (6.63 X 10 ⁻³⁴ J s)
H•	Radicales hidrógeno
h ⁺	Hueco
H ⁺	Iones hidrógeno
h ⁺ _{BV}	Huecos de la banda de valencia (fotogenerados)
HFB1	Hidrolizado de la FB1
HFB2	Hidrolizado de la FB2
HO ⁻	Iones hidroxilo
HO•	Radicales hidroxilo
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución)
3HP	3-hidroxipiridina
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
KGy	Kilo gray
M	Molar
m/z	Relación masa/carga
Mev	Mega electrón-volt

min	Minutos
MLG	Modelo lineal general
OPA	O-Ftadialdehido
Ox	Oxidante
PHFB1	Hidrolizado parcial de la fumonisina B1
PHFB2	Hidrolizado parcial de la fumonisina B2
ppm	Partes por millón
Red	Reductor
TCA	Acido tricarbálico
UV	Ultravioleta
λ	Longitud de onda
ν	Frecuencia

**CAPÍTULO 1
INTRODUCCIÓN**

El maíz es el principal alimento para millones de personas alrededor del mundo, en México, América Central y ciertas partes de África y China, el maíz es la mayor fuente de energía para una gran parte de la población en general. Se ha estimado que en México el consumo anual de maíz es de 186 Kg por persona (Dombrink-Kurtzman *et al.*, 2000). En México y América Central la principal forma de consumo de maíz es la tortilla y la masa elaborados con maíz nixtamalizado; la nixtamalización es un proceso tradicional de cocción alcalina, usando cal como componente alcalino en el proceso. El mayor beneficio de la nixtamalización es elevar la calidad nutricional del maíz al liberar la niacina (Rooney & Suhendro, 1999), incrementar el contenido del ion calcio en el maíz procesado (Bressani *et al.*, 1958) e incrementar la disponibilidad de lisina (Trejo *et al.*, 1982).

Las fumonisinas son un grupo de toxinas producidas por, *Fusarium moliniforme* y *Fusarium proliferatum*, dos de los más frecuentes hongos asociados con maíz y otros granos (Bullerman & Draughan, 1994), la extensa contaminación del maíz con fumonisinas varía con la localización geográfica, las prácticas agronómicas y de almacenamiento, así como la vulnerabilidad de las plantas a la invasión por hongos durante todas las fases de crecimiento, almacenamiento y procesamiento. Los niveles de fumonisinas en el maíz también se ven influenciados por factores ambientales como son: temperatura, humedad y lluvia durante los periodos de pre cosecha y cosecha (Shelby *et al.*, 1994). Los altos niveles de fumonisinas están asociados con periodos de calor y sequía seguidos de alta humedad. Los altos niveles de fumonisinas también se presentan en el maíz cuando este ha sido dañado por insectos (Miller, 1999; Bacon & Nelson, 1994), además, los niveles de fumonisinas en el maíz pueden incrementarse bajo condiciones inapropiadas de almacenamiento. Una de las formas de evitar la presencia de micotoxinas en los granos es mediante la prevención del crecimiento de mohos. Cuando la contaminación no puede ser prevenida, se necesita la descontaminación del grano para que se pueda usar como alimento destinado para consumo humano o de ganado.

Su presencia como contaminantes de maíz ha sido confirmada por varios autores (Abbas *et al.*, 1988; Logrieco *et al.*, 1995; Desjardins *et al.*, 2000; Yamashita *et al.*, 1995; Saubois *et al.*, 1992; Ritieni *et al.*, 1997, Tseng & Liu, 1999). Estos compuestos han sido implicados como los agentes causantes en una variedad de enfermedades en animales incluyendo leucoencefalomalacia equina (Marasas *et al.*, 1988), edema pulmonar en cerdos (Norred & Voss, 1994) y también experimentalmente induce, nefrotoxicidad y cáncer hepático en ratas (Background U. S. Food and Drug Administration, 2001 b) y arteriosclerosis en primates no humanos (Jackson *et al.*, 1996 a). Estudios epidemiológicos han sugerido que la fumonisina puede ser parcialmente responsable de la alta incidencia de cáncer de esófago en Transkei, región de Sudáfrica (Sydenham *et al.*, 1990), y la provincia de Shandong en China (Groves *et al.*, 1999), recientemente se asoció a las fumonisinas con una alta incidencia de cáncer hepático en Guangxi, China (Li *et al.*, 2001).

Estructura de las Fumonisinas. La estructura básica de las fumonisinas consiste en una alquilamina de 20 carbonos con uno o dos grupos hidroxilo y uno o más grupos metilo y ácido tricarbálico esterificado. En las fumonisinas de la serie A el grupo amino se encuentra esterificado. Las fumonisinas de la serie B fueron las primeras en descubrirse. La fumonisina C1 se ha encontrado en muestras de maíz, pero constituyendo únicamente el 1 % de la cantidad de fumonisinas. Así mismo las fumonisinas A1 y A2 se encuentran también en bajas concentraciones en relación a las fumonisinas de la serie B (Yescas, 2001).

Las fumonisinas descritas hasta la fecha aisladas de cultivos de *Fusarium sp.* se muestran en la Figura 1 (Yescas, 2001; Sydenham *et al.*, 1996 b; Poling & Plattner, 1999). La mayoría de las fumonisinas que se han identificado *in Vitro* no se producen de manera natural (Yescas, 2001). Las fumonisinas B1, B2 y B3 son los principales compuestos que están presentes en los cultivos fúngicos de maíz, habiéndose demostrado que en varios países del mundo se presentan en forma natural en niveles biológicamente importantes en el maíz así como en piensos y en alimentos a base de maíz para humanos. Las concentraciones de fumonisina B1 suelen superar las de fumonisinas B2 y B3 en unas tres veces o más, aunque pueden observarse también, concentraciones superiores de FB2 y FB3 (Visconti *et al.*, 1999).

Debido al parecido estructural de la FB1 con la esfinganina su actividad biológica radica en que la FB1 impide la formación de esfingosina, inhibiendo a la ceramida sintasa (N-esfinganina-aciltransferasa) (Merrill *et al.*, 1986), la cual cataliza la acilación de la esfinganina para generar ceramida (Figura 4). Al ser inhibida la ceramida sintasa, tampoco puede ocurrir la acilación de la esfingosina generada por hidrólisis de esfingolípidos complejos y como consecuencia sobreviene la muerte celular (Alessenko, 1998). La actividad de la fumonisina sobre esta enzima depende de un grupo amino libre pues la fumonisina A1 que esta N-acetilada inhibe en menos del 2% a la ceramida sintasa (Yescas, 2001).

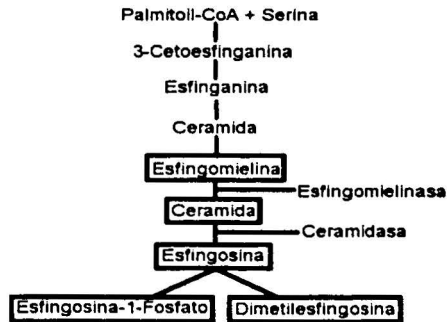


Figura 4. Metabolismo de Esfingolípidos (Alessenko, 1998).

El efecto de la fumonisina B1 sobre el metabolismo de esfingolípidos también se ha determinado *in vivo* ya que cuando a animales de laboratorio se les administra alimento contaminado con la toxina, se ha observado que se elevan los niveles de esfinganina en el suero de estos animales. De esta manera se ha propuesto que el análisis de los niveles plasmáticos de esfinganina en suero pueden ser empleados para diagnosticar si se ha consumido alimento contaminado con fumonisinas (Background U. S. Food and Drug Administration, 2001 b).

Debido al mecanismo de acción molecular de las fumonisinas se han propuesto dos posibles explicaciones para la muerte celular observada:

- a) La esfingalina libre y otros metabolitos como la esfingalina 1-fosfato que se acumulan tienen un efecto inhibitorio sobre el crecimiento además de ser citotóxico para las células conduciendo así a la muerte celular.
- b) La inhibición de la ceramida sintasa ocasiona la acumulación de esfingalina y el decremento de ceramida y otros esfingolípidos complejos desbalanceando así la concentración de estas importantes moléculas bioactivas (Alessenko, 1998).

Efecto cancerígeno. La inhibición de la ceramida sintasa causa la interrupción en la síntesis de esfingolípidos lo que resulta en una apoptosis de células de hígado y riñón de roedores y humanos. Esto es acompañado por un incremento en la proliferación celular compensatoria, con lo que se pueden explicar las propiedades promotoras de tumores de la fumonisina B1 (Howard *et al.*, 1998).

Debido a que se ha correlacionado el cáncer de esófago en humanos, con el consumo de alimentos contaminados con fumonisinas, la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer evaluó las evidencias de la carcinogenicidad de la fumonisina B1 y la clasificó en el grupo 2B (que incluye a los compuestos posiblemente carcinogénicos para humanos). Sin embargo, hay que notar que esta agencia encontró que la información sobre FB1 todavía es limitada, y que la información sobre la FB2 es inadecuada. El resto de las toxinas producidas por *F. moniliforme* fueron clasificadas como posiblemente carcinogénicas para humanos (clase 2B) en 1993 por la misma agencia (Munkvold & Desjardis, 1997). La FDA se ha preocupado por los posibles problemas de salud asociados con las fumonisinas y a marcado límites de contenidos de fumonisinas en alimentos destinados para consumo humano, para la mayoría de los productos de maíz el contenido máximo de fumonisinas es de 4 ppm (Tabla 1).

Tabla 1. Niveles de fumonisinas permitidos en alimentos para humano según la FDA (Background U. S. Food and Drug Administration, 2001 a)

Producto	Fumonisinas totales (FB1+FB2+FB3)
Productos de maíz desgerminado por molienda seca (ejemplo: maíz fragmentado, fécula de maíz, harina de maíz con un contenido de grasa de <2.25% base seca)	4 ppm
Productos de maíz entero o parcialmente desgerminado por molienda seca (ejemplo: maíz fragmentado, fécula de maíz, alimentos procesados de maíz, harina de maíz con un contenido de grasa de $\geq 2.25\%$ base seca)	4 ppm
Salvado de maíz de molienda seca	4 ppm
Maíz destinado para la producción de masa	4 ppm
Maíz destinado para palomitas	3 ppm

1.2 Métodos de Análisis

Entre los métodos empleados para la detección y cuantificación de las fumonisinas se encuentran la cromatografía de gases, cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR ó HPLC), cromatografía en capa fina, espectrometría de masas, así como métodos enzimáticos como la prueba de ELISA (Shephard, 1998).

Los pasos básicos involucrados en la cuantificación de las fumonisinas son: muestreo, preparación de la muestra, purificación, concentración, separación, detección, cuantificación y confirmación, de los cuales sobresale la detección y la confirmación.

Detección de fumonisinas por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). El análisis de fumonisinas por HPLC es el método de elección por las características de polaridad de la molécula y la posibilidad de formar un derivado fluorescente confiriéndole así una alta sensibilidad al método. Debido a que las fumonisinas no absorben radiación ultravioleta y carecen de fluorescencia natural, es necesario hacer una derivatización, es decir, una modificación química covalente en algún grupo funcional, en el caso de las fumonisinas se aprovecha la reactividad del grupo amino (Yescas, 2001).

El primer método para cuantificar fumonisinas por HPLC implicaba la formación de derivados maleil, pero tenía un límite de detección de 10 ppm, inadecuado para muestras de maíz contaminados de forma natural. La sensibilidad fue mejorada por la formación de derivados con fluorescamina, pero resulto en la formación de dos productos lo que resultaba indeseable. La preparación de derivados con o-ftadialdehído (OPA) en presencia de 2-mercaptoetanol y buffer de boratos en pH 9 a 10, ha sido empleada en muchos laboratorios como método de elección para el análisis cuantitativo de fumonisinas en maíz. La AOAC junto con la IUPAC colaboraron en un estudio para estandarizar la cuantificación de fumonisinas en el que emplearon el reactivo o-ftadialdehído (OPA) en presencia de 2-mercaptoetanol, buffer de boratos y una fase móvil de metanol:fosfato de sodio monobásico (0.1 M, 77:23), teniéndose límites de detección de 0.05-0.15 ppm. Los derivados formados con OPA son estables por un periodo de 4 minutos, después de la preparación, y disminuye la respuesta fluorescente después de 8 minutos (Sydenham et al., 1996 a).

Confirmación de fumonisinas por espectrometría de masas. La espectrometría de masas es básicamente una técnica que permite determinar la masa de una molécula (peso molecular), además, a menudo proporciona valiosa información estructural a cerca de compuestos desconocidos si se mide la masa de los fragmentos que se producen cuando se rompen moléculas de alta energía (McMurry, 1994). Un espectrómetro de masas bombardea la sustancia bajo investigación con un haz de electrones o átomos y registra el resultado a modo de un espectro de fragmentos de iones. La separación de los fragmentos de iones tiene como base la masa (estrictamente la relación masa/carga) (Silverstein & Bassler, 1980).

La ionización por impacto electrónico requiere de la volatilización de la muestra, ya que las fumonisinas tienen puntos de fusión no determinados (Sydenham et al., 1996 b) se emplea para su confirmación espectrometría de masas con ionización por bombardeo atómico rápido (FAB), la ionización por FAB genera los iones con peso molecular 706 m/z para la FB2 y 722 m/z para la FB1, estos valores pueden variar hasta en dos unidades de m/z debido a la técnica de ionización (Caldas, et al., 1995).

El fenómeno más sencillo que se presenta es la remoción de un electrón simple de la molécula para formar un ión molecular padre (M^+), además, imparte a estos iones moleculares un excedente grande de energía, el necesario como para romper los enlaces covalentes que hacen que la mayoría se fragmenten (Solomons, 1988).

1.3 Técnicas para la reducción del contenido de fumonisinas en maíz y alimentos derivados.

Una de las formas de prevenir la infección por *F. moniliforme* y como consecuencia evitar un alto contenido de fumonisinas en el maíz, es la elección de variedades de maíz que presenten una mayor resistencia a la infección por *F. moniliforme*, ya que se ha observado que diferentes tipos de maíz muestran diferente susceptibilidad a la infección por *F. moniliforme* en un área específica, ésta resistencia puede ser aumentada por selección natural o a través de la ingeniería genética, por ejemplo, con la inserción del gen cry 1A de *Bacillus thuringiensis* en el genoma del maíz (Munkvold *et al.*, 1999).

Cuando la contaminación no puede ser prevenida, se necesita la descontaminación, se han aplicado procesos para eliminar las fumonisinas o al menos reducir sus niveles, estos procesos se clasifican como tratamientos biológicos, físicos y químicos.

Tratamientos biológicos. Los investigadores Scott *et al.* (1995); Scott & Lawrence (1995, 1997); Torres *et al.* (1998) han estudiado el efecto que tiene el proceso de fermentación en la elaboración de cerveza y vino en la reducción de micotoxinas. La incidencia de fumonisinas en cerveza española fue estudiada por Torres *et al.* (1998), detectando fumonisinas en un 43.8% de las muestras analizadas. En otro experimento Scott *et al.* (1995) fermentaron cebada con una cantidad adicionada de ocratoxina-A, fumonisina B1 y fumonisina B2, después de 8 días de fermentación usando 3 diferentes cepas de levaduras (*Sacharomyces*), el decremento máximo observado para ocratoxina-A, fumonisina B1 y fumonisina B2 fue de un 13%, 28% y 17% respectivamente. Se observó una captación de ocratoxina-A por la levadura de un 21% y no se observó captación de fumonisinas por la levadura.

Se han identificado dos clases de microorganismos que son capaces de metabolizar una porción de la cadena hidrocarbonada de las fumonisinas como única fuente de carbono, produciendo CO₂. Dentro de la primera clase se encuentran dos levaduras, *Exophiala spinifera* y *Rhinochadiella atrovirens*, las cuales se aíslan con frecuencia de semillas de maíz en áreas tropicales y subtropicales. La segunda clase la componen bacterias gram negativas del género *Xanthomonas*, aisladas del tallo de plantas de maíz, cabe señalar que cepas aisladas de otros hospederos, no son capaces de metabolizar las fumonisinas (Munkvold & Desjardis, 1997).

Tratamientos químicos. La amonización del maíz es un método para la destoxificación de aflatoxinas que mostró tener poca eficacia en reducir los contenidos de fumonisinas o su toxicidad, sin embargo, se logra un decremento significativo en el contenido de FB1 en un maíz contaminado de forma natural después de un tratamiento con amonio a alta presión a temperatura ambiente o con un tratamiento a baja presión y alta temperatura. (Jackson et al., 1996 a).

Otros procesos pueden disminuir los niveles de las fumonisinas, tal es el caso de la nixtamalización de maíz para masa y tortillas. Dombink-Kurtzman *et al.* (2000) estudiaron el efecto de la nixtamalización en maíz contaminado con fumonisinas para la producción de masa y de tortillas, observando que el proceso reduce significativamente el contenido de fumonisinas en maíz. La nixtamalización tiene un efecto de disminución dramática en la cantidad de FB1 presente en maíz crudo, en tortillas la FB1 representa el 18.5% (8.1% FB1+ 10.4% HFB1) de la concentración inicial, lográndose una reducción del 81.5% de la FB1, así mismo se encontró una reducción del 89.3% de FB2 en tortillas.

Lu *et al.* (1997) reportaron el tratamiento de FB1 con fructosa en agua en pH>7. Está reacción resultó en la unión del grupo amino primario de la FB1 con la fructosa, disminuyendo la concentración de FB1 detectable con el reactivo de OPA y su toxicidad, ya que ratas alimentadas con el producto de esta reacción no desarrollaron cáncer.

Howard et al. (1998) describió la formación de la N-(carboximetil) fumonisina B1 cuando la FB1 fue incubada con D-glucosa toda la noche a 78°C bajo condiciones alcalinas.

Encontró que la formación de este compuesto se favorece con pH mayores a 7. La N-(carboximetil) fumonisina B1 al igual que las fumonisina A1 se encuentra N-sustituída por lo que no es posible su cuantificación con el reactivo de OPA-mercaptoetanol. Así mismo Liu et al. (2001) reportaron que el tratamiento de FB1 con glucosa por 48 horas a pH 7 y 80°C resultan en una significativa reducción FB1 detectable. Lo más sobresaliente de este estudio es que cuando una dieta que contenía el producto de la reacción de FB1-glucosa fue suministrada a ratas, no mostró toxicidad y no resultó en iniciación de cáncer.

Otra reacción que ha sido investigada, es el tratamiento de maíz con una combinación de H_2O_2 y $NaHCO_3$, la cual produce una reducción de 100% en la concentración de fumonisinas en maíz contaminado. La toxicidad de los productos terminales de esta reacción fue reducida comparada con el maíz no tratado. Sin embargo, se necesita mucho trabajo antes de que este método de destoxificación pueda ser usado en aplicación comercial (Munkvold & Desjardis, 1997).

Una complicación general de muchos de los métodos de reducción de las fumonisinas es el hecho de que la reducción en la fumonisina detectable no siempre resulta en la reducción de la toxicidad. Las moléculas de fumonisinas pueden ser alteradas por varios tratamientos en los cuales el o los productos pueden ser no detectables pero todavía tóxicos, además, son cruciales las pruebas de toxicidad de los productos finales de éstos tratamientos acompañada de los datos de la fumonisina remanente.

Tratamientos físicos. El camino más simple para disminuir el contenido de fumonisinas en el maíz es la remoción física de los granos contaminados por selección manual. Esto consume tiempo en el proceso y en muchos casos es imposible. Una remoción parcial de la micotoxina puede ser alcanzada por limpieza seca del grano y también en el proceso de molienda. La molienda da fracciones con niveles elevados de micotoxina en el salvado y niveles bajos en la harina reduciendo el contenido de fumonisinas en un rango de 26-69%. En el proceso de molienda húmeda de maíz el almidón obtenido está libre de la toxina. En cambio las otras fracciones contienen FB1 en las siguientes concentraciones: parte proteíca 5.1-5.8 ppm, fibra 2.7-5.7 ppm y germen 1.3-3.1 ppm cuando el maíz originalmente contenía 13.9 ppm (Katta et al., 1999).

INTRODUCCIÓN

La FB1 es termoestable ya que al mantener en ebullición el cultivo de *F. moniliforme* durante 30 minutos, seguido por un proceso de secado en horno a 60°C por 24 horas no se obtuvo disminución de la micotoxina, de manera similar, al aplicar las condiciones del proceso de pasteurización (62°C durante 30 minutos) no se observó pérdida del contenido de fumonisinas. (Jackson *et al.*, 1996 a).

