



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

EFFECTO DE LOS ÁCIDOS FENÓLICOS DEL PERICARPIO DE LA SEMILLA DE
MAÍZ EN LA PRODUCCIÓN DE FUMONISINA B1 POR *Fusarium verticillioides*.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO DE ALIMENTOS

PRESENTA:
MAX MESHOU LAM ALAMILLA



CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., 2021



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor:** ARTURO NAVARRO OCAÑA

VOCAL: **Profesor:** FRANCISCO JAVIER PLASENCIA DE LA PARRA

SECRETARIO: **Profesora:** GLORIA DÍAZ RUIZ

1er. SUPLENTE: **Profesora:** ANA LILIA CRUCES MARTÍNEZ

2º SUPLENTE: **Profesor:** JAVIER ARAIZA SANTIBÁÑEZ

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA, LABORATORIO 101; CONJUNTO E, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM CON EL APOYO DE LOS PROYECTOS DGAPA-PAPIIT IN213517 e IN217720.

Asesor: FRANCISCO JAVIER PLASENCIA DE LA PARRA

Sustentante: MAX MESHOULAM ALAMILLA

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis se realizó con el apoyo de los proyectos:

- DGAPA-PAPIIT IN213517 “Comunicación molecular en la interacción *Fusarium verticillioides*-maíz”.
- DGAPA-PAPIIT IN227020 “Función de los mecanismos de defensa preformados de maíz en la interacción con *Fusarium verticillioides*”.
- PAIP 5000-9121, Facultad de Química, UNAM.

Max Meshoulam Alamilla recibió una beca (Conclusión de Estudios) por parte del proyecto PAPIIT IN217720 durante el desarrollo de este trabajo.

Se agradece al Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMyT) por proporcionar las semillas de los genotipos de maíz empleadas en este trabajo.

Abreviaturas

15-ADON: 15-acetildeoxinivalenol

A₄₅₀: Absorbancia a 450 nm.

ABTS: Ácido 2,2'-azinobis
(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)

AC: Ácido p-cumárico

AF: Ácido ferúlico

AS: Ácido siríngico

AV: Ácido vanílico

a_w: Disponibilidad de agua

DON: Deoxinivalenol

EA: Extracto de Pericarpio de Maíz de
Alto Contenido en Ácido Ferúlico

EB: Extracto de Pericarpio de Maíz de
Bajo Contenido en Ácido Ferúlico

EP: Extracto de Pericarpio de Semilla
de Maíz

EROs: Especies Reactivas de Oxígeno

Eq.: Equivalente

FB1: Fumonisina B1

HPLC: High Profile Liquid
Chromatography (Cromatografía de
Líquidos de Alta Resolución)

PDA: Agar Papa-Dextrosa

Snm: Sobre el nivel del mar

TCTB: Tricotecenos Tipo B

ÍNDICE

I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	3
A. Maíz.	3
1. Botánica del maíz.	3
2. Producción de maíz en México y usos del maíz.	6
3. Composición química y del grano de maíz.	8
4. Pericarpio: estructura y composición química.	9
B. Ácidos Fenólicos.	10
1. Diversidad química.	10
2. Funciones de los compuestos fenólicos en plantas.	14
3. Actividad antioxidante.	15
C. <i>Fusarium verticillioides</i>.	18
1. Taxonomía y características generales.	18
2. <i>F. verticillioides</i> como patógeno de maíz. Pudrición de mazorca y semilla.	20
D. Fumonisinias.	22
1. Diversidad química estructural.	22
2. Propiedades.	23
3. Incidencia en maíz.	24
4. Actividad biológica.	26
5. Biosíntesis de fumonisinias.	28
a. Locus <i>FUM</i> y ruta biosintética.	28
6. Efecto de los compuestos fenólicos sobre la síntesis de fumonisinias.	30
E. Antecedentes inmediatos.	34
III. HIPÓTESIS	36
IV. OBJETIVOS	36
V. MATERIALES Y MÉTODOS	37
A. Material biológico.	37