Estudios para evaluar la estabilidad térmica de FB1 y FB2 a diferentes pH (4, 7 y 10) en un sistema acuoso a temperaturas de 100 a 235 °C a presión (0 a 440 psi) en un periodo de 60 minutos, obtuvieron que la concentración de FB1 y FB2 disminuye con el tiempo de proceso, mientras que los niveles de cuatro productos de descomposición, dos parcialmente hidrolizados (PHFB1 y PHFB2) y dos completamente hidrolizados (HFB1 y HFB2) aumentaban. En pH ácido y neutro se obtienen, tanto para FB1 y FB2, un producto parcialmente hidrolizado (PHFB1 y PHFB2) y otro completamente hidrolizado (HFB1 y HFB2), en pH alcalino (Jackson *et al.*, 1996 a, b). En general, la FB1 y FB2 parecen menos estables a pH 4 y más estables a pH 7. Después de 60 minutos de tratamientos a temperaturas mayores a 175 °C, ambas fumonisinas se ven disminuidas hasta en un 90% independientemente del pH (Jackson *et al.*, 1996 a, b).

En procesos de elaboración de alimentos como es el caso del horneado (175 y 200°C durante 20 minutos) en panqués de maíz, el contenido de FB1 disminuye de manera pequeña pero significativa, el porcentaje de retención en panqués horneados a 175°C ($83.7 \pm 3.5\%$) fue mayor que en panqués horneados a 200 °C ($72.4 \pm 5.9\%$). En ambas temperaturas la pérdida de FB1 fue mayor en la superficie del panqué que en el centro. En el freído (190°C por 1-15 minutos) en totopos se observa una disminución parecida a la del horneado y en ambos casos la disminución se explica por la formación de bases de Schiff producto de la reacción entre la fumonisina y un azúcar reductor (Jackson *et al.*, 1997).

Un tratamiento físico para la reducción de fumonisinas que ha sido poco estudiado es la irradiación la cual se ha usado para la eliminación de toxinas y de microorganismos, a continuación se presenta la Tabla 2 con dosis usadas con estos fines (Desrosier, 1973).

Tabla 2. Dosis mínimas aproximadas de radiación gama para la destrucción de toxinas específicas de significancia de salud pública (Desrosier, 1973)

TOXINA	MEDIO	DOSIS (KGy)*
Toxina (C. bot., tipo A)	Queso	>70
Toxina (Staph. Factor emitico)	Salchicha de carne de cerdo	<10, <20
Toxina (Staph. Factor emitico)	Agua	7.2

* 1 KGy = 1×10^3 Gy
 1 Gy = 10 000 ergs/g

En 1996 A. Visconti *et al.* estudiaron la estabilidad de las fumonisinas a diferentes periodos de almacenamiento y temperaturas en harina de maíz irradiado con radiación gamma, encontraron que se requiere de 15 KGy para disminuir el contenido de fumonisinas en un 20% y que el maíz irradiado a 15 KGy puede ser almacenado por más de seis meses a 25°C o por más de cuatro semanas a 40°C sin que el tiempo de almacenamiento altere el contenido de fumonisinas.

Irradiación de alimentos. Existen varias formas de energía radiante emitidas por diferentes fuentes. Estas pertenecen al espectro electromagnético de radiaciones y difieren en cuanto a la longitud de onda, frecuencia, fuerza de penetración y los diversos efectos que ejercen en los sistemas biológicos. Algunas de éstas formas de energía radiante y sus efectos se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Efectos de diversas longitudes de onda de energía radiante (Potter, 1973)

Clasificación	Longitud de onda (Angstroms)	Efectos
Larga invisible Radio Calor infrarrojo	Menos de 1000 Muy larga 8000 y mayores	Ninguno Puede aumentar la temperatura Puede aumentar la temperatura
Visible Roja, anaranjada, amarilla, verde, azul, violeta	4000 a 8000	Poco o ninguno
Corta invisible Gama total de ultravioletas	136 a 4000 3200 a 4000 2800 a 3200 2000 a 2800 1500 a 2000 1000	Escala fotográfica y fluorescente Bronceado de la piel humana, vitamina D que combate al raquitismo Máxima fuerza germicida Región Shuman Formación de ozono, germicida en concentración adecuada
Rayos X	1000 a 1500	Germicida
Rayos alfa, beta y gamma	Menos de 1000	Germicida
Rayos cósmicos	Muy corta	Probablemente germicida

La luz ultravioleta, sobre todo la que tiene una longitud de onda dentro de la escala de 2000 a 2800 angstroms, se utiliza para inactivar los microorganismos en la superficie de los alimentos.

El factor que limita seriamente su aplicación en este caso es el bajo grado de penetración de la luz ultravioleta en los alimentos, lo cual restringe su utilización a tratamientos de la superficie o de alimentos líquidos que pueden exponerse a ella en capas delgadas. Otras aplicaciones de la luz ultravioleta son los tratamientos del agua y el aire que se emplean en las fábricas de la industria alimentaria. Los rayos X tienen una mayor fuerza de penetración que la luz ultravioleta y se ha pensado usarlos como un medio de conservación de alimentos sin embargo, a los rayos X no se les puede dirigir, lo que sería causa de un bajo grado de efectividad si se intentara emplearlos con el equipo actual. Por ello las aplicaciones de los rayos X en los alimentos han sido hasta ahora de carácter experimental más que comercial (Potter, 1973).

Hoy en día cuando se emplea el término "irradiación de alimentos" se entiende generalmente el procesamiento por medio de rayos gamma y rayos beta, que en conjunto se llaman radiaciones ionizantes. A éstas se les escoge por su fuerza de penetración y por que no producen ninguna cantidad considerable de radioactividad en los alimentos tratados. Tampoco producen ningún grado importante de calor en los alimentos, y a eso se debe la aplicación del término "esterilización en frío" a este método de conservación de alimentos.

Lo importante en los procesos de irradiación es la dosis o cantidad de radiación que recibe un sustrato, es decir, el número de unidades de energía de radiación absorbidas, la unidad internacional de radiación es el Gray (Gy) que equivale a 10,000 ergs/g. Los materiales absorben la energía de radiación en diferentes grados. Esto sucede aún cuando los materiales están expuestos a la misma fuente de radiación por el mismo tiempo. Bajo estas condiciones, dos alimentos diferentes pueden estar expuestos a la misma cantidad de energía de radiación, pero uno de ellos habrá absorbido una mayor cantidad de esta energía y por lo tanto, habrá recibido un mayor número de Grays que el otro (Potter, 1973).

Fuentes de radiación. Los rayos beta (electrones de alta energía) pueden ser producidos por máquinas como el generador Van de Graaff o un acelerador lineal. Los elementos naturales radioactivos (U, Np, Pu y Th) y los isótopos radioactivos que se pueden producir en reactores nucleares (Co^{60} , Cs^{137}) emiten una variedad de radiaciones y partículas de energía durante la desintegración radioactiva. Entre ellas están las partículas alfa que son átomos de helio en que faltan dos electrones, las partículas o rayos beta que son electrones de alta energía, llamados también rayos catódicos, los rayos gamma o fotones y los neutrones. Estas radiaciones tienen diferentes grados de fuerza de penetración, en orden decreciente: los neutrones, los rayos gamma, los rayos beta y los rayos alfa. Los neutrones tienen una gran fuerza de penetración y tanta energía que pueden alterar la estructura atómica y así volver radioactivos los elementos con que chocan.

Actualmente se utilizan comúnmente elementos radioactivos inducidos por medios artificiales, por ejemplo el Co^{60} , como fuente de radiaciones. El Co^{60} se emplea principalmente como una fuente de rayos gamma, ya que las partículas beta pueden producirse más eficazmente en máquinas electrónicas (Potter, 1973).

1.4 Mecanismos de acción de las radiaciones.

Los tres mecanismos de interacción de la radiación electromagnética con la materia son efecto fotoeléctrico, efecto Compton y producción de pares.

Efecto fotoeléctrico. El fotón interactúa con el absorbedor como un paquete de energía que es completamente absorbido. Este efecto tiene lugar cuando se trata de radiaciones electromagnéticas de baja energía. Como resultado de la energía absorbida, un electrón, llamado fotoelectrón, es lanzado fuera del átomo desde una órbita cercana al núcleo con una energía cuyo valor es dado por la ecuación:

$$E_{e^-} = E_{\gamma} - E_{e.a.}$$

Donde:

E_{e^-} = Energía del fotoelectrón

E_{γ} = Energía del rayo

$E_{e.a.}$ = Energía de amarre del electrón lanzado

La vacante en el orbital es ocupada por otro electrón proveniente de órbitas exteriores, o de niveles superiores de energía, emitiéndose un rayo X con una energía específica igual a la diferencia entre las energías de amarre de los electrones en ambos niveles. Pero, si en vez de los rayos X, esta energía es transferida a otro electrón en una órbita cercana al núcleo con un nivel bajo de energía, éste es lanzado del átomo y se conoce como electrón Auger (Navarrete & Cabrera, 1993).

Efecto Compton. Cuando un rayo γ tiene una mayor energía que en el caso del efecto fotoeléctrico, no se absorbe completamente en una sola colisión, la colisión del rayo γ provoca el lanzamiento de un electrón y se desvía su trayectoria para continuarla con menor energía, es decir, mayor longitud de onda y en consecuencia menor frecuencia, con mejor oportunidad de encontrar electrones en su camino a quienes comunicales su energía. La energía del rayo desviado se obtiene por la relación.

$$E_{g_2} = E_{g_1} - E_{e.a.}$$

Donde:

E_{g_2} = Energía del rayo dispersado

E_{g_1} = Energía del rayo incidente

E e.a. = Energía de amarre del electrón lanzado

El rayo γ puede sufrir varias colisiones, antes de ser absorbido por efecto fotoeléctrico. Si el electrón lanzado pertenece a una órbita cercana al núcleo de bajo nivel energético, tendrá lugar la emisión de rayos X o electrón Auger, igual que durante el efecto fotoeléctrico.

Producción de pares. Cuando la energía del rayo gamma incidente es muy alta, al ser absorbido por la materia se transforma en masa y produce dos partículas beta, una negativa y otra positiva. Como dos masas de electrón son producidas, es necesaria al menos una energía equivalente a ellas ($2 \times 0.51 \text{ MeV} = 1.02 \text{ MeV}$). Si la energía del rayo gamma inicial es mayor que este valor de umbral, el exceso aparecerá como energía cinética del par formado. El neutrón a su vez causa ionización y el positrón existe hasta que interacciona con otro electrón para aniquilar el par, produciéndose ahora dos rayos gamma de 0.51 MeV cada uno, conocidos como radiación de aniquilación, por lo que el proceso de aniquilación puede ser considerado hasta cierto punto como el inverso de la producción de pares.

De este modo, el efecto fotoeléctrico es el predominante en los rayos gamma con energía menores a 60 KeV cuando atraviesan aluminio y menores a 600 KeV si atraviesa plomo. El efecto Compton predomina para rayos gamma de energía entre 60 KeV y 1.5 MeV en aluminio y entre 600 KeV y 5 MeV en plomo. La producción de pares es el principal mecanismo para energías mayores al límite donde se produce principalmente el efecto Compton (Navarrete & Cabrera, 1993).

Las radiaciones ionizantes penetran por los materiales alimenticios en un grado que varía de acuerdo con la naturaleza del alimento y las características de las radiaciones, la efectividad de las radiaciones depende también de su capacidad de alterar moléculas y de su potencialidad de ionización, es decir, su capacidad de desprender electrones de los átomos de los materiales que atraviesan. Las partículas beta generalmente tienen mayor capacidad que los rayos gamma para producir ionizaciones en el material que atraviesan.

INTRODUCCIÓN

Cuando las radiaciones ionizantes pasan a través de los alimentos, ocurren choques entre las radiaciones y las partículas de alimento en los niveles molecular y atómico. La producción de pares de iones resulta cuando la energía de éstos choques es suficiente como para desalojar un electrón de una órbita atómica. Ocurren cambios moleculares cuando los choques proporcionan suficiente energía para romper los enlaces químicos entre átomos; una consecuencia importante de ello es la formación de radicales libres.

Los radicales libres son fragmentos de moléculas, grupos de átomos o átomos individuales, que poseen un electrón no apareado. Las moléculas estables casi siempre poseen un número par de electrones, y una configuración que contiene un electrón no apareado es muy inestable. Los radicales libres, por consiguiente, tienen una gran tendencia a reaccionar entre sí y con otras moléculas para encontrar parejas para sus electrones que no las tienen, y así alcanzar su estabilidad.

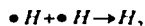
La formación de pares de iones, los radicales libres, la reacción de los radicales libres con otras moléculas, la recombinación de los radicales libres y otros fenómenos físicos y químicos relacionados, proporcionan los mecanismos por los cuales los microorganismos, las enzimas y los componentes de los alimentos se alteran durante la irradiación.

Efectos directos. Son los que se deben a contactos directos entre los rayos o las partículas de alta energía y los materiales irradiados. Es indudable que estos choques ocurren realmente pero la frecuencia con que ocurren en una dosis de radiación dada probablemente no sea suficiente para explicar la mayoría de los efectos en un sustrato determinado.

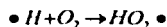
Efectos indirectos. Las radiaciones que chocan con una molécula de un alimento específico producen pares de iones y radicales libres, algo muy parecido sucede cuando las radiaciones de alta energía pasan a través del agua. Las moléculas del agua se alteran, produciendo radicales hidrógeno e hidroxilo, muy reactivos. Estos radicales pueden reaccionar entre sí, con el oxígeno disuelto en el agua y con una amplísima variedad de moléculas, iones orgánicos e inorgánicos que pueden estar disueltos o suspendidos en el agua, así, dos radicales hidroxilo al combinarse forman el peróxido de hidrógeno.



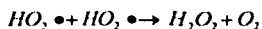
Dos radicales de hidrógeno producen el gas hidrógeno.



Un radical de hidrogeno, mas oxigeno disuelto, dan un radical de peróxido.



Dos radicales de peróxido producen peróxido de hidrogeno mas oxigeno.



El peróxido de hidrogeno es un fuerte agente oxidante y un veneno biológico. Los radicales hidroxilos e hidrógenos son fuertes agentes oxidantes y reductores, respectivamente. También pueden tomar parte en reacciones con materiales orgánicos y alterar la estructura molecular. Puesto que las células vivas y los materiales alimenticios están compuestos en gran parte por agua, la actividad que la radiación comunica a este disolvente constituye un factor muy importante que contribuye al carácter letal o a los cambios subletales en las células vivas y a los componentes de los alimentos. Es probable que un sustrato que recibe radiaciones ionizantes experimente hasta cierto punto los efectos directos antes mencionados; y es seguro que experimenta cuando menos los efectos indirectos (Potter, 1973).

Fotoquímica. La fotoquímica trata del estudio del efecto de la energía radiante en las reacciones químicas y de las velocidades y mecanismos de las reacciones iniciadas por la acción de la luz, esto es en las regiones que comprende el visible (400 a 700 nm), el ultravioleta de (200 a 400 nm), y el ultravioleta al vacío (50 a 200 nm) (Borrell, 1980). Las reacciones ordinarias o térmicas se inician por la activación debida a las colisiones moleculares, sin embargo, la agitación térmica no es el único procedimiento por el cual la energía de los átomos y moléculas asciende suficiente para causar la reacción. Los átomos y moléculas pueden absorber la radiación, con la absorción de un cuanto de energía radiante lo suficientemente grande puede romperse una molécula. Tal absorción de luz por un átomo o molécula conduce a su excitación, si la activación es suficientemente grande, puede resultar una reacción química y con frecuencia produce cambios químicos bajo condiciones donde la activación térmica sola no sería efectiva (Maron & Pruton, 1996).

INTRODUCCIÓN

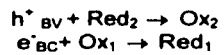
La influencia de la luz sobre los sistemas químicos puede ser diversa. Si los cuantos de luz no son suficientemente energéticos como para producir un efecto profundo, como es la disociación de una molécula, la energía puede simplemente degradarse en energía térmica. Este último efecto puede considerarse ligero en el sentido fotoquímico, ya que puede alcanzarse el mismo resultado elevando la temperatura por cualquier medio. Cualquier efecto de la luz, sea ligero o profundo sólo puede ser producido por la luz que absorbe el sistema en cuestión (Castellan, 1987).

La luz puede producir diferentes tipos de reacción: síntesis, descomposición, hidrólisis, reducción, oxidación y polimerización. Una molécula absorbe luz de un fotón y toma la energía para formar una molécula excitada. La energía que adquiere una molécula cuando absorbe un fotón en la región visible es del mismo orden de magnitud que la energía requerida para romper los enlaces normales de la molécula. A longitudes de onda menores, en el ultravioleta, resulta posible inyectar más energía a la molécula por cada fotón (Borrell, 1980) en el caso del dióxido de titanio la radiación electromagnética $h\nu > E_g$ (3.2 eV fotones en el intervalo UV) inducen transiciones electrónicas. Los electrones en la banda de valencia absorben la energía del fotón, la cual es suficiente para alcanzar el nivel de energía de la banda de conducción; con esto se genera un electrón en la banda de conducción y un hueco en la banda de valencia, lo que se conoce como el par electrón-hueco, e^-/h^+ . Dichas partículas están electrónicamente cargadas y, en la mayoría de los casos emigran a la superficie del dióxido de titanio, si es que no ocurre antes la recombinación entre ellos.

La representación de este proceso es:



En la superficie o en la subsuperficie, estas cargas (e^- o h^+) pueden ocupar estados superficiales o subsuperficie. Las cargas atrapadas pueden a su vez recombinarse o inducir reacciones redox vía transferencia de electrones con donadores (Red_2) y aceptores (Ox_1) de los electrones. Así, en fase acuosa, la superficie del dióxido de titanio es ampliamente considerada como una productora de radicales hidroxilo (Pelizzetti *et al.*, 1994).



El dióxido de titanio es muy estable a temperaturas ordinarias, relativamente insoluble en agua y no se afecta por los gases de la atmósfera. (Wise & Oudar, 1990).

CAPÍTULO 2
OBJETIVOS

Objetivo general:

- Estudiar el efecto que tienen sobre las fumonisinas B1 y B2 las radiaciones ultravioleta y gamma.

Objetivos particulares:

- Realizar la caracterización fisicoquímica de maíz contaminado con fumonisinas incluyendo la cuantificación del contenido de fumonisinas FB1 y FB2 presentes en muestras de harina de maíz mediante cromatografía de líquidos.
- Determinar la precisión del método de extracción y análisis mediante el cálculo del: porcentaje de recuperación, coeficiente de variación y linealidad.
- Probar si la radiación ultravioleta o gamma tienen efecto sobre las fumonisinas B1 y B2 irradiando estándares.
- Estudiar los efectos de la radiación ultravioleta sobre las fumonisinas presentes en harina de maíz.
- Estudiar el efecto que tiene el TiO₂ en harina de maíz y en harina de maíz suspendida en agua durante el proceso de irradiación con luz ultravioleta.
- Estudiar el efecto de la irradiación gamma con dióxido de titanio y sin dióxido de titanio sobre las fumonisinas presentes en harina de maíz.

CAPÍTULO 3
TRABAJO EXPERIMENTAL

Materiales y métodos. Se emplearon estándares de FB1 y FB2 o-ftadialdehido (OPA), 2-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich), dióxido de titanio (Prolabo, Alemania), metanol (grado HPLC), fosfato de sodio monobásico dihidratado (J. T Baker).

Las muestras de maíz que se emplearon para este estudio fueron suministradas por el Centro de Investigación y Mejoramiento del Maíz y Trigo (CIMMyT), México, el Batán en Texcoco cuyas características son: maíz amarillo resistente a *Fusarium* proveniente de mazorcas de líneas avanzadas inoculadas con *F. moliniforme* en condiciones de campo. Estas líneas de maíz son el producto de un programa de mejoramiento genético que los científicos e investigadores del CIMMyT llevan a cabo a través de los años y en diversos ambientes con el propósito de seleccionar, recombinar y avanzar los mejores genotipos.

Análisis de fumonisinas. Se analizaron usando un sistema de cromatografía de líquidos con arreglo de diodos y detector de fluorescencia (Varian). Columna de 15.0 cm, empaque de nucleosil 100-5C18 (HiChrom) con una eficiencia del 65%, Las condiciones empleadas en el detector fueron excitación 335 nm, emisión 440 nm, intervalo 1 y en la bomba un flujo de 1.0 mL/min usando una fase móvil de metanol-fosfato de sodio monobásico (0.1 M, 77+23 v/v), pH 3.3 ajustado con ácido fosfórico y filtrada a través de una membrana de nylon con un poro de 0.45 µm, para la detección de fumonisinas se requiere un de una derivatización que genere un producto fluorescente

Derivatización (En el caso de estándares). Se colocan 25.0 µL de la solución estándar en el fondo de un vial de 2.0 mL, y se adicionan 225.0 µL de reactivo OPA-mercaptoetanol, se mezcla e inmediatamente se inyectan 20.0 µL en el cromatógrafo de líquidos. El reactivo de OPA-mercaptoetanol se preparó de la siguiente forma: se disolvieron 40.0 mg de OPA en 1.0 mL de metanol y se adicionaron 5.0 mL de tetraborato de sodio 0.1 M y 50.0 µL de 2-mercaptoetanol, se almacenó en oscuridad por menos de 1 semana. Las soluciones estándar de FB1 y FB2 se prepararon a una concentración de 100.0 ppm, de cada una de las

TRABAJO EXPERIMENTAL

soluciones de fumonisina se realizaron diluciones que sirvieron para realizar la curva de calibración (ver Tablas 1 y 2 Figuras 1 y 2 del anexo I).

Preparación de estándares de FB1 y FB2 para irradiación ultravioleta o gama. Para cada una de la fumonisinas se procedió de la siguiente manera, a partir de una solución de 100.0 ppm de estándar de fumonisina se preparó una solución de 10.0 ppm, se tomaron 200.0 μ L y se colocaron en el fondo de un vaso de precipitados de 10.0 mL, posteriormente se evaporaron a sequedad en un baño de agua a 60°C, se tapó el vaso con parafilm y se mantuvo en refrigeración hasta el momento de su irradiación (menos de dos días). De esta manera se prepararon ocho vasos.

Irradiación de estándares de FB1 y FB2 con ultravioleta. Uno de los vasos se toma como control ya que no es expuesto a la radiación. Los siete vasos restantes se colocan sin parafilm bajo la lámpara de luz ultravioleta de 100.0 watts, arco de mercurio de inmersión y presión media, con chaqueta de cuarzo y regulador de voltaje (ACE GLASS Incorporated), a 3 cm de distancia medidos desde la chaqueta de cuarzo hasta el fondo del vaso (Figura 5), los cuales se van retirando a los siguientes intervalos de tiempo: 30, 60, 90, 120, 240, 360 y 480 minutos, inmediatamente después del tratamiento de irradiación se coloca nuevamente el parafilm y se mantiene en refrigeración hasta su análisis por HPLC (menos de 4 días).

Irradiación de estándares de FB1 y FB2 con radiación gamma. Uno de los vasos se tomó como control ya que no se expuso a la radiación. Los siete vasos restantes se colocan con parafilm a 40.0 cm del vértice formado por las fuentes de Co^{60} (Figura 6) y a 16.5 cm del suelo en la estructura del irradiador tipo alberca Gamma Beam, (Figura 3 y 4 del anexo I) y se retiraron al ir alcanzando las dosis de 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0, 12.0 y 14.0 KGy a una tasa de dosis de 2.056 KGy/h, después de esto se mantuvieron en refrigeración hasta su análisis por HPLC (menos de 4 días).

También se realizó la irradiación a 15.0 KGy de fumonisina B1 en estado sólido, posteriormente se llevó a cabo la cuantificación de la fumonisina remanente por HPLC y un análisis mediante espectrometría de masas.

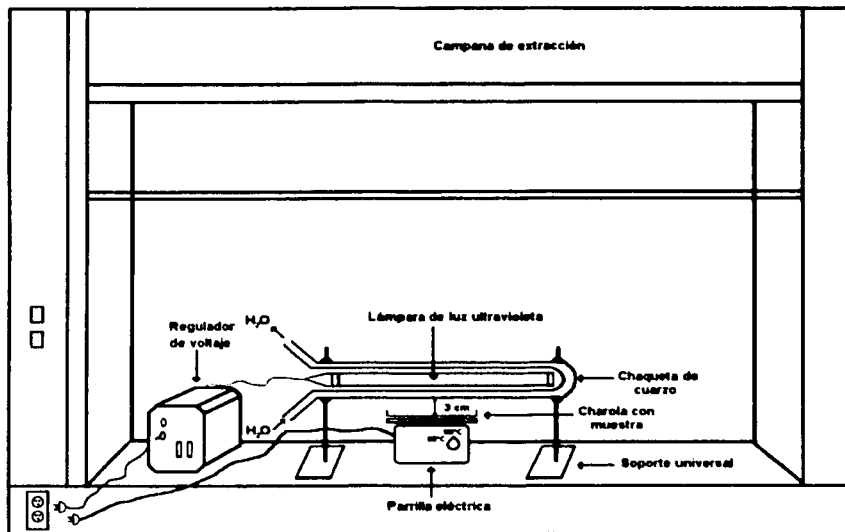


Figura 5. Equipo montado para la irradiación ultravioleta de estándares y muestras.

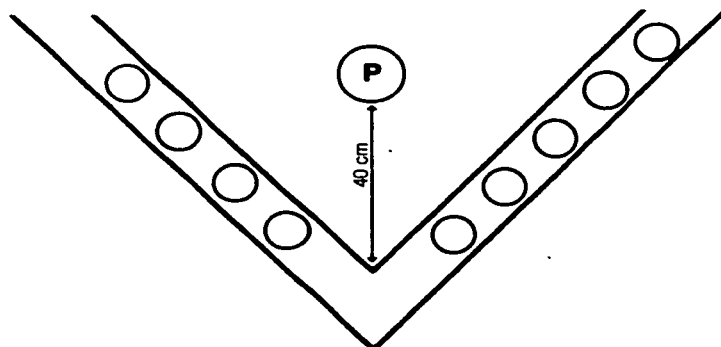


Figura 6. Posición dentro del irradiador en la que se colocaron las muestras (posición "P" a un distancia de 16.5 cm del suelo).

TRABAJO EXPERIMENTAL

Para el análisis de los estándares tratados con radiación ultravioleta o gamma, se resuspende el contenido de cada vaso en 200.0 μL de metanol y se toman 25.0 μL para la derivatización.

Irradiación de harina de maíz con luz ultravioleta ($\lambda < 380 \text{ nm}$). Las muestras que se emplearon se molieron previamente por 5 minutos, en lotes de 250.0 g usando un tamiz No.1 en el molino Brabender Ohg Duisburg, posteriormente se mezclan los gruesos y finos para homogenizarlos en una sola muestra. El harina de maíz (25.0 g) se expone a la radiación ultravioleta en las siguientes condiciones: temperaturas de 25, 60 y 90 $\pm 10^\circ\text{C}$ por tiempos de 120, 240, 360 y 480 minutos, en charolas de aluminio (9.5 x 18.6 cm), a una distancia de 3.0 cm de la lámpara de luz ultravioleta, medidos desde la chaqueta de cuarzo hasta el fondo de la charola (Figura 5).

Irradiación de harina de maíz con luz ultravioleta ($\lambda < 380 \text{ nm}$) en presencia o ausencia de dióxido de titanio. El harina de maíz (25.0 g) fue expuesta a la radiación ultravioleta en las siguientes condiciones: temperaturas de 25 y 90 $\pm 10^\circ\text{C}$ por tiempos de 120 y 480 minutos respectivamente, en presencia y ausencia de dióxido de titanio (1.0 g de TiO_2 por cada 100 g de harina), en charolas de aluminio (9.5 x 18.6 cm), a una distancia de 3.0 cm de la lámpara de luz ultravioleta, medidos desde la chaqueta de cuarzo hasta el fondo de la charola (Figura 5).

Irradiación de harina de maíz suspendida en agua. El harina de maíz (25.0 g) se suspende en agua (50.0 mL) en un vidrio de reloj y con agitación magnética se expone a la radiación ultravioleta a temperatura ambiente por 240 minutos, a una distancia de 3.0 cm de la lámpara de luz ultravioleta, medidos desde la chaqueta de cuarzo hasta el fondo del vidrio de reloj empleando el mismo dispositivo de irradiación ultravioleta de la Figura 5. Se estudió el efecto de la presencia o ausencia del dióxido de titanio para lo cual se agregó 1.0 g de TiO_2 por cada 100 g de harina.

Irradiación de harina de maíz con radiación gamma. Las muestras de harina de maíz se sometieron a la radiación gamma en bolsas de plástico con sello hermético, se colocaron a 40.0 cm de vértice de la estructura del Gamma Beam y a 16.5 cm del suelo (Figura 6). Se

TRABAJO EXPERIMENTAL

fueron retirando al ir alcanzando las dosis de 3.0, 6.0, 9.0, 12.0 y 15.0 KGy, después de esto se mantuvieron en refrigeración hasta su análisis por HPLC. A las muestras irradiadas con ultravioleta o gamma se les cuantificaron las fumonisinas B1 y B2 residual para comparar los niveles de fumonisinas con una muestra que no recibió tratamiento de irradiación y así evaluar el efecto de degradación provocado por las radiaciones.

Análisis de muestras de harina de maíz. Para la extracción de fumonisinas se sonicaron 25.0 g de harina de maíz con 50.0 mL de metanol-agua (3:1 v/v) por 3.0 minutos, se centrifugó a 1250.0 rpm en una ultracentrífuga de temperatura controlada (Eppendorf 5810 R) por 10 minutos a 25 °C, se filtró la mezcla a vacío a través de papel filtro del número 6 y se colectaron 10.0 mL del extracto en una probeta graduada, se ajustó el pH en un intervalo de 5.8-6.5 con NaOH 1.0 M. Posteriormente los extractos de harina de maíz se purificaron en una columna de intercambio iónico (SAX) 3.0 mL de capacidad y 500.0 mg de empaque (Supelco), la columna se preacondicionó con metanol (5.0 mL) seguido de metanol:agua (5.0 mL, 3:1 v/v), manteniendo un flujo de 2.0 mL/min, desechando los lavados, se agrega el extracto (10.0 mL) a la columna seguido de un lavado con metanol:agua (5.0 mL, 3:1 v/v), y metanol (3.0 mL), ajustando el flujo a 1.0 mL/min las fumonisinas (B1 y B2) se eluyen con metanol:ácido acético (10.0 mL, 99:1 v/v) y se toma una alícuota de 4.0 mL, se evapora a sequedad en un baño de agua a 60°C. El residuo se resuspende en metanol (1.0 mL) y se evapora a sequedad en un baño de agua a 60 °C, se tapa con parafilm y se almacena en refrigeración por un tiempo máximo de una semana hasta su análisis.

Derivatización de extractos de harina de maíz. Se resuspende en metanol (200.0 µL) el residuo evaporado, del cual se toman 25.0 µL para realizar la derivatización adicionando 225.0 µL de reactivo OPA-mercaptoetanol, el cual se mezcla en vortex e inmediatamente se inyectan 20.0 µL en el cromatógrafo de líquidos. Se determina la concentración de FB1 y FB2 en el extracto de harina de maíz por interpolación de áreas de los picos cromatográficos en la curva de calibración, si las áreas del extracto de harina de maíz excedían a las obtenidas por la solución estándar de mayor concentración en la curva de calibración, se diluía el extracto de harina de maíz para reinyectarla.

TRABAJO EXPERIMENTAL

Porcentaje de recuperación en la extracción de las fumonisinas. Para cada fumonisina se realizó el siguiente procedimiento: Se tomaron dos muestras de 25.0 g de harina de maíz, a una de ellas se adicionó solución estándar de fumonisina, posteriormente a ambas muestras se les cuantificó el contenido de fumonisina y se calculó el porcentaje de recuperación.

CAPÍTULO 4
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización fisicoquímica del maíz. Las doce muestras empleadas tenían diferencias en cuanto a color, tamaño del grano y grado de daño, se realizó la caracterización de las muestras de maíz, empleando los criterios que indica la norma mexicana NMX-FF-034-1995-SCFI "Productos alimenticios no industrializados-Cereales-Maíz (*Zea mays L*)". Se dividieron los granos en los siguientes conjuntos: granos enteros, granos dañados por hongos, granos germinados, granos inmaduros, granos dañados por insectos e impurezas. Para clasificarlos como México 1, 2, 3, 4 como se muestra en la Tabla 4, en donde las muestras están ordenadas de menor a mayor porcentaje de granos dañados por hongos.

Tabla 4. Clasificación de los granos de maíz de acuerdo a los criterios de la norma mexicana NMX-FF-034-1995-SCFI

Muestra	Granos Enteros %	Granos dañados por hongos %	Impurezas %	Granos germinados %	Granos inmaduros %	Granos dañados por insectos %	Granos rojos %	Otros	Clasificación
1	91.63	1.50	1.03	0.80	0.20	0.87	4	0.07% morado	México 4
2	91.63	1.53	0.94	1.35	0.97	0.80	0.76	0.1% rayados 0.02 % chupado 0.28% roedores	México 3
3	93.3	3.43	0.57	0.53	0.1	0.967	0.367	0.7% chupado 0.07% roedor	México 3
4	90.2	4.13	0.53	2.87	0.25	1.467	0.25	0.03% rayado 0.4% chupado	México 4
5	85.76	4.30	0.47	5.46	0.93	1.24	1.9	0.03% chupado	México 4*
6	93.3	4.37	0.4		1	0.567	0.8	0.27% rayado 0.07% chupado 0.4% calor	México 3
7	88.77	4.88	0.67	1.86	1.77	2.13	1.12		México 4*
8	91	5.75	0.6	1.25	0.1	0.65	0.75		México 4
9	86.2	5.85	0.3	1.4	2.05	3.1	1.9	0.15% chupado	México 4*
10	88.9	6.6	0.6	2.35	0.1	1.4	0.1	0.5% chupado	México 4*
11	86.35	7.78	0.73	8.90	0.30	2.03	0.75		México 4*
12	85.30	8.70	0.75	2.46	0.93	1.93	0.3	0.38% chupados 0.02% roedores	México 4*

México 4* = Estos granos tienen una suma de daños mayor a la especificada para México 4.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se realizó un análisis proximal de las muestras (sin descartar los ganos dañados) que constó de cenizas, humedad, proteína cruda, grasa cruda, fibra cruda y carbohidratos, la metodología correspondiente se encuentra en el anexo II, además se cuantificó el contenido de fumonisinas B1 y B2 por HPLC empleando el reactivo o-ftalaldehído-mercaptopetanol (OPA/MCE) y se confirmó la presencia de fumonisinas en harina de maíz usando un espectrómetro de masas modelo GCQ, Finnigan Mat, con bombardeo atómico rápido y analizador de trampa de iones, los resultados del análisis fisicoquímico se resumen en la Tabla 5.

Tabla 5. Resultados de la caracterización fisicoquímica y de la cuantificación del contenido de fumonisinas B1 y B2 de las muestras de maíz

Muestra	FB1 (ppm) ^a	FB2 (ppm) ^a	% Humedad ^a	% Cenizas ^{a*}	% Grasa ^{a*}	% Proteína ^{a*}	%Fibra cruda ^{a*}	%Carbohidratos ^{a*}
1	3.83±0.44	1.02±0.10	14.02	1.40	4.18	10.98	3.33	80.12
2	5.64±0.65	1.92±0.18	13.35	1.21	4.10	11.14	2.89	80.67
3	3.53±0.41	1.32±0.12	12.4	1.30	3.58	12.02	2.92	80.17
4	4.33±0.50	1.60±0.15	12.85	1.45	2.62	10.77	3.02	82.15
5	12.33±1.43	4.62±0.43	14.36	1.39	3.43	12.23	1.91	81.04
6	7.02±0.81	2.19±0.21	12.13	1.19	7.02	9.48	3.21	79.09
7	9.51±1.10	3.03±0.28	13.31	2.19	4.05	11.82	1.72	81.15
8	10.60±1.23	3.84±0.36	13.79	1.43	3.32	11.38	2.90	80.98
9	11.39±1.32	3.92±0.37	12.83	1.46	2.52	11.70	2.66	96.37
10	11.33±1.31	3.90±0.37	12.73	1.35	7.02	9.06	2.62	79.94
11	20.87±2.42	7.03±0.66	13.92	1.31	3.55	10.68	2.04	82.41
12	7.75±0.90	2.67±0.25	12.93	1.37	4.03	11.31	3.18	80.11

^a Los valores mostrados son el promedio de tres determinaciones.

^b Datos expresados en base seca.

Para las fumonisinas B1 y B2 las curvas de calibración empleadas para la cuantificación tienen un factor de correlación lineal $r = 0.9993$ y $r = 0.9999$ (Figuras 1 y 2 del

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

anexo I), los límites de detección son de 0.06 ppm y 0.02 ppm, los tiempos de retención son 6.5-6.9 minutos y 14-15 minutos respectivamente.

El porcentaje de recuperación de la extracción de fumonisina B1 es de 62 %, y para la fumonisina B2 es de 84% ambos valores están dentro del intervalo mencionado en la literatura que va del 47% hasta el 97% (Bata & Radomir, 1999).

Se observa en la Tabla 5 una diferencia notable entre las muestras en el contenido de fumonisinas, esto puede deberse a que existe diferencia genética entre un individuo y otro lo que les confiere a cada uno resistencia al *F. moniliforme* diferente, provocando que la cantidad de fumonisinas sea muy variable, sin embargo, en las muestras analizadas el contenido de fumonisina B1 es aproximadamente tres veces mayor que el de la fumonisina B2 siendo la muestra 11 la que presenta el mayor contenido de fumonisinas y la muestra 3 el menor contenido. Replicas en las determinaciones del contenido de fumonisinas de una muestra dan un intervalo de precisión de ± 10 %.

Se observa que no hay una relación entre el contenido de granos dañados por hongos y el contenido de fumonisina, como se puede ver en la Tabla 6, esto puede deberse a que el porcentaje de granos dañados por hongos está dado por el peso de los granos que visiblemente muestran crecimiento fúngico a diferencia de la determinación de fumonisinas por HPLC que no depende del criterio del analista. En la Tabla 6 se observa que la muestra 11 tiene el mayor contenido de fumonisinas (20.87 ppm de FB1 y 7.03 ppm de FB2) y un alto contenido de granos dañados por hongos (7.78%), sin embargo, la muestra 12 tiene menor contenido de fumonisinas (7.75 ppm de FB1 y 2.67 ppm de FB2) y un contenido de granos dañados por hongos (8.70%) mayor que el de la muestra 12, el 40% de las muestras .

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 6. Relación del contenido de fumonisinas B1 y B2 con el porcentaje de granos dañados por hongos en las muestras de maíz

Muestra	FB1 (ppm)*	FB2 (ppm)*	Granos dañados por hongos %
1	3.83 ± 0.44	1.02 ± 0.10	1.50
2	5.64 ± 0.65	1.92 ± 0.18	1.53
3	3.53 ± 0.41	1.32 ± 0.12	3.43
4	4.33 ± 0.50	1.60 ± 0.15	4.13
5	12.33 ± 1.43	4.62 ± 0.43	4.30
6	7.02 ± 0.81	2.19 ± 0.21	4.37
7	9.51 ± 1.10	3.03 ± 0.28	4.88
8	10.60 ± 1.23	3.84 ± 0.36	5.75
9	11.39 ± 1.32	3.92 ± 0.37	5.85
10	11.33 ± 1.31	3.90 ± 0.37	6.6
11	20.87 ± 2.42	7.03 ± 0.66	7.78
12	7.75 ± 0.90	2.67 ± 0.25	8.70

* Los valores mostrados son el promedio de tres determinaciones.

La caracterización química (análisis proximal) en base húmeda de las muestras es en promedio: 13.22 ± 0.69% de humedad, 3.58 ± 1.29% de grasa, 9.59 ± 0.81% de proteína, 2.35 ± 0.47% de fibra y 71.18 ± 4.10% de carbohidratos, las variaciones en nuestros resultados posiblemente se deban a las diferencias genéticas existentes entre los individuos analizados, a pesar de que todas son de maíz amarillo. Los resultados de la caracterización química son similares a la composición reportada en las Tablas de valor nutritivo de los alimentos de mayor consumo en Latinoamérica (1996), en la que se indica que el maíz tiene 13.80% de humedad, 4.80% de grasa, 8.30% de proteína, 12.2% de fibra y 69.6% de carbohidratos todos en base húmeda. Los valores de la bibliografía son el promedio de muchas determinaciones, razón por la cual la suma de los porcentajes antes mencionados no da 100% y no se reportan las cenizas ya que según los autores éstas son muy variables, cabe mencionar que en dichas tablas no se reporta la desviación estándar de sus determinaciones.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el espectro de masas por bombardeo con átomos rápidos (FAB, por sus siglas en inglés fast-atom bombardment) de la Figura 7 se logran identificar las masas 706 y 723 que corresponden a las fumonisinas FB2 y FB1 respectivamente confirmando su presencia en el extracto de harina de maíz (Caldas *et al.*, 1995).

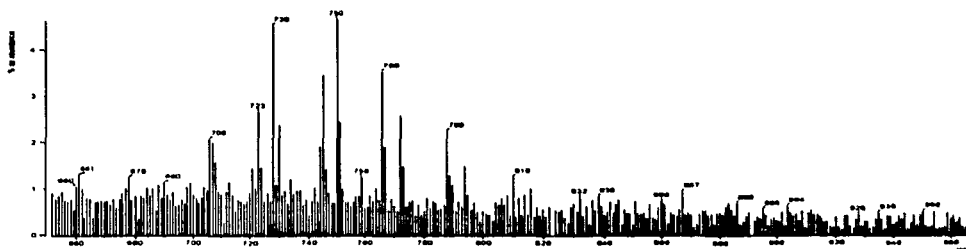


Figura 7. Espectro de masas de un extracto de maíz (acercamiento a los picos de 660 a 960 m/z).

4.1 Comportamiento de estándares de fumonisinas B1 y B2 irradiados con luz ultravioleta

Las fumonisinas B1 y B2 fueron tratadas con luz ultravioleta ($\lambda < 380$ nm), los resultados de este tratamiento están resumidos en la Tabla 7, en donde la concentración de las fumonisinas disminuye gradualmente conforme aumenta el tiempo de exposición a la luz ultravioleta. Al tiempo de 30 min por efecto de la luz ultravioleta, la FB1 disminuye a 3.13 ppm a partir de un contenido inicial de 5.08 ppm (control) y continúa su caída. A partir del tiempo 120 min su valor oscila alrededor de cero logrando una reducción del 97% del contenido inicial de FB1; la Tabla 7 muestra que la FB2 desde concentración inicial (control) hasta $t = 90$ min disminuye en un 95.9%, a partir de este tiempo la concentración de FB2 oscila alrededor de cero, en la Figura 8 se observa el comportamiento que siguen ambas fumonisinas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 7. Degradación que causa la radiación ultravioleta en estándares de fumonisinas B1 y B2

Tiempo (min)	Concentración (ppm) ^a		Disminución (%)	
	FB1	FB2	FB1	FB2
Control	5.08 ± 0.44	2.93 ± 0.61	-----	-----
30	3.13 ± 0.03	0.78 ± 0.04	38.39	73.38
60	1.10 ± 0.05	0.35 ± 0.05	78.35	88.05
90	1.51 ± 0.20	0.12 ± 0.07	70.28	95.90
120	0.13 ± 0.03	0.24 ± 0.05	97.44	91.81
240	0.04 ± 0.02	0.00 ± 0.00	99.21	100.00
360	0.16 ± 0.04	0.00 ± 0.00	96.85	100.00
480	0.33 ± 0.06	0.08 ± 0.02	93.50	97.27

^a Cada valor es el promedio de al menos tres determinaciones.

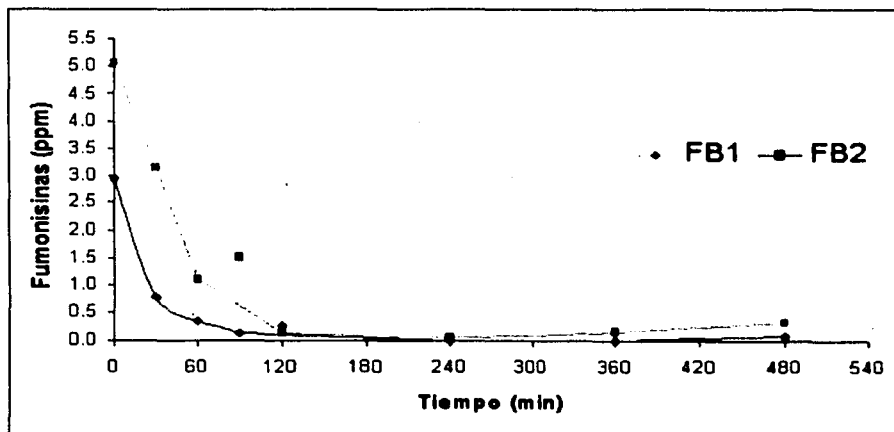


Figura 8. Comportamiento de fumonisinas B1 y B2 irradiadas con luz ultravioleta. Los datos correspondientes a los tiempos de 90 min para FB1 y 120 min para FB2 no se tomaron en cuenta para la línea de tendencia del gráfico.

No se observa un incremento progresivo en el área de ningún otro pico de los cromatogramas a medida que se van degradando las fumonisinas B1 y B2 por la radiación ultravioleta (Figuras 5 y 6 del anexo I).

Los anteriores resultados nos indican que ambos estándares de fumonisinas B1 y B2, se afectan al ser expuestos a radiación ultravioleta ($\lambda < 380$ nm), por lo que se esperaba que al someter las harinas de maíz a un tratamiento similar la luz ultravioleta afectara a las moléculas de FB1 y FB2 presentes en harina de maíz.

4.2 Efecto del TiO_2 como formador de radicales en la degradación de fumonisinas B1 y B2 con radiación ultravioleta en harina de maíz y en harina de maíz suspendida en agua

Los experimentos anteriores permitieron demostrar que la radiación ultravioleta degrada a las fumonisinas y posiblemente esta degradación sea vía radicales la cual podría ser incrementada con TiO_2 (1.0 g por cada 100 g de harina) por lo que se probaron dos tratamientos de exposición a la luz ultravioleta: 120 minutos a $25 \pm 10^\circ C$ y 480 minutos a $90 \pm 10^\circ C$ ambos tratamientos con y sin TiO_2 , en los dos casos la radiación ultravioleta provocó mayor disminución del contenido de fumonisinas en el harina de maíz que se trató sin dióxido de titanio, esto puede deberse a que la radiación ultravioleta es absorbida por el TiO_2 lo que impide la interacción de la radiación con el harina de maíz ejerciendo así un efecto protector sobre las fumonisinas.

En el harina irradiada 120 minutos la disminución que se logra con dióxido de titanio para ambas fumonisinas es mínima, pero sin él se observa que la radiación ultravioleta afecta más a la FB2, sin embargo, cuando la irradiación se realiza sobre una harina de maíz suspendida en agua (25.0 g en 50.0 mL de agua) ocurre lo contrario, la muestra de harina de maíz suspendida en agua irradiada con luz ultravioleta durante 240 minutos en presencia de dióxido de titanio, disminuyó su contenido de FB1 un 30.05% y la suspensión irradiada sin dióxido de titanio un 19.59%, esto implica una diferencia de 10.46% debida al dióxido de titanio, el porcentaje de disminución de FB2 para la suspensión tratada con dióxido de titanio

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

es de 42.38% y para la muestra irradiada sin dióxido de titanio es de 23.53%, la diferencia es de 18.85% (Tabla 8) este mismo efecto es el que presentó la fumonisina B1 sólo que en mayor grado, indicando que el dióxido de titanio al promover la formación de radicales hidroxilo en medio acuoso logra mayor degradación de las fumonisinas, la diferencia entre FB1 y FB2 es solo un hidroxilo en el carbono 10 por lo que la FB1 es más polar que la FB2 y por lo tanto sería más soluble en agua que la FB2, esto quiere decir que la FB1 se encuentra rodeada por más moléculas de agua que la FB2, siendo la FB2 la más expuesta a moléculas diferentes al agua; el dióxido de titanio favorece la formación de radicales hidroxilo en medio acuoso y la polaridad de esta especie es menor a la del agua por lo que estos radicales atacan preferentemente a la FB2 por tener más accesibilidad a ésta.

Tabla 8. Efecto que tiene la presencia de TiO_2 al irradiar con luz ultravioleta harina de maíz

Muestra	Tratamiento	Disminución FB1 (%)		Disminución FB2 (%)	
		sin TiO_2	con TiO_2	sin TiO_2	con TiO_2
4	120 min a $25 \pm 10^\circ\text{C}$	2.08	0.89	3.58	0.51
10	480 min a $90 \pm 10^\circ\text{C}$	45.56	31.51	56.92	45.90
12	240 min suspendida en agua a $25 \pm 10^\circ\text{C}$	19.59	30.05	23.53	42.38

Comparando el cromatograma de una muestra de harina no tratada con el de una muestra tratada por 480 minutos con y sin TiO_2 se observa la disminución en el área de los picos de las fumonisinas (Figura 9) esto mismo sucedió en los cromatogramas de los extractos de las harinas suspendidas en agua (Figura 10).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

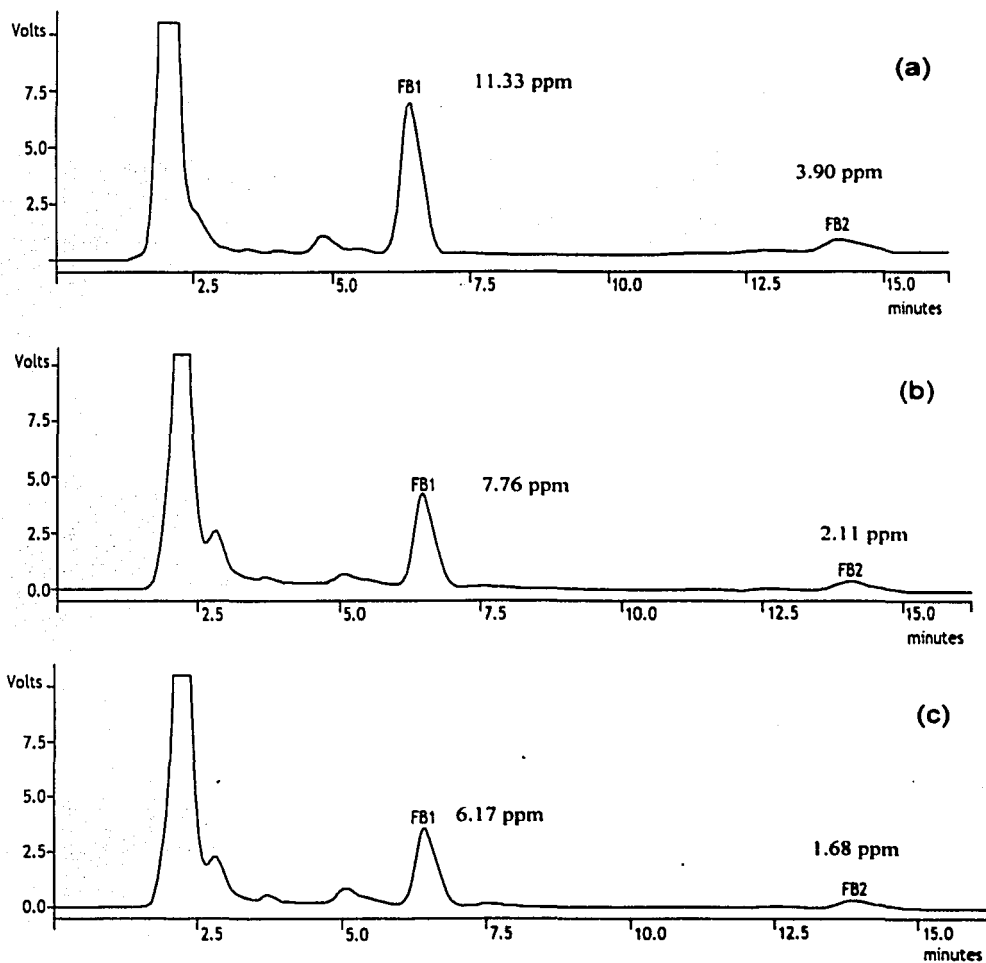


Figura 9. Resultados de la cromatografía de líquidos de extractos de harina de maíz. (a) Cromatograma de harina de maíz control, (b) Cromatograma de harina de maíz tratada con radiación ultravioleta en presencia de TiO₂ durante 480 minutos a 90 ± 10°C, (c) Cromatograma de harina de maíz tratada con radiación ultravioleta sin TiO₂ durante 480 minutos a 90 ± 10°C.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

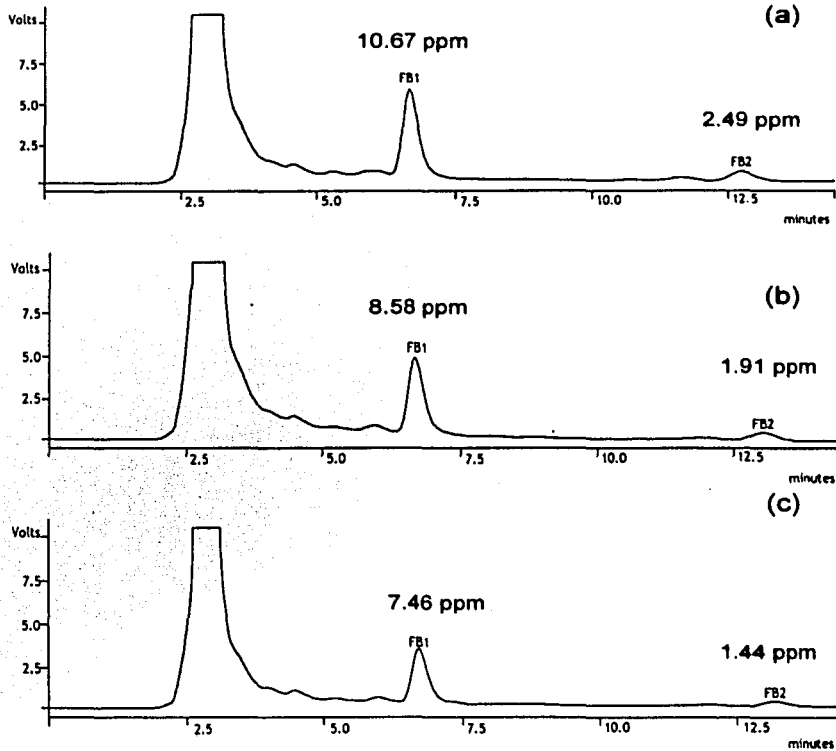


Figura 10. Resultados de la cromatografía de líquidos de extractos de harina de maíz suspendida en agua. (a) Control, (b) Después de recibir un tratamiento de radiación ultravioleta sin TiO₂ durante 240 minutos a $25 \pm 10^\circ\text{C}$, (c) Después de recibir un tratamiento de radiación ultravioleta con TiO₂ durante 240 minutos a $25 \pm 10^\circ\text{C}$.

4.3 Harina de maíz tratada con radiación ultravioleta a diferentes tiempos y temperaturas.

Se realizó la cuantificación por HPLC de las fumonisinas B1 y B2 presentes en harina de maíz expuesta a radiación ultravioleta por tiempos de 120, 240, 360 y 480 minutos a

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

temperaturas de 25, 60 y 90 ± 10°C, empleando la muestra de harina de maíz número 10 sin adicionar dióxido de titanio ya que los anteriores resultados indican que al irradiar harinas, el dióxido de titanio obstaculiza el efecto de la radiación. Los resultados indican que el comportamiento que siguen las concentraciones de las fumonisinas B1 y B2 en la muestra de harina de maíz con respecto al tiempo de exposición a la radiación ultravioleta para las tres temperaturas es muy similar, a los primeros 120 minutos se ve una disminución significativa y a los tiempos de 240, 360 y 480 minutos se observan variaciones no significativas entre los datos a las tres temperaturas (Figura 11 y Tabla 9), de acuerdo con el análisis estadístico MLG no existe diferencia significativa en el contenido de fumonisinas a cualquiera de las temperaturas probadas, sin embargo, los tiempos probados sí generan cambios significativos en el contenido de fumonisinas (Tablas de la 3 a la 6 del anexo I), el MLG hace promedio de todos los puntos a una misma temperatura y los compara con los promedios de las otras temperaturas, por lo que no es capaz de identificar diferencias en cada uno de los tiempos probados, haciendo un MLG para cada tiempo se obtiene que los contenidos de fumonisinas B1 y B2 son significativamente menores a la temperatura de 90°C en los tiempos de 120, 360 y 480 minutos, esto posiblemente se deba que la temperatura acelera las reacciones involucradas en la degradación de las fumonisinas.

Tabla 9. Cuantificación de FB1 y FB2 por HPLC en un extracto metanol-agua de harina de maíz (muestra 10) tratada con radiación ultravioleta

Tiempo de exposición (minutos)	25°C		60°C		90°C	
	FB1 (ppm) ^a	FB2 (ppm) ^a	FB1 (ppm) ^a	FB2 (ppm) ^a	FB1 (ppm) ^a	FB2 (ppm) ^a
Control	11.76 ± 1.2	4.08 ± 0.4	11.76 ± 1.2	4.08 ± 0.4	11.76 ± 1.2	4.08 ± 0.4
120	7.85 ± 0.8	2.31 ± 0.2	7.13 ± 0.7	2.11 ± 0.2	5.88 ± 0.6	1.75 ± 0.2
240	8.77 ± 0.9	2.02 ± 0.2	6.84 ± 0.7	1.86 ± 0.2	7.80 ± 0.8	2.25 ± 0.2
360	8.93 ± 0.9	2.19 ± 0.2	8.39 ± 0.8	2.46 ± 0.2	6.79 ± 0.7	1.96 ± 0.2
480	8.78 ± 0.9	2.29 ± 0.2	8.02 ± 0.8	2.29 ± 0.2	6.04 ± 0.6	1.63 ± 0.2

^a Cada valor es el promedio de al menos tres determinaciones

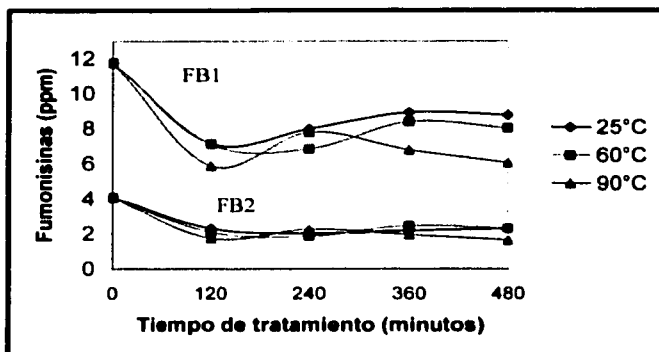


Figura 11. Comportamiento de FB1 y FB2 en harina de maíz (muestra 10) frente a la radiación UV.

La disminución de fumonisinas en cada tratamiento es mayor para la FB2 que para la FB1, por ejemplo al exponer harina de maíz a la radiación ultravioleta por 480 minutos a $25 \pm 10^\circ\text{C}$ la FB2 disminuye su contenido inicial en un 44%, mientras que la FB1 solamente disminuye 25.37% (Tabla 10).

Tabla 10. Disminución de FB1 y FB2 en harina de maíz (muestra 10) tratada con radiación ultravioleta a diferentes temperaturas

Tiempo (minutos)	Disminución FB1 (%)			Disminución FB2 (%)		
	a 25°C	a 60°C	a 90°C	a 25°C	a 60°C	a 90°C
Control	-----	-----	-----	-----	-----	-----
120	33.28	39.41	50.04	43.30	48.37	57.11
240	25.41	41.86	33.68	50.39	54.41	44.77
360	24.07	28.67	42.27	46.45	39.71	52.04
480	25.37	31.83	48.62	44.00	43.93	60.05

Para corroborar que los anteriores resultados describen el comportamiento de las fumonisinas en harina de maíz cuando es expuesta a radiación ultravioleta se realizó el mismo experimento con una harina de maíz de diferente composición, esta harina identificada como muestra 7 presentó un comportamiento similar al que se observó para las fumonisinas de la harina muestra 10, en donde el contenido de fumonisinas disminuye-

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

aumenta-disminuye pero en este caso el comportamiento se realiza en más tiempo los resultados del contenido de fumonisinas se resumen en la Tabla 11 y Figura 12. En la muestra 7 la FB2 se ve más afectada por la radiación ultravioleta que la FB1 lo que coincide con el resultado de la muestra 10, como se puede observar en la Tabla 12.

Tabla 11. Cuantificación de FB1 y FB2 por HPLC en un extracto metanol-agua de harina de maíz (muestra 7) tratada con radiación ultravioleta

Tiempo de exposición (minutos)	25°C		60°C		90°C	
	FB1 (ppm) ^a	FB2 (ppm) ^a	FB1 (ppm) ^a	FB2 (ppm) ^a	FB1 (ppm) ^a	FB2 (ppm) ^a
Control	9.51±0.9	3.51±0.3	9.51±0.9	3.51±0.3	9.51±0.9	3.51±0.3
120	9.21±0.9	2.40±0.2	8.63±0.9	2.45±0.2	7.62±0.8	2.27±0.2
240	6.61±0.7	1.72±0.2	6.39±0.6	1.84±0.2	4.68±0.5	0.86±0.1
360	5.78±0.6	1.35±0.1	7.34±0.7	2.23±0.2	5.32±0.5	1.40±0.1
480	6.76±0.7	1.69±0.2			4.55±0.4	1.35±0.1

^a Cada valor es el promedio de al menos tres determinaciones

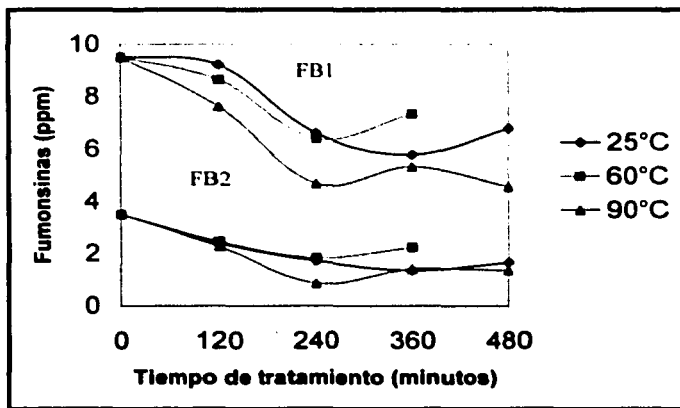


Figura 12. Comportamiento de las fumonisinas B1 y B2 en harina de maíz (muestra 7) frente a la radiación ultravioleta.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 12. Disminución de FB1 y FB2 en harina de maíz (muestra 7) tratada con radiación ultravioleta a diferentes temperaturas

Tiempo (minutos)	Disminución FB1 (%)			Disminución FB2 (%)		
	a 25°C	a 60°C	a 90°C	a 25°C	a 60°C	A 90°C
Control	-----	-----	-----	-----	-----	-----
120	3.175	9.255	19.89	31.8	30.3	35.2
240	30.54	32.79	50.8	50.9	47.6	75.6
360	39.27	22.89	44.07	61.5	36.5	60
480	28.72		52.21	51.9		61.5

Se realizó para este experimento un análisis estadístico, el cual concluye que no hay diferencia significativa entre los tratamientos realizados a las diferentes temperaturas empleadas y que sí hay diferencia entre los tiempos de radiación experimentados (Tablas de la 7 a la 10 del anexo I), sin embargo, el análisis MLG para cada tiempo de tratamiento indica que a la temperatura de 90°C el contenido de fumonisina B1 es significativamente menor al de las otras dos temperaturas a los tiempos de 240 y 480 minutos, para la FB2 la temperatura de 90°C tiene un contenido de fumonisina significativamente menor al de los tratamientos de 25 y 60°C al tiempo 240 minutos.

Las razones por las que la concentración de fumonisinas no tienen una disminución constante en el comportamiento estudiado posiblemente se deba a la complejidad de la matriz alimenticia, en donde los factores que podrían intervenir son la degradación de la matriz, favoreciendo su extracción y provocando los incrementos observados en el comportamiento, mientras que las disminuciones del mismo pueden ser originadas por los efectos indirectos de la radiación mediante radicales generados a partir de grasas o efectos directos de la radiación sobre las fumonisinas.

Haciendo una comparación de la composición de la muestra 10 con la de la muestra 7 se observa que la muestra 10 tiene un contenido de grasa de 7.02% en base seca (BS) y la muestra 7 tiene 4.05% de grasa BS (ver Tabla 5), esta diferencia en la composición de las muestras muy posiblemente sea la razón por la cual el punto mínimo de concentración alcanzada con el tratamiento es a 120 minutos en el caso de la muestra 10 y a 240 minutos en la muestra 7, suponemos que la grasa es la razón de estas diferencias por su reactividad

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

relacionada con la radiación ultravioleta, por lo que posiblemente la grasa acorta el tiempo en que aparece la primera disminución. Si el contenido de grasa afecta de manera proporcional al efecto de la radiación se esperarí una disminución más lenta en una harina con menos grasa para un mismo tiempo de tratamiento a una temperatura dada. Esto se pudo comprobar al observar el comportamiento que mostró la harina muestra 4 (2.62% grasa BS Tabla 5) al ser irradiada por 120 minutos a una temperatura de $25 \pm 10^\circ\text{C}$, el porcentaje de disminución que alcanzó en 120 minutos fue de 0.89% para FB1 y 0.51% para FB2, el contenido de fumonisinas permaneció casi constante, mientras que las harinas con mayor contenido de grasa mostraron una mayor degradación de las fumonisinas, como se puede ver en la Tabla 13.

Tabla 13. Disminución en el contenido de fumonisinas B1 y B2 después de 120 minutos de tratamiento de irradiación con luz ultravioleta a $25 \pm 10^\circ\text{C}$ en harinas de maíz con diferente contenido grasa

Muestra	Grasa BS (%)	Disminución (%)	
		FB1	FB2
10	7.02	33.28	43.30
7	4.05	3.15	31.62
4	2.62	0.89	0.51

4.4 Comportamiento de estándar de FB1 irradiado con gamma

Al someter fumonisina B1 a radiación gamma se observó que a mayor dosis de radiación gamma se da una mayor disminución en el contenido de FB1 hasta llegar a la dosis de 10 KGy (3.15 ppm Tabla 14), a partir de la cual no se observó cambio notable en el contenido de FB1 (Figura 13).

Posteriormente se irradiaron 0.347 mg de FB1 sólida a una dosis de 15 KGy (7.21 hrs). Después de irradiado el estándar sólido se resuspendió en 4 mL de metanol debiendo de dar una concentración de 86.75 ppm, la concentración determinada después del tratamiento fue 22.84 ppm lo cual representa apenas el 26.33% de la concentración esperada, esto implica que la radiación a 15 KGy provoca una disminución del 73.67%, lo

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

que coincide con la disminución obtenida en el experimento anterior. El irradiar una cantidad visible de fumonisina B1 sirvió para observar los cambios físicos provocados por la radiación, se observó que antes de ser irradiada la fumonisina era de color blanco opaco y después del tratamiento era translúcida.

Tabla 14. Efecto de la radiación gamma en estándares de FB1

Dosis (KGy)	Concentración (ppm) ^a	Disminución (%)
0	7.73	0.00
2	4.29	44.46
4	5.17	33.16
6	4.47	42.13
8	4.71	39.11
10	3.15	59.21
12	5.59	27.73
14	3.17	59.03

^a Cada valor es el promedio de al menos tres repeticiones

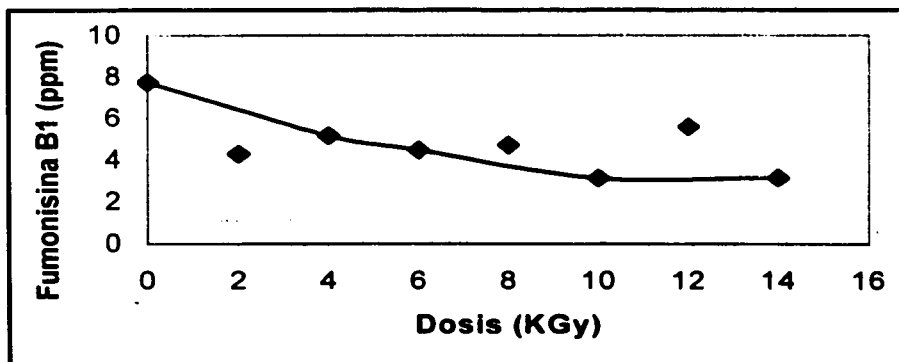


Figura 13. Comportamiento de Fumonisina B1 irradiada con radiación gamma. Los datos de 2, 8 y 12 KGy no se tomaron en cuenta para la línea de tendencia.

Las radiaciones ionizantes empleadas no producen los hidrolizados de las fumonisinas (HFB1 y HFB2) ni los hidrolizados parciales (PHFB1 y PHFB2), ya que ninguno de estos compuestos aparecen en los cromatogramas de los estándares irradiados con UV (Figuras 5 y 6 del anexo I) y tampoco en los tratados con radiación gamma (Figura 7 del anexo I).

4.5 Espectros de masas de estándares de fumonisina B1

La fumonisina B1 se analizó mediante espectrometría de masas por la técnica bombardeo por átomos rápidos (FAB), en esta técnica las muestras se introducen al espectrómetro de masas en alcohol nitrobenílico y sus fragmentos aparecen en todos los espectros, los principales fragmentos del alcohol nitrobenílico son: 154, 136 y 307 m/z (Figura 15 a).

El espectro de masas de un estándar de FB1 (Figura 15 b y c) presenta los fragmentos 1426, 722, 704, 678, 633, 586, 564, 546 y 44 m/z. El fragmento 1426 m/z corresponde a un dímero de fumonisina B1, el peso molecular de la fumonisina B1 es de 721.84 g/mol y en el espectro se observa un ión con 722 m/z, el fragmento 704 m/z posiblemente corresponda al anhídrido de ácido de uno de los ácidos tricarbóxicos de la fumonisina, los fragmentos 678, 633, 586, 546 posiblemente corresponden a la fumonisina que ha sufrido cuatro descarboxilaciones sucesivas lo que generaría CO₂, el fragmento 44 m/z confirma que la ionización genera descarboxilaciones en la fumonisina, el fragmento 564 m/z corresponde a la FB1 parcialmente hidrolizada (PHFB1), el fragmento de 546 m/z también podría corresponder a la PHFB1 menos la masa del agua, esto sugiere la formación de un anhídrido de ácido en el ácido tricarbóxico que conserva la PHFB1, todos estos fragmentos se observan en la Figura 14.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

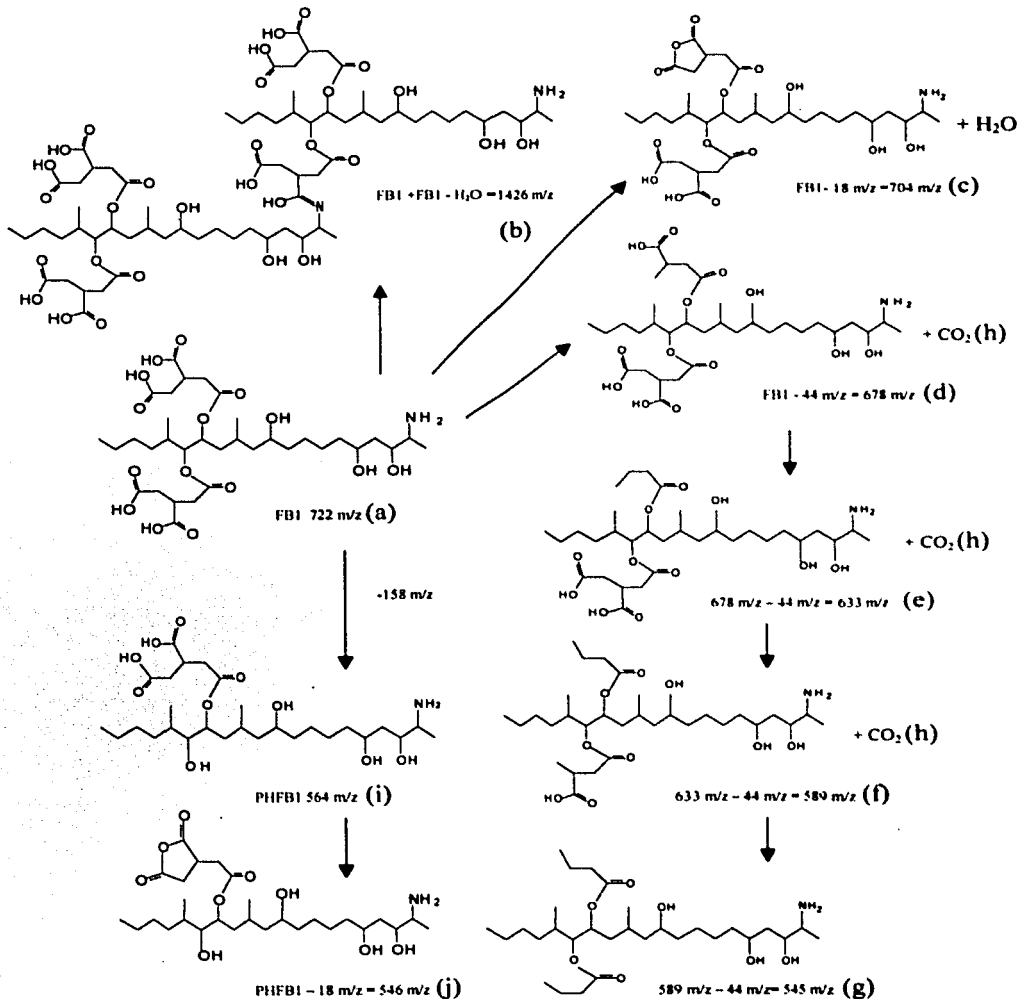


Figura 14. Estructuras probables de los fragmentos formados en la ionización del análisis de masas (FAB) de fumonisina B1. (a) fumonisina B1, 722 m/z; (b) dímero de fumonisina B1, 1426 m/z; (c) anhídrido de ácido de uno de los ácidos tricarbóxicos de la fumonisina, 704 m/z; (d, e, f, g) fumonisina que ha sufrido cuatro descarboxilaciones sucesivas, 678, 633, 586, 546 m/z; (h) CO₂, 44 m/z; (i) FB1 parcialmente hidrolizada (PHFB1), 564 m/z; (j) anhídrido de ácido en el ácido tricarbóxico de la PHFB1, 546 m/z.

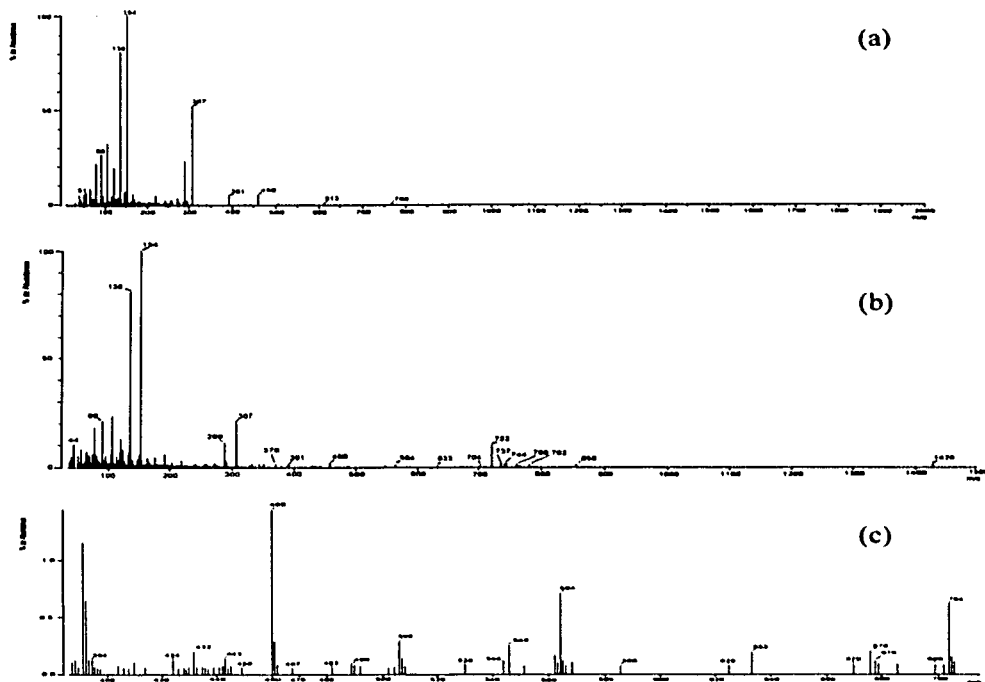


Figura 15. Espectros de masas (a) Alcohol nitrobenílico; (b) Estándar de FB1; (c) Acercamiento a los fragmentos de 390 a 710 m/z del estándar de FB1.

La fumonisina B1 fue irradiada con 15 KGy de radiación gamma, después de este tratamiento se realizó un análisis de espectrometría de masas (Figura 16) en el que se observan los fragmentos que se generan durante la ionización de las moléculas que se formaron durante el tratamiento de irradiación gamma, este espectro de masas al tener fragmentos diferentes a los que se observaron en la FB1 no irradiada indica que la radiación gamma modifica la estructura de la fumonisina, los fragmentos que aparecen después del tratamiento con radiación gamma son: 551, 561, 579, 591, 635, 640, 656, 684, 691 y 751 m/z. Ya que el espectro de masas es de una mezcla formada por la fumonisina que no sufrió

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

cambio por la radiación gamma y por los productos del tratamiento de irradiación, es difícil proponer la molécula que corresponde a cada una de estas señales.

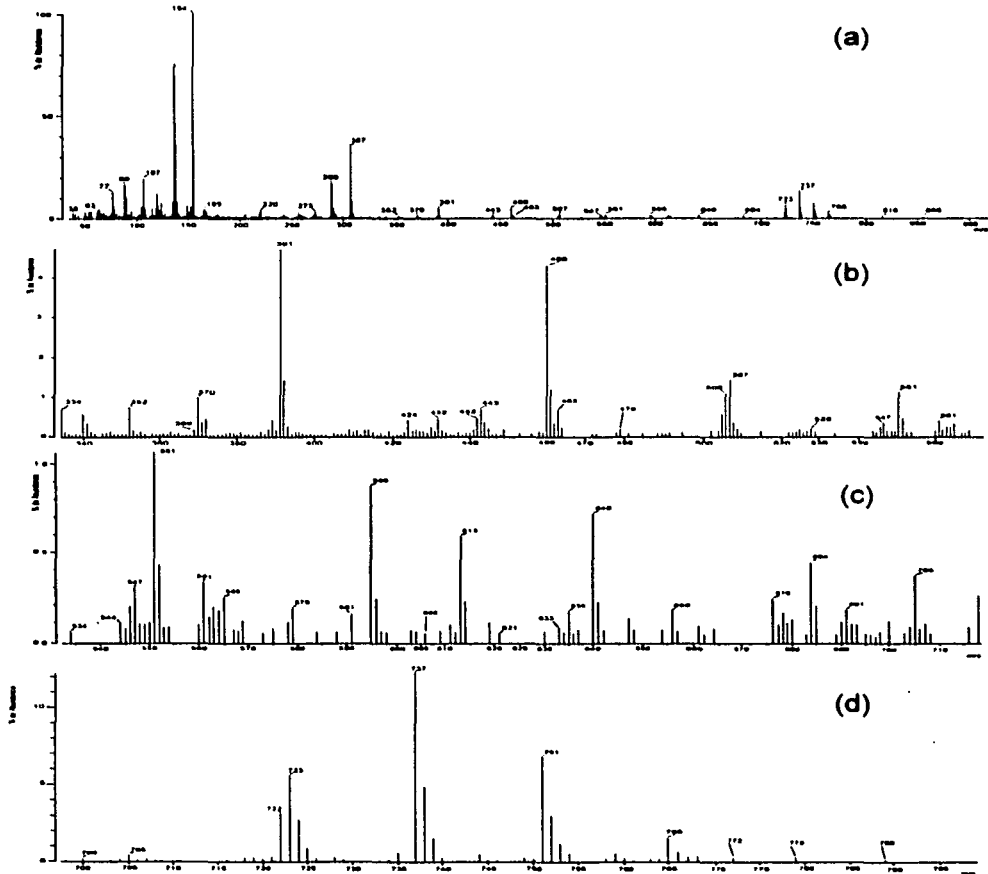


Figura 16. Espectro de masas de un estándar de FB1 irradiado con 15 KGy en diferentes regiones. (a) intervalo de 39 a 900 m/z; (b) de 334 a 565 m/z; (c) de 535 a 710 m/z; (d) de 700 a 795 m/z.

4.6 Degradación de las fumonisinas B1 y B2 presentes en harina de maíz mediante radiación gamma en presencia y ausencia de dióxido de titanio

El experimento anterior indica que la radiación gamma afecta a la fumonisina B1 y se consideró que lo mismo sucede con la FB2 dada su similitud, por lo que se trataron dos harinas de maíz con radiación gamma, los resultados se resumen en las Tablas 15 y 16, así mismo se observa su comportamiento en las Figuras 17 y 18 en las que se aprecia que para FB1 y FB2 no hay diferencia significativa en los resultados al irradiar en presencia de dióxido de titanio (1.0 g por cada 100 g de harina) o en su ausencia (Tablas 11, 13, 15 y 17 del anexo I), esto se puede deber a que el dióxido de titanio no absorbe a la longitud de onda de la radiación gamma, los comportamientos de las fumonisinas en la muestra 10 presentan un incremento a la dosis de 15 KGy a diferencia de la muestra 4 que presenta una disminución continua, esta diferencia en el comportamiento seguramente es debida a la composición de cada una de las harinas de maíz, sin embargo, el comportamiento de FB1 y de FB2 es el mismo en ambas muestras, seguramente por que el efecto directo o indirecto de la radiación gamma que afecta a las fumonisinas lo hace mediante la reacción de un grupo funcional común de su estructura. Realizando las pruebas estadísticas MLG y la prueba de Duncan se encontró que las dosis de radiación probadas causan diferencia significativa en el contenido de fumonisinas en ambas harinas (Tablas de la 11 a la 18 del anexo I).

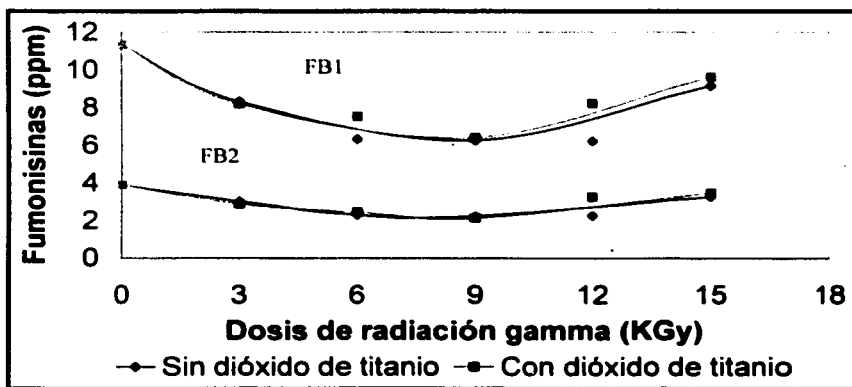


Figura 17. Comportamiento de las fumonisinas B1 y B2 en harina de maíz (muestra 10) al exponerlas a la irradiación gamma en presencia y ausencia de dióxido de titanio. Los datos de 6 KGy para FB1 y 12 KGy para FB1 y FB2 no se tomaron en cuenta para las líneas de tendencia.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 15. Efecto de degradación de la irradiación gamma en presencia y ausencia de dióxido de titanio sobre las fumonisinas presentes en harina de maíz (muestra 10)

Dosis en (KGy)	Sin TiO ₂		Con TiO ₂		Sin TiO ₂		Con TiO ₂	
	FB1 (ppm) ^a	Disminución (%)	FB1 (ppm) ^a	Disminución (%)	FB2 (ppm) ^a	Disminución (%)	FB2 (ppm) ^a	Disminución (%)
Control	11.33 ± 1.1	----	11.33 ± 1.1	----	3.90 ± 0.4	----	3.90 ± 0.4	----
3	8.32 ± 0.8	26.57	8.19 ± 0.8	27.71	3.03 ± 0.3	22.39	2.90 ± 0.3	25.64
6	6.32 ± 0.6	44.22	7.53 ± 0.7	33.54	2.30 ± 0.2	41.03	2.45 ± 0.2	37.24
9	6.26 ± 0.6	44.75	6.41 ± 0.6	43.42	2.23 ± 0.2	42.82	2.14 ± 0.2	45.26
12	6.22 ± 0.6	45.10	8.23 ± 0.8	27.36	2.27 ± 0.2	41.79	3.27 ± 0.3	16.15
15	9.17 ± 0.9	19.06	9.64 ± 1.0	14.89	3.30 ± 0.3	15.38	3.49 ± 0.3	10.43

^a Cada valor es el promedio de al menos tres repeticiones.

Tabla 16. Degradación de las fumonisinas presentes en harina de maíz (muestra 4) por la radiación gamma con y sin dióxido de titanio

Dosis en (KGy)	Sin TiO ₂		Con TiO ₂		Sin TiO ₂		Con TiO ₂	
	FB1 (ppm) ^a	Disminución (%)	FB1 (ppm) ^a	Disminución (%)	FB2 (ppm) ^a	Disminución (%)	FB2 (ppm) ^a	Disminución (%)
Control	4.34 ± 0.4	----	4.34 ± 0.3	----	1.60 ± 0.2	----	1.60 ± 0.2	----
3	4.37 ± 0.4	0.00	3.29 ± 0.3	24.19	1.66 ± 0.2	0.00	1.29 ± 0.1	19.38
6	3.71 ± 0.4	14.52	3.42 ± 0.3	21.20	1.47 ± 0.1	8.13	1.31 ± 0.1	18.13
9	3.58 ± 0.4	17.51	3.39 ± 0.3	21.89	1.30 ± 0.1	18.75	1.23 ± 0.1	23.13
12	2.98 ± 0.3	31.34	2.77 ± 0.3	36.18	1.13 ± 0.1	29.38	1.05 ± 0.1	34.38
15	2.78 ± 0.3	35.94	2.62 ± 0.3	39.63	0.96 ± 0.1	40.00	0.97 ± 0.1	39.38

^a Cada valor es el promedio de al menos tres replicas.

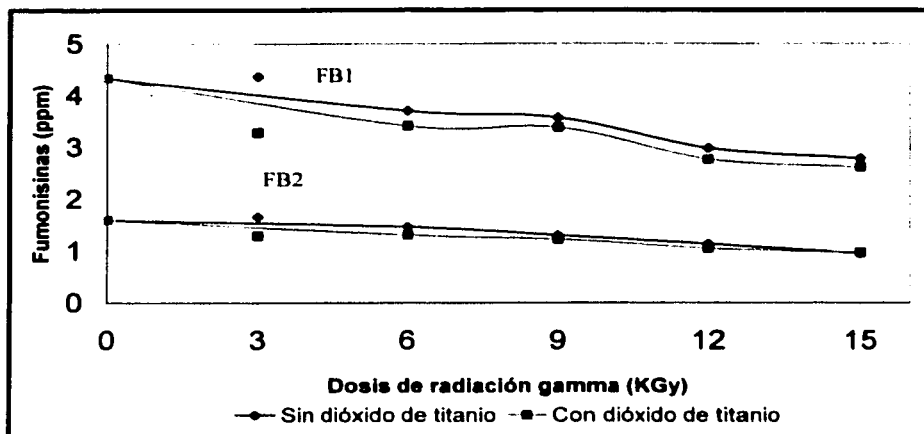


Figura 18. Degradación de las fumonisinas presentes en harina de maíz (muestra 4) al exponerlas a la irradiación gamma en presencia y ausencia de dióxido de titanio. Los datos de 3 KGy no se tomaron en cuenta para la línea de tendencia.

Los resultados de la cuantificación de fumonisinas por HPLC en la harina de maíz (muestra 10) tratada con 9 KGy en presencia y en ausencia de TiO_2 muestran como disminuye el área de los picos correspondientes a las fumonisinas B1 y B2 y que esta disminución es prácticamente la misma en ambos tratamientos (Figura 19).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

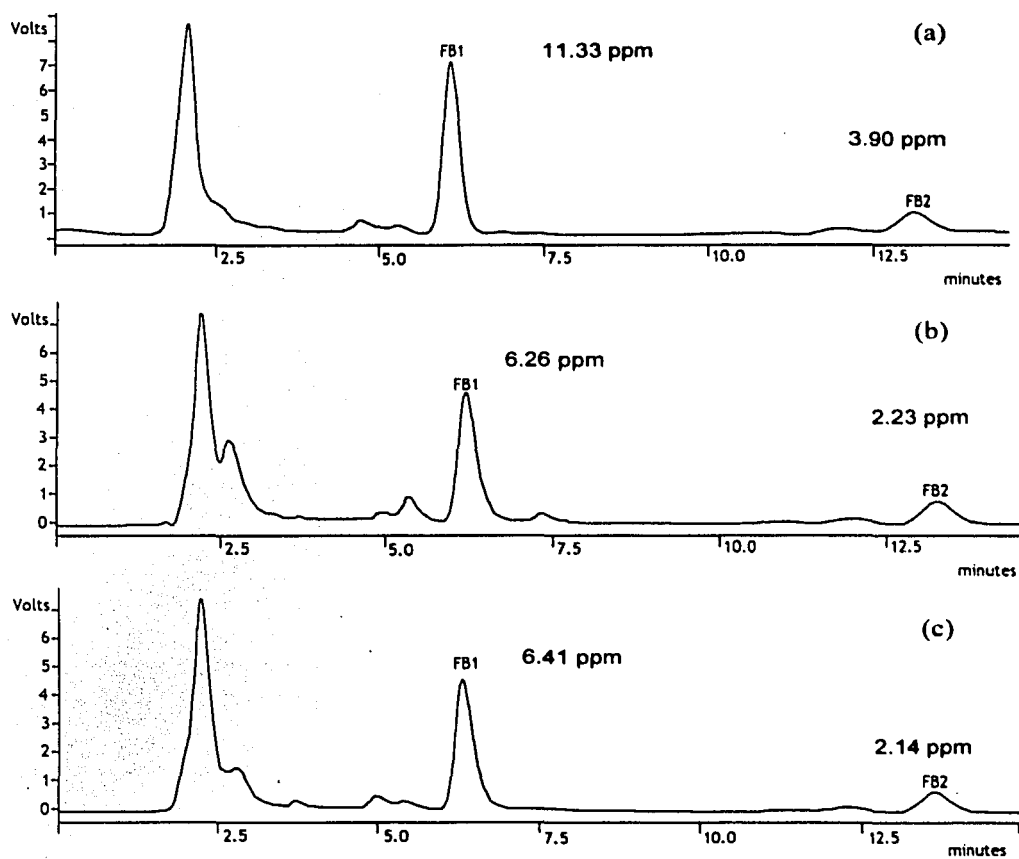


Figura 19. Efecto del dióxido de titanio en la degradación de fumonisinas con radiación gamma (9 KGy), sobre una harina de maíz (muestra 10). (a) Cromatograma de un extracto de harina de maíz sin tratamiento; (b) Cromatograma de un extracto de harina de maíz después de recibir un tratamiento de radiación gamma sin TiO₂; (c) Cromatograma de un extracto de harina de maíz después de recibir un tratamiento de radiación gamma con TiO₂.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De los extractos que sirvieron para la cuantificación de las fumonisinas B1 y B2, se analizaron por espectrometría de masas los correspondientes a el harina no tratada y la que recibió un tratamiento de 15 KGy, ambos de la muestra 10, en el espectro del harina que no recibió tratamiento (Figura 20 a) se observan señales a relaciones m/z superiores a 1000 m/z , esto puede deberse a que en el extracto están presentes compuestos propios del maíz, tales como, grasas, proteínas, carbohidratos, entre otros algunos de ellos con altos pesos moleculares. De la misma manera se realizó la extracción y purificación de las fumonisinas en harina de maíz irradiada a 15 KGy, y se analizó mediante espectrometría de masas (Figura 20 b). Comparando el espectro de un extracto de harina de maíz no tratada con el espectro del extracto del harina irradiada se observa que en este último no se encuentran señales arriba de 1000 m/z posiblemente por que la radiación rompió las moléculas de alto peso molecular dando compuestos de menor peso, esto es una evidencia de que la radiación gamma a una dosis de 15 KGy afecta a los componentes del maíz. Pese a la gran variedad de señales en el espectro de masas que dificultan la identificación de las señales, se alcanzan a observar los fragmentos 706 y 722 que podrían corresponder a las fumonisinas FB2 y FB1 respectivamente, sin embargo, cabe la posibilidad de que sean productos de la ionización de moléculas ajenas a las fumonisinas que hayan sido extraídas junto con ellas.

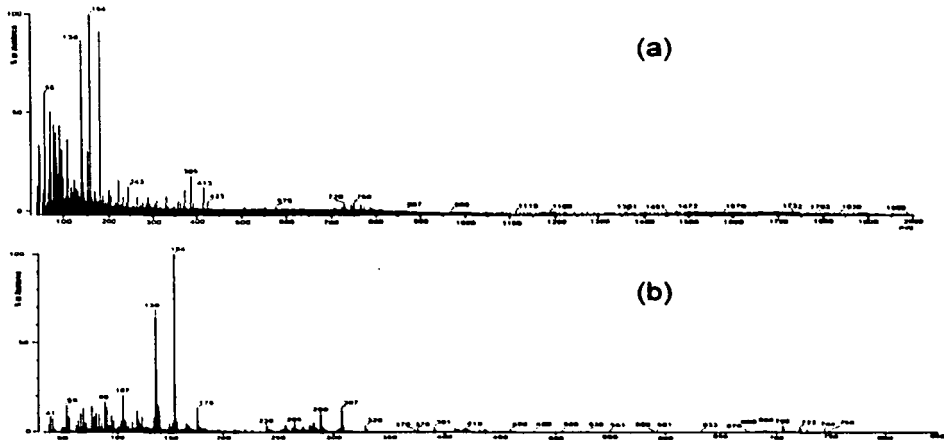


Figura 20. Espectro de masas de un extracto metanol-agua de harina de maíz (a) sin tratamiento de irradiación gamma; (b) tratada con radiación gamma (15 KGy).

4.7 Comparación de los tratamientos realizados con radiación ultravioleta y gamma

Comparando los efectos de degradación de las fumonisinas B1 y B2 que logran las radiaciones gamma con las de ultravioleta para las condiciones en las que se irradiaron las muestras, se observa que tarda el mismo tiempo en lograrse un mismo efecto, como lo muestra la Figura 21, el análisis estadístico (GLM) indica que no hay diferencia significativa entre los dos tipos de radiaciones empleadas para disminuir los niveles de fumonisinas en harina de maíz (Tablas 19 y 20 del anexo I), sin embargo, el mecanismo por el cual se obtiene este efecto muy posiblemente no sea el mismo ya que ambas radiaciones difieren en penetrabilidad y energía asociada, se observa en la Figura 21 que las fumonisinas frente a la radiación ultravioleta y frente a la radiación gamma durante una cantidad de tiempo similar se afectan en la misma proporción, por ejemplo, para FB1 la disminución que logran (12 KGy a una tasa de dosis de 2.056 KGy/hr) 350 minutos dentro del irradiador gamma beam es de 27.36%. muy similar a la que logran 360 minutos frente a la lámpara de luz ultravioleta de 100 watts que es de 24.06% (Tabla 17).

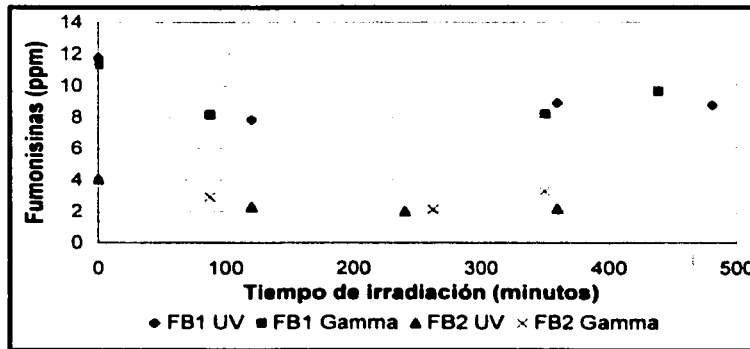


Figura 21. Comparación de la degradación lograda por la radiación gamma con la que logra la radiación ultravioleta sobre las fumonisinas B1 y B2 en harina de maíz (muestra 10).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 17. Resultados de la degradación de las fumonisinas B1 y B2 por la radiación gamma y por la radiación ultravioleta en harina de maíz (muestra 10)

FB1						FB2					
Gamma			Ultravioleta			Gamma			Ultravioleta		
TIEMPO (minutos)	(ppm) ^a	Disminución (%)	TIEMPO (minutos)	(ppm) ^a	Disminución (%)	TIEMPO (minutos)	(ppm) ^a	Disminución (%)	TIEMPO (minutos)	(ppm) ^a	Disminución (%)
Control	11.33	-----	Control	11.76	-----	Control	3.90	-----	Control	4.08	-----
88	8.19	27.71	120	7.85	33.28	88	2.90	25.64	120	2.31	43.30
175	7.53	33.54				175	2.45	37.24			
263	6.41	43.42	240	8.77	25.40	263	2.14	45.26	240	2.02	50.39
350	8.23	27.36	360	8.93	24.06	350	3.27	16.15	360	2.19	46.45
438	9.64	14.89	480	8.78	25.36	438	3.49	10.43	480	2.29	44.00

^a Cada valor es el promedio de al menos tres determinaciones.

A pesar de las similitudes observadas en la disminución en el contenido de fumonisinas por ambas radiaciones, hay diferencias entre estas dos formas de disminuir el contenido de fumonisinas, ya que en el tratamiento con luz ultravioleta sólo se puede tratar una muestra de 25 g a la vez, mientras que en el caso de la irradiación gamma es posible irradiar grandes cantidades de muestra (toneladas) pero es más costoso al inicio y requiere de un técnico especializado, además de que la radiación gamma por ser de mayor penetrabilidad puede causar más cambios a la composición del alimento que la radiación ultravioleta.

CAPITULO 5
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- ❖ La radiación ultravioleta ($\lambda < 380$ nm) provoca una disminución de 38.39% y 73.38% de la concentración de estándares de FB1 y FB2 respectivamente después de 30 minutos de irradiación.
- ❖ El tiempo de exposición de harina de maíz a la radiación ultravioleta ($\lambda < 380$ nm) es un factor que tiene efecto significativo en la reducción de fumonisinas.
- ❖ Cuando la irradiación ultravioleta ($\lambda < 380$ nm) se realiza sobre harina de maíz, no hay diferencia significativa en la reducción de las fumonisinas al realizar el tratamiento a las temperaturas de 25 y $60 \pm 10^\circ\text{C}$.
- ❖ En la irradiación de harina de maíz con ultravioleta ($\lambda < 380$ nm), a los tiempos 120, 360 y 480 minutos el tratamiento a $90 \pm 10^\circ\text{C}$ provoca mayor reducción en el contenido de fumonisinas que los tratamientos a 25 y $60 \pm 10^\circ\text{C}$.
- ❖ La magnitud del efecto de la luz ultravioleta aparentemente depende del contenido de grasa en la composición de la muestra, ya que se observa mayor efecto de reducción de fumonisinas en aquellas harinas que tienen mayor contenido de grasa.
- ❖ La irradiación con luz ultravioleta ($\lambda < 380$ nm) en harina de maíz suspendida en agua produce mayor reducción en el contenido de fumonisinas cuando se agrega dióxido de titanio, el efecto contrario ocurre cuando en el tratamiento no hay medio acuoso.
- ❖ En todos los tratamientos con luz ultravioleta ($\lambda < 380$ nm) se observó un mayor efecto de disminución sobre la fumonisina B2.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- ❖ La radiación gamma provoca una disminución de 59.03% de la concentración en un estándar de FB1 cuando recibe una dosis de 14 KGy (408 minutos a una tasa de dosis de 2.056 KGy/hrs).
- ❖ En el tratamiento de harina de maíz con radiación gamma no existe diferencia alguna cuando se irradia con o sin dióxido de titanio.
- ❖ En cristales puros de FB1, 15 KGy de radiación gamma provocan una pérdida del 73.67%.
- ❖ Para las condiciones en las que irradiamos harinas de maíz, tarda el mismo tiempo en lograrse un mismo efecto de disminución del contenido de fumonisinas ya sea irradiando con radiación gamma o con radiación ultravioleta.
- ❖ Es necesario realizar un estudio biológico para determinar la toxicidad del producto o productos que se generan durante la irradiación con ultravioleta o gamma empleada para la degradación de fumonisinas presentes en maíz
- ❖ Para determinar cual es mecanismo por el cual las radiaciones estudiadas afectan a las fumonisinas es necesario realizar estudios de RMN que permitan conocer la estructura del producto del tratamiento de irradiación así como cromatografía de gases o de líquidos acoplada a masas.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, H. K.; Mirocha, C. J.; Meronuk, R. A.; Pokorny, J. D.; Gould, S. L. & Kommedahl, T. 1988. Micotoxins and *Fusarium spp.* associated with infected ears of corn in Minnesota. *Applied and environmental microbiology*, **54**, 1930-1933.
- Alessenko, A. V. 1998. Review: functions of sphingosine in cell proliferation and death. *Biochemistry (Moscow)*, **63**, 62-75.
- Background paper in support of fumonisin levels in corn and corn products intended for human consumption. Executive summary of this scientific support document. U. S. Food and Drug Administration Center for Veterinary Medicine, 2001 (a).
- Background paper in support of fumonisin levels in animal feed. Executive summary of this scientific support document. U. S. Food and Drug Administration Center for Veterinary Medicine. 2001 (b).
- Bacon, C. W. & Nelson, I. P. E. 1994. Fumonisin production in corn by toxigenic strains of *Fusarium moliniforme* and *Fusarium proliferatum*. *J. Food Prot.*, **57**, 514-521.
- Bata, Á. & Radomir, L. 1999. Detoxification of mycotoxin-contaminated food and feed by microorganisms. *Trends in Food Science & Technology*, **10**, 223-228.
- Borrell, P. 1980. Fotoquímica. Editorial El manual moderno. México. p. 5-11.
- Bressani, R.; Paz y Paz, R. & Scrimshaw, N. S. 1958. Chemical changes in corn during preparation of tortillas. *J. Agric. Food Chem.*, **6**, 770-774.
- Bulleman, L. B. & Draughan, F. A. 1994. *Fusarium moliniforme* and *Fusarium symposium*. introduction. *J. Food Prot.*, **57**, 513.

- Caldas, E. D.; Jones, A. D.; Winter, C. K.; Ward, B. & Gilchrist, D. G. 1995. Electrospray ionization mass spectrometry of sphinganine analog mycotoxins. *Anal. Chem.*, **67**, 196-207.
- Castellan, G. W. 1987. Fisicoquímica. Editorial SITESA. México. p. 939-946.
- Desjardins, A. E.; Manandhar, G.; Plattner, R. D.; Maragos, C. M.; Shrestha, K. & McCormick, S. P. 2000. Occurrence of *Fusarium* species and mycotoxins in nepalese maize and wheat and the effect of traditional processing methods on micotoxin leves. *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 1377-1383.
- Desrosier, N. W. 1973. Conservación de los alimentos. Editorial Continental. México. p. 373-431.
- Dombrink-Kurtzman, M. A.; Dvorak, T. J.; Barron, M. E. & Rooney, L. W. 2000. Effect of nixtamalization (alkaline cooking) on fumonisin-contaminated corn for production of masa and tortillas. *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 5781-5786.
- Groves, F. D.; Zhang, L.; Chang, Y.; Ross, P. F.; Casper, H.; Norred, W. P.; You, W. & Fraumeni, J. F. Jr. 1999. *Fusarium* mycotoxins in corn products in a high-risk area for gastric cancer in Shandong province, China. *J. of AOAC International*, **82**, 657-662.
- Howard, P. C.; Churchwell, M. I.; Couch, L. H.; Marques, M. M. & Doerge, D. R. 1998. Formation of N-(Carboximethyl)fumonisin B1, following the reaction of fumonisin B1 with reducing sugars. *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 3546-3557.
- Iturbe, F. A.; Escobedo, G.; Sandoval, J. Manual de metodologías generales, Laboratorio de análisis de alimentos, material didáctico editado por la Facultad de Química, UNAM.
- Jackson, L. S.; Hlywka, J. J.; Shentil, K. R.; Bullerman, L. B. & Musser, S. M. 1996 (a). Effects of time, temperature and pH on the stability of fumonisin B1 in an aqueous model system. *J. Agric. Food Chem.*, **44**, 906-912.

BIBLIOGRAFÍA

- Jackson, L. S.; Hlywka, J. J.; Shentil, K. R. & Bullerman, L. B. 1996 (b). Effects of thermal processing on the stability of fumonisin B2 in an aqueous system. *J. Agric. Food Chem.*, **44**, 1984-1987.
- Jackson, L. S.; Katta, S. K.; Fingerhut, D. D.; DeVries, J. W. & Bullerman, L. B. 1997. Effects of baking and frying on the fumonisin B1 content of corn-based foods. *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 4800-4805.
- Katta, S. K.; Jackson, L. S.; Summer, S. S.; Hanna, M. A. & Bullerman, L. B. 1999. Effect of temperature and screw speed on stability of fumonisin B1 in extrusion-cooked corn grits. *Cereal Chem.*, **76**, 16-20.
- Li, F.; Yoshizawa, T.; Kawamura, O.; Luo, X. & Li, Y. 2001. Aflatoxins and fumonisins in corn from the high-incidence area for human hepatocellular carcinoma in Guangxi, China. *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 4122-4126.
- Liu, H.; Lu, Y.; Haynes, J. S.; Cunnick, J. E.; Murphy, P. & Hendrich, S. 2001. Reaction of fumonisin with glucose prevents promotion of hepatocarcinogenesis in female F344/N rats while maintaining normal hepatic sphinganine/sphingosine ratios. *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 4113-4121.
- Logrieco, A.; Moretti, A.; Rietteni, A.; Bottalico, A. & Corda, P. 1995. Occurrence and toxigenicity of *Fusarium proliferatum* from preharvest maize ear rot, and associated mycotoxins, in Italy. *Plant Disease*, **79**, 727-731.
- Lu, Z.; Dantzer, W. R.; Hopmans, E. C.; Prisk, V.; Cunnick, J. E.; Murphy, P. A. & Hendrich, S. 1997. Reaction with fructose detoxifies fumonisin B1 while stimulating liver-associated natural killer cell activity in rats. *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 803-809.
- Marasas, F. O.; Kellerman, T. S.; Gelderbolom, W. C.; Coetzer, J. A.; Thiel, P. G. & van der Lugt, J. J. 1988. Leuconencephalomalacia in a horse induced by Fumonisin B1 isolated from *Fusarium moliniforme*. *Onder Stepoor J. Vet. Res.*, **55**, 197-203.

BIBLIOGRAFÍA

- Maron, S. H. & Prutton, C. F. 1996. *Fundamentos de fisicoquímica*. Editorial Limusa. México. p. 787-812.
- McMurry, J. 1994. *Química orgánica*. Editorial Iberoamérica. México. p. 389-418.
- Merrill, A. H. Jr.; Serini, A. M.; Stevens, V. L.; Hannun, Y. A.; Bell, R. M. & Kinkade, J. M. Jr. 1986. Inhibition of phorbol ester-dependent differentiation of human proyelocytic leukemic (HL-60) cells by sphinganine and other long-chain bases. *J. Biol. Chem.*, **261**, 12610-12615.
- Miller, J. D. 1999. Factors affecting the occurrence of fumonisin in corn. Abstract of papers (p. 21) -International Conference on the Toxicology of Fumonisin, June 28-30, Arlington., V.A.
- Munkvold, G. P. & Desjardis, A. E. 1997. Fumonisin in maize can we reduce their occurrence?. *Plant Disease*, **81**, 556-565.
- Munkvold, G. P.; Hellmich, R. L. & Rice, L. G. 1999. Comparison of fumonisin concentrations in kernels of transgenic Bt maize hybrids and nontransgenic hybrids. *Plant Disease*, **83**, 130-138.
- Navarrete, M. & Cabrera, L. 1993. *Introducción al estudio de los radioisótopos*. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química, Sección Nuclear, Departamento de Química Inorgánica y Nuclear.
- NMX-FF-034-1995-SCFI *Productos alimenticios no industrializados-Cereales-Maíz (Zea mays L)*
- Norred, W. P. & Voss, K. A. 1994. Toxicity and role of fumonisins in animal diseases and human esophageal cancer. *J. Food Prot.*, **57**, 522-527.

- Pelizzetti, E.; Minero, C. & Vincenti, M. 1994. Photocatalytic degradation of organic contaminants. Technologies for environmental cleanup. Toxic and Hazardous Waste Management. p.101-138.
- Poling, S. M. & Plattner, R. D., 1999, Rapid purification of fumonisins and their hydrolysis products with solid- phase extraction columns. *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 2344-2349.
- Potter, N. N. 1973. La ciencia de los alimentos. Centro Regional de Ayuda Técnica. México. p. 325-333.
- Ritieni, A.; Moretti, A.; Lorieco, A.; Bottalico, A.; Randazzo, G.; Monti, S. M.; Ferracane, R. & Fogliano, V. 1997. Occurrence of fusaproliferin, fumonisin B1, and beauvercini in maize from Italy. *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 4011-4016.
- Rooney, L. W. & Suhendro, E. L. 1999. Perspectives on nixtamalization (alkaline-cooking) of maize for tortillas and snacks. *Cereal Foods World*, **44**, 466-470.
- Saubois, A.; Nepote, M. C. & Basílico, J. C. 1992. Incidencia de toxinas de *Fusarium* en el maíz y productos de la molienda. *Archivos latinoamericanos de nutrición*, **42**, 168-172.
- Scott, P. M. & Lawrence, G. A. 1997. Determination of aflatoxin in beer. *J. AOAC. Int.*, **80**, 1229-1234.
- Scott, P. M. & Lawrence, G. A. 1995. Analysis of beer for Fumonisins. *J. Food Protect.*, **58**, 1379-1383.
- Scott, P. M.; Kanhere, S. K.; Lawrence, G. A.; Daley, E. F. & Farber, J. M. 1995. Fermentation of wort containing added ochatoxin-A and fumonisin bland fumonisin B2. *Food Additives and Contaminants*, **12**, 31-40.
- Shelby, R. A.; White, D. G. & Bauske, E. M. 1994. Diferential fumonisin production in maize hybrids. *Plants*, **78**, 582-584.

BIBLIOGRAFÍA

- Shephard, G. S. 1998. Chromatographic determination of fumonisin mycotoxins. *J. Chromatogr. A.*, **815**, 31-39.
- Silverstein, R. M. & Bassler, G. C. 1980. Spectrometric Identification of organic compounds. Editorial John Wiley and Sons. California, EEUU. p. 85-171.
- Solomons W. G. 1988. Organic chemistry. Editorial John Wiley and Sons. California, EEUU. p. 575-596.
- Sydenham, E. W.; Shephard, S.; Thiel, P. G.; Stockenström, S. & Snijman, P. W. 1996 (a). Liquid chromatographic determination of fumonisins B1, B2, and B3 in corn: AOAC-IUPAC collaborative study. *Journal Of AOAC International*, **79**, 688-696.
- Sydenham, E. W.; Thiel, P. G. & Vleggaar, R. 1996 (b). Physicochemical data for some selected *Fusarium* toxins. *Journal of AOAC International*, **79**, 1365-1379.
- Sydenham, E. W.; Thiel, P. G.; Marasas, F. O.; Shephard, G. S.; Van Schalkwyk, D. J. & Koch, K. R. 1990. Natural occurrence of some *Fusarium moniliforme* mycotoxins in corn from low and high esophageal cancer prevalence area of Trasnkei, Southern Africa. *J. Agric. Food Chem.*, **38**, 1900-1903.
- Tablas de valor nutritivo de los alimentos de mayor consumo en Latinoamérica. INNSZ Editorial Pax México, 1996.
- Thakur, R. A. & Smith, J. S. 1996. Determination of fumonisins B1 and B2 and their major hydrolysis products in corn, feed, and meat, using HPLC. *J. Agric. Food Chemistry*, **44**, 1047-1052.

- Torres, M. R.; Sanchis, V. & Ramos, A. J. 1998. Occurrence of fumonisins in spanish beers analyzed by an enzyme-linked immunosorbent assay method. *Int. J. Food Microbiol.*, **39**, 139-143.
- Trejo, A.; Feria, A. & Wild, C. 1982. The role of lime in the alkaline treatment of corn for tortilla preparation. In *Modifications of Proteins. Eds. Advances in chemistry series 198*. American Chemical Society, Washington, D.C. p 245-263.
- Tseng, T. & Liu, C. 1999. Natural occurrence of fumonisins B1 and B2 in domestic maize of Taiwan. *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 4799-4801.
- Visconti, A.; Marasas, F. O.; Miller, D. J. & Riley, R. 1999. Tercera conferencia internacional mixta FAO/OMS/PNUMA sobre micotoxinas. Túnez, Túnez, p. 1-11.
- Visconti, A.; Solfrizzo, M.; Doko, M. B.; Boenke, A. & Pascale, M. 1996. Stability of fumonisins at different storage periods and temperatures in γ -irradiated maize. *Food additives and contaminants*, **13**, 929-938.
- Wise, H. & Oudar, J. 1990. Material concepts in surface reactivity and catalysis. Editorial Academic Press. New York, EEUU. p. 57-59.
- Yamashita, A.; Yoshizawa, T.; Aiura, Y.; Sánchez, P. C.; Dizon, E. I.; Arim, R. H. & Sradjono. 1995. *Fusarium* mycotoxins (Fumonisin, nivalenol, and zearalenone) and aflatoxins in corn from Southeast Asia. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **59**, 1804-1807.
- Yescas, H. K. 2001. Fumonisin, toxinas contaminantes de maíz, producidas por *Fusarium spp.* propiedades, incidencia y análisis. Trabajo monográfico de actualización. Facultad de Química, UNAM.

ANEXO I

Tabla 1. Curva patrón de FB1

Concentración (ppm)	Área (u ²)
0.25	473387.67
0.5	551093.33
1	124363.5
2	2825003.5
4	5413613
10	12216518
15	17913044

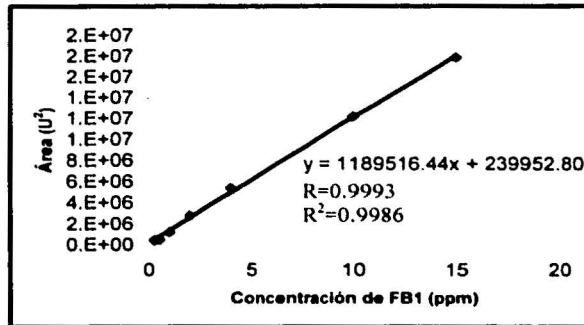


Figura 1. Curva patrón de FB1.

Tabla 2. Curva patrón de FB2

Concentración (ppm)	Área (u ²)
0.25	331457.5
0.5	614473.5
1	1227330
2	1989865.7
4	3783907
10	8441564.5
40	34584408

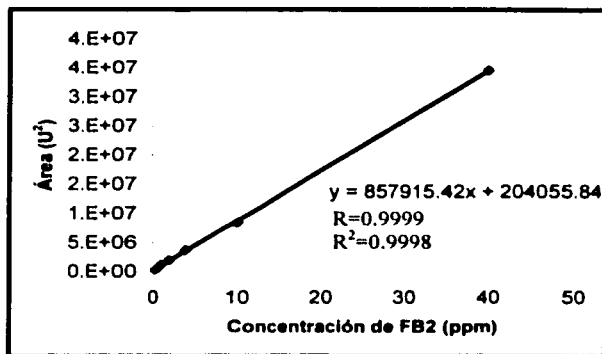


Figura 2. Curva patrón de FB2.

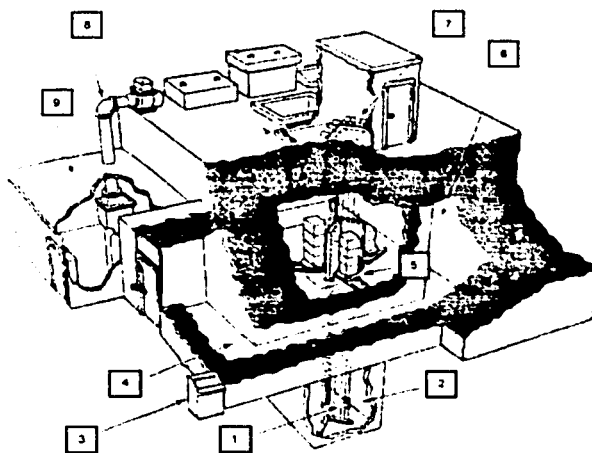


Figura 3. Esquema de la fuente Gammabeam 651-PT tipo alberca. (La fuente se encuentra en el Instituto de Ciencias Nucleares, UNAM).

Partes del Gammabeam 651-PT:

- | | |
|---------------------------------------|--------------------------|
| 1 Barras de isótopo ⁶⁰ Co. | 6 Laberinto. |
| 2 Alberca. | 7 Cuarto de motores. |
| 3 Consola de control. | 8 Extractor. |
| 4 Laberinto. | 9 Cuarto de compresores. |
| 5 Cámara de radiación. | |

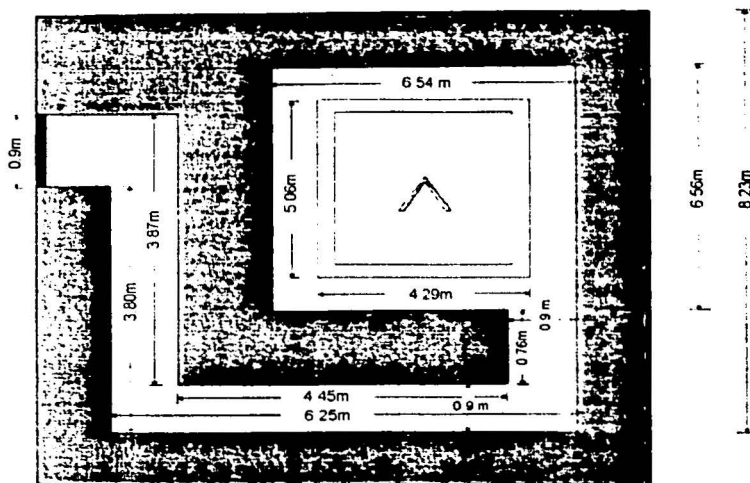


Figura 4. Vista superior del irradiador, con algunas dimensiones.

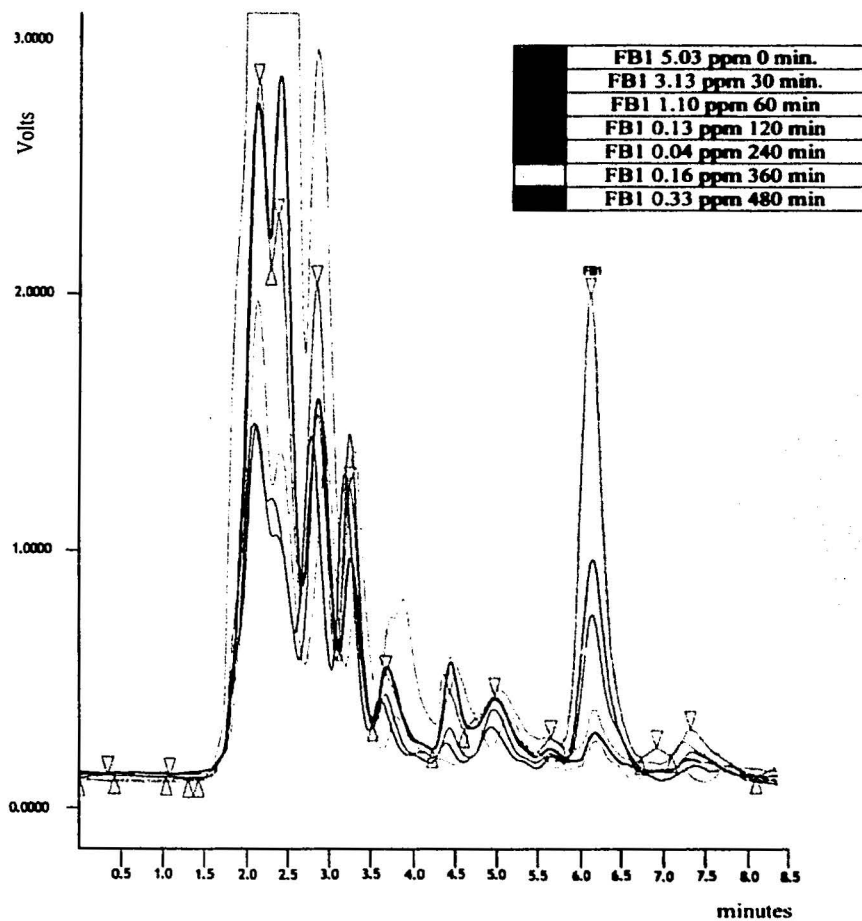


Figura 5. Efecto de la luz ultravioleta $\lambda < 380$ nm en estándares de FB1.

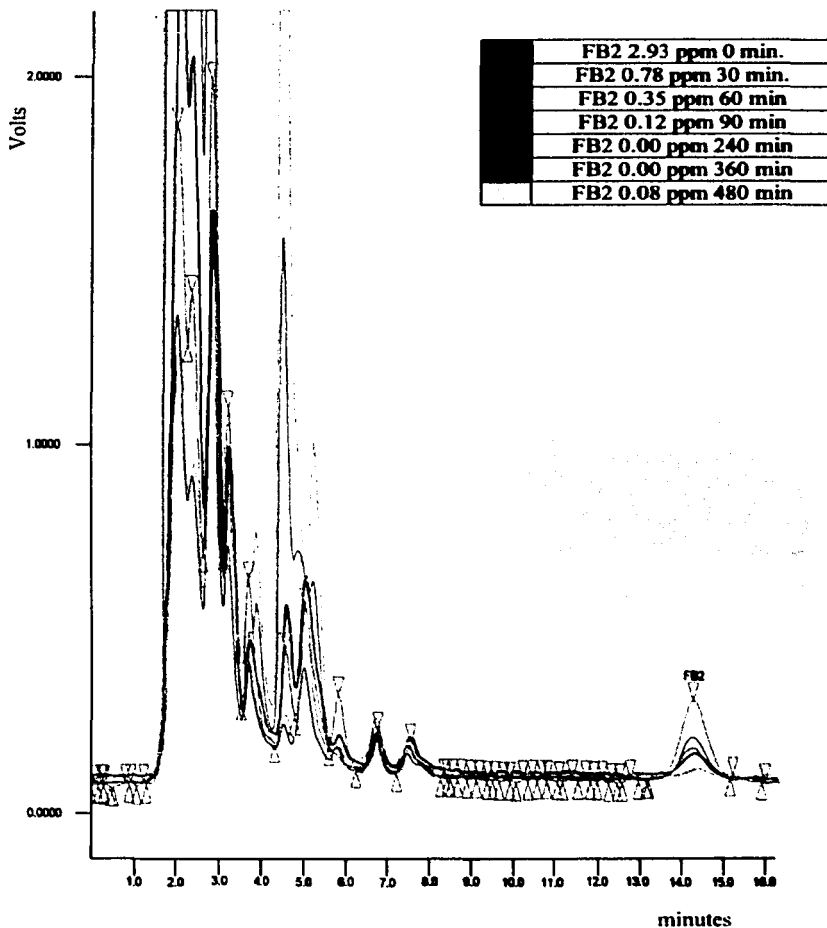


Figura 6. Efecto de la luz ultravioleta $\lambda < 380$ nm en estándares de FB2.

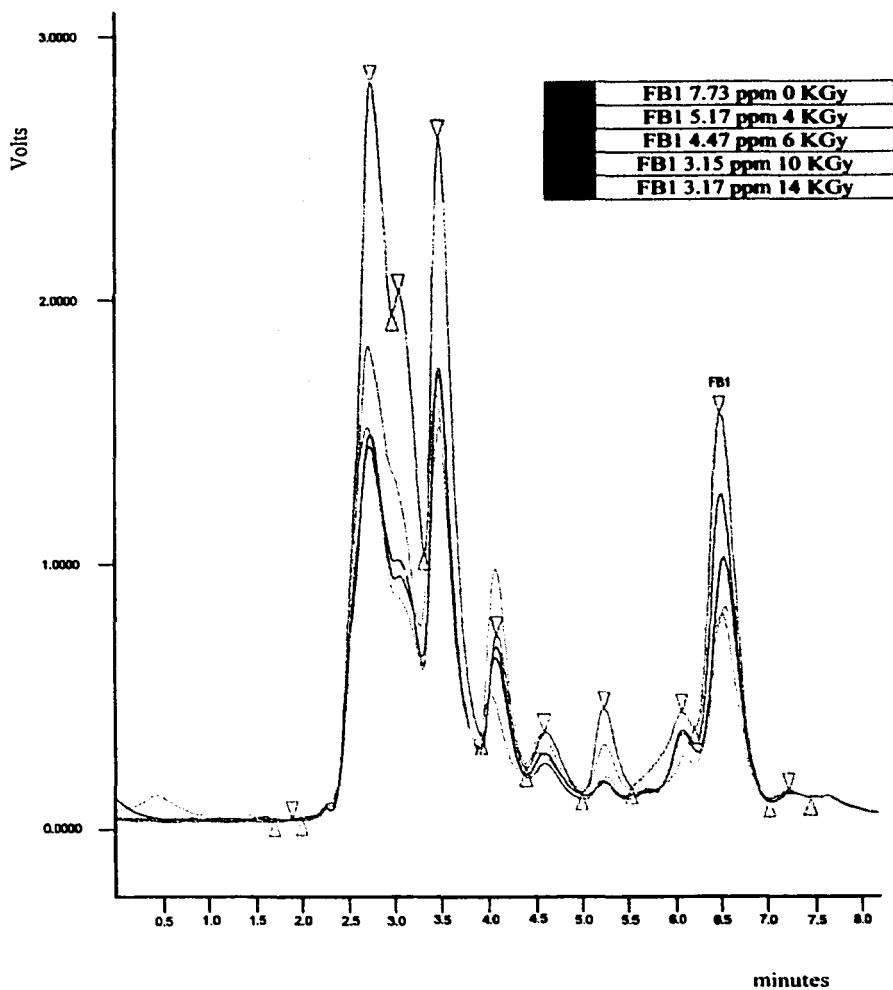


Figura 7. Efecto de la radiación gamma en estándares de FB1.

El análisis estadístico modelo lineal general (MLG) y la prueba de Duncan se realizaron empleando el programa SSPS para Windows, versión estándar 10.01 (27 Oct 1999), para ambas pruebas se utilizó un nivel de significancia $\alpha=0.05$

Tabla 3. Resultados estadísticos del modelo lineal general para FB1 en harina de maíz (muestra 10) irradiada con ultravioleta a diferentes temperaturas y tiempos

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	F calculada	F tablas con $\alpha=0.05$	Conclusión
Tiempo de Tratamiento	4	245.300	61.325	26.625	2.61	Si hay diferencia
Temperatura	2	11.957	5.979	2.596	3.23	No hay diferencia
Interacción Tiempo *Temperatura	8	16.888	2.111	0.917	2.18	No hay interacción
Error	45	103.649	2.303			
Total	60	5146.635				
Total corregido	59	408.619				

Tabla 4. Prueba de Duncan para la FB1 en harina de maíz (muestra 10) a diferentes tiempos en el tratamiento con radiación ultravioleta

Tiempo (min)	Grupos de promedios (FB1 ppm)	
	1	2
120.0	6.7545	
240.0	7.5625	
480.0	7.7555	
360.0	7.9250	
0.0		11.7614

Tabla 5. Resultados estadísticos del modelo lineal general para FB2 en harina de maíz (muestra 10) irradiada con ultravioleta a diferentes tiempos y temperaturas

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	F calculada	F tablas con $\alpha=0.05$	Conclusión
Tiempo de Tratamiento	4	49.557	12.389	27.961	2.61	Si hay diferencia
Temperatura	2	0.671	0.336	0.757	3.23	No hay diferencia
Interacción Tiempo *Temperatura	8	1.591	0.199	0.449	2.18	No hay interacción
Error	45	19.939	0.443			
Total	60	505.811				
Total corregido	59	72.021				

Tabla 6. Prueba de Duncan para la FB2 en harina de maíz (muestra 10) en el tratamiento con radiación ultravioleta

Tiempo (min)	Grupos de promedios (FB1 ppm)	
	1	2
120.0	2.026	
240.0	2.042	
480.0	2.107	
360.0	2.199	
0.0		4.080

Tabla 7. Resultados estadísticos del modelo lineal general para FB1 en harina de maíz (muestra 7) irradiada con ultravioleta a diferentes tiempos y temperaturas

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	F calculada	F tablas con $\alpha=0.05$	Conclusión
Tiempo de Tratamiento	4	135.008	33.752	10.779	2.61	Si hay diferencia
Temperatura	2	17.665	8.833	2.821	3.23	No hay diferencia
Interacción Tiempo *Temperatura	7	11.938	1.705	0.545	2.25	No hay interacción
Error	42	131.512	3.131			
Total	56	3444.650				
Total corregido	55	333.678				

Tabla 8. Prueba de Duncan para la FB1 en harina de maiz (muestra 7) a diferentes tiempos en el tratamiento con radiación ultravioleta

Tiempo (min)	Grupos de promedios (FB1 ppm)	
	1	2
480.0	5.2110	
240.0	5.8933	
360.0	5.9950	
120.0		8.4609
0.0		9.5117

Tabla 9. Resultados estadísticos del modelo lineal general para FB2 en harina de maiz (muestra 7) irradiada con ultravioleta a diferentes tiempos y temperaturas

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	F calculada	F tablas con $\alpha=0.05$	Conclusión
Temperatura	2	0.411	0.206	3.19	3.35	No hay diferencia
Tiempo de Tratamiento	4	19.670	4.918	76.342	2.73	Si hay diferencia
Interacción Tiempo *Temperatura	6	0.938	0.156	2.428	2.46	No hay interacción
Error	27	1.739	6.442E-02			
Total	40	230.871				
Total corregido	39	21.931				

Tabla 10. Prueba de Duncan para la FB2 en harina de maiz (muestra 7) a diferentes tiempos en el tratamiento con radiación ultravioleta

Tiempo (min)	Grupos de promedios (FB1 ppm)			
	1	2	3	4
480.0	1.6000			
240.0	1.6811			
360.0		1.9957		
120.0			2.3891	
0.0				3.5050

Tabla 11. Resultados estadísticos del modelo lineal general para FB1 en harina de maíz (muestra 10) que recibió radiación gamma a diferentes dosis

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	F calculada	F tablas con $\alpha=0.05$	Conclusión
Presencia o ausencia de TiO_2	1	0.367	0.367	0.168	4.17	No hay diferencia
Dosis de Tratamiento	3	143.706	47.902	21.979	2.92	Si hay diferencia
Interacción TiO_2 * Dosis	3	0.250	8.320E-02	0.038	2.92	No hay interacción
Error	32	69.742	2.179			
Total	40	3682.582				
Total corregido	39	214.606				

Tabla 12. Prueba de Duncan para la FB1 en harina de maíz (muestra 10) a diferentes dosis en el tratamiento con radiación gamma

DOSIS (Kgy)	Grupos de promedios (FB1 ppm)		
	1	2	3
9	6.3375		
3		8.4000	
15		9.4083	
0			11.3312

Tabla 13. Resultados estadísticos del modelo lineal general para FB2 en harina de maíz (muestra 10) que recibió radiación gamma a diferentes dosis

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	F calculada	F tablas con $\alpha=0.05$	Conclusión
Presencia o ausencia de TiO_2	1	1.767E-03	1.767E-03	0.004	4.08	No hay diferencia
Dosis de Tratamiento	4	20.706	5.177	12.946	2.61	Si hay diferencia
Interacción TiO_2 * Dosis	4	0.182	4.558E-02	0.114	2.61	No hay interacción
Error	35	13.995				
Total	45	459.204				
Total corregido	44	34.838				

Tabla 14. Prueba de Duncan para la FB2 en harina de maíz (muestra 10) a diferentes dosis en el tratamiento con radiación gamma

DOSIS (KGy)	Grupos de promedios (FB2 ppm)			
	1	2	3	4
9	2.1825			
6	2.3738	2.3738		
3		2.9667	2.9667	
15			3.3967	3.3967
0				3.9043

Tabla 15. Resultados estadísticos del modelo lineal general para FB1 en harina de maíz (muestra 4) que recibió radiación gamma a diferentes dosis

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	F calculada	F tablas con $\alpha=0.05$	Conclusión
Presencia o ausencia de TiO ₂	1	0.112	0112	2.840	4.96	No hay diferencia
Dosis de Tratamiento	4	7.877	1.969	49.736	3.48	Si hay diferencia
Interacción TiO ₂ * Dosis	4	5.823E-02	1.456E-02	0.368	3.48	No hay interacción
Error	10	0.396	3.960E-02			
Total	20	272.587				
Total corregido	19	9.195				

Tabla 16. Prueba de Duncan para la FB1 en harina de maíz (muestra 4) a diferentes dosis en el tratamiento con radiación gamma

Dosis (KGy)	Grupos de promedios (FB1 ppm)		
	1	2	3
15	2.6700		
12	2.8367		
9		3.5133	
6		3.6133	
0			4.3350

Tabla 17. Resultados estadísticos del modelo lineal general para FB2 en harina de maíz (muestra 4) que recibió radiación gamma a diferentes dosis

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	F calculada	F tablas con $\alpha=0.05$	Conclusión
Presencia o ausencia de TiO ₂	1	1.492E-02	1.492E-02	0.879	4.75	No hay diferencia
Dosis de Tratamiento	4	1.391	0.348	20.489	3.26	Si hay diferencia
Interacción TiO ₂ * Dosis	4	1.746E-02	4.365E-03	0.257	3.26	No hay interacción
Error	12	0.204	1.698E-02			
Total	22	39.623				
Total corregido	21	1.659				

Tabla 18. Prueba de Duncan para la FB2 en harina de maíz (muestra 4) a diferentes dosis en el tratamiento con radiación gamma

Dosis (KGy)	Grupos de promedios (FB2 ppm)			
	1	2	3	4
15	0.9640			
12	1.1033	1.1033		
9		1.2500	1.2500	
6			1.4133	1.4133
0				1.5975

Tabla 19. Resultados estadísticos del modelo lineal general para comparar la disminución que logran la radiación gamma con la que logra la radiación ultravioleta sobre la fumonisina B1 en harina de maíz (muestra 10)

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	F calculada	F tablas con $\alpha=0.05$	Conclusión
Tipo de radiación	1	1.383	1.383	0.463	4.17	No hay diferencia
Tiempo de irradiación	4	104.415	26.104	8.734	2.69	Sí hay diferencia
Interacción Tipo de radiación * Tiempo de irradiación	4	11.439	2.860	0.957	2.69	No hay interacción
Error	32	95.644	2.989			
Total	42	3978.859				
Total corregido	41	219.266				

Tabla 20. Resultados estadísticos del modelo lineal general para comparar la disminución que logran la radiación gamma con la que logra la radiación ultravioleta sobre la fumonisina B2 en harina de maíz (muestra 10)

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	F calculada	F tablas con $\alpha=0.05$	Conclusión
Tiempo de irradiación	3	21.841	7.280	14.048	2.95	Sí hay diferencia
Tipo de radiación	1	1.324	1.324	2.555	4.20	No hay diferencia
Interacción Tipo de radiación * Tiempo de irradiación	3	1.979	0.660	1.273	2.95	No hay interacción
Error	28	14.511	0.518			
Total	36	360.483				
Total corregido	35	39.297				

ANEXO II

Metodologías realizadas para la caracterización química (Análisis proximal) de acuerdo al manual de metodologías generales del laboratorio de análisis de alimentos. (Iturbe *et al.*)

CENIZAS : Se pesa la muestra de maíz (3.0 g) en un crisol a peso constante, para calcinar la muestra primero carbonizarla con mechero, introducirla a la mufla a 500°C por 240.0 minutos y se enfría en desecador para pesarse.

HUMEDAD: En un pesafiltro con tapa a peso constante se pesa la muestra de harina de maíz (3.0 g) y se mantiene en la estufa por 60.0 minutos a 130°C, se deja enfriar en un desecador hasta temperatura ambiente y enseguida se pesa la muestra.

EXTRACTO ETÉREO (Grasa Cruda): Se coloca un vaso para equipo Goldfish con perlas de ebullición a la estufa a 100°C hasta peso constante. En un papel la harina de maíz se pesa (4.0 g), para colocarse en un cartucho de celulosa, y se tapa con algodón. El cartucho se sitúa en un recipiente de fondo perforado y es colocado en el contenedor del equipo.

Al vaso Goldfish se adiciona éter de petróleo (40.0 mL) y se coloca en el equipo mediante un anillo metálico con empaque. El vaso Goldfish se calienta hasta alcanzar la extracción completa de la grasa, se quita el vaso del equipo y el extracto es secado a 100°C por 30.0 minutos, se enfría y pesa.

PROTEÍNA CRUDA (Método de Micro Kjeldahl): Se pesa la muestra de harina de maíz (0.1 g) en un papel, se agregan 0.5 g de sulfato de sodio, 0.04 g de sulfato de cobre pentahidratado, 0.01 g de óxido de mercurio y se introducen en un matraz micro Kjeldahl, al cual se agregan 3 mL de ácido sulfúrico concentrado y se añaden piedras de ebullición.

El matraz se coloca en el digestor del equipo micro Kjeldahl y se calienta hasta la completa digestión de la materia orgánica.

Se deja enfriar a temperatura ambiente, se redisuelve con la mínima cantidad de agua destilada, el contenido del matraz se pasa cuantitativamente a la copa de adición del dispositivo de microdestilación, a la salida del dispositivo de microdestilación se coloca un vaso de precipitado con 50.0 mL de solución de ácido bórico*; se pasa el contenido de la copa de adición al bulbo de reacción interior, se depositan aproximadamente 20.0 mL de NaOH (15.0 M) en la copa de adición y se adiciona al bulbo de reacción. Se destila hasta obtener un volumen de 100.0 mL, se retira el vaso del dispositivo y se coloca el destilado en un matraz Erlen Meyer de 250.0 mL y titulamos con la solución valorada de HCl 0.01 N, hasta el viraje de la solución de ácido bórico verde a rojo. Además se efectúa una prueba en blanco empleando la misma cantidad de papel.

* ácido bórico 0.5% m/V con indicadores (se pesan 5.0 g de ácido bórico y se colocan en un matraz aforado de 1.0 L, se adiciona agua destilada hasta solubilizar el ácido; a continuación se adicionan 35.0 mL de indicador A** y 10 mL de indicador B***, se mezclan y se adiciona suficiente agua hasta dejar un espacio de 2 cm en el cuello del matraz aforado, para ajustar el color de esta solución con ácido o base a un tono café rojizo, por último aforar con agua destilada).

** solución indicadora A (se pesan 100.0 mg de fenolftaleína se disuelven y aforan a 100.0 mL con alcohol etílico).

*** solución indicadora B (se pesan 33.0 mg de verde de bromocresol y 66.0 mg de rojo de metilo los cuales se disuelven y se aforan con 100.0 mL de alcohol etílico).

FIBRA CRUDA: Se coloca la muestra desengrasada (2.0 g) en un vaso especial de digestión de 600.0 mL, se adiciona fibra de vidrio preparada* (1.5-2.0 g), 200.0 mL de una solución de ácido sulfúrico (0.13 M) caliente y piedras de ebullición, se realiza el mismo procedimiento solamente con la fibra de vidrio, a manera de blanco. (*La fibra de vidrio se prepara

digiriéndola 30.0 min. en ebullición con ácido sulfúrico (0.13 M) y 30.0 min. en ebullición con NaOH (0.31 M) en el vaso de digestión).

Se coloca el vaso en el aparato de digestión con refrigerante, se deja hervir exactamente 30.0 minutos. Se remueve el vaso del equipo y se filtra en un embudo cónico sobre tela especial, enjuagando el vaso con agua caliente (75.0 mL), se lava con agua caliente (150.0 mL), usando succión ligera.

Se recupera el material del embudo y se coloca de nuevo en el vaso de digestión para repetir el tratamiento de hidrólisis con NaOH (0.31 M), se retira el vaso del digestor, y en el crisol Goosh con fibra de vidrio a peso constante se filtra con succión, se lava con 25.0 mL de solución de ácido sulfúrico 0.13 M caliente y con tres porciones de 50.0 mL de agua, se deshidrata parcialmente con 25.0 mL de alcohol al 95.0%. El residuo obtenido es secado en estufa a 130°C durante 120.0 minutos y pesado en frío. Se coloca en una mufla a 600°C durante 30.0 minutos y se pesa de nuevo en frío.

CARBOHIDRATOS TOTALES: Los Carbohidratos Totales se determinan por diferencia