1. Preparación del medio de cultivo PDA 0.5X suplementado con AF.	37
2. Inóculo y conteo de conidias.	37
B. Efecto del extracto de pericarpio de maíz en el crecimiento radial de <i>F. verticillioides</i>.	39
1. Extracción del pericarpio de maíz.	39
2. Análisis de los niveles de AF y AC en pericarpio de semillas de maíz.	39
C. Efecto del extracto de pericarpio de maíz en la producción de FB1 de <i>F. verticillioides</i>.	40
1. Preparación del medio GYAM.	40
2. Preparación de o-ftaldialdehído (OPA) (7.45 mM).	40
3. Análisis de la cantidad de FB1 en medio GYAM.	40
D. Evaluación de la capacidad antioxidante de los extractos de pericarpio de maíz con reactivo de ABTS.	41
1. Preparación del reactivo de ABTS oxidado (ABTS+).	41
2. Preparación de muestras.	41
VI. RESULTADOS	43
A. Efecto del extracto de pericarpio de maíz en el crecimiento radial de <i>F. verticillioides</i>.	43
1. Niveles de AF y AC en el pericarpio de semillas de maíz y concentración de los ácidos fenólicos en el extracto.	43
2. Efecto del extracto de pericarpio de maíz sobre el crecimiento de <i>F. verticillioides</i> en medio PDA.	44
3. Efecto de otros compuestos presentes en el pericarpio de maíz en el crecimiento de <i>F. verticillioides</i> .	45
B. Efecto del extracto de pericarpio de maíz sobre la producción de FB1 de <i>F. verticillioides</i>.	47
C. Evaluación de la capacidad antioxidante de los extractos de pericarpio de maíz con reactivo de ABTS.	49
VII. DISCUSIÓN	55
A. Efecto del extracto de pericarpio de semilla de maíz sobre el crecimiento en placa de <i>F. verticillioides</i>.	55

B. Efecto del extracto de pericarpio de semilla de maíz sobre la producción de FB1 por <i>F. verticillioides</i> .	56
C. Capacidad antioxidante de los ácidos fenólicos presentes en el pericarpio de semilla de maíz.	57
VIII. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	59
A. Conclusión	59
B. Perspectivas	59
IX. REFERENCIAS	60
X. ANEXO	66

Índice de Figuras

Figura 1. Planta de maíz con las partes que la constituyen.	5
Figura 2. Grano de maíz con las partes que lo constituyen.	8
Figura 3. Compuestos fenólicos presentes en plantas.	10
Figura 4. Esquema de los derivados fenólicos por la vía del ácido shikímico.	11
Figura 5. Estructuras de algunos ácidos fenólicos importantes presentes en plantas.	13
Figura 6. Representación de las estructuras resonantes del ácido ferúlico.	16
Figura 7. Características morfológicas y de colonias de <i>Fusarium verticillioides</i> .	19
Figura 8. El ciclo de infección de <i>F. verticillioides</i> .	21
Figura 9. Estructura química de las fumonisinas del grupo B.	23
Figura 10. Biosíntesis de fumonisinas.	29
Figura 11. Niveles de FB1 producidos por <i>F. verticillioides</i> en presencia de AF.	34
Figura 12. Cámara de Neubauer.	38
Figura 13. Efecto del extracto de pericarpio de maíz y del AF en el crecimiento radial de <i>F. verticillioides</i> .	44
Figura 14. Anverso y reverso del crecimiento en placa de <i>F. verticillioides</i> .	45
Figura 15. Cromatogramas de HPLC.	46
Figura 16. Efecto de diferentes ácidos fenólicos (AC, AS y AV) presentes en extracto de maíz en el crecimiento radial de <i>F. verticillioides</i> .	47
Figura 17. Crecimiento al día 7 de <i>F. verticillioides</i> en matraces de medio GYAM.	48
Figura 18. Ejemplos de cromatogramas obtenidos para la cuantificación de FB1 en medio GYAM.	48
Figura 19. Efecto de diferentes tratamientos sobre la producción de FB1 por <i>F. verticillioides</i> .	49
Figura 20. % de inhibición de absorbancia de ABTS+.	50
Figura 21. Capacidad antioxidante de diferentes ácidos fenólicos presentes en pericarpio de maíz.	51
Figura 22. Capacidad antioxidante de ácidos fenólicos presentes en pericarpio de maíz y diferentes mezclas de ellos.	52

Figura 23. Capacidad antioxidante de extractos de pericarpio de alto y bajo contenido de AF, frescos y antiguos comparado contra estándar de AF y extracto fresco.

53

Figura 24. Actividad inhibitoria de la oxidación del ABTS de los extractos de alto y bajo contenido de AF.

54

ANEXOS

Figura R1. Curva de calibración de AF mediante HPLC.

Figura R2. Curva de calibración de AC mediante HPLC.

Índice de Tablas

Tabla 1. Datos de los últimos cinco años sobre superficie destinada a cultivo de maíz, producción y rendimiento.	6
Tabla 2. Composición química proximal promedio de las partes principales de los granos de maíz.	9
Tabla 3. Contenido de fenoles y ácidos fenólicos en salvado de maíz y su actividad antioxidante.	18
Tabla 4. Niveles de Fumonisinas en alimentos de cereales y en maíz a nivel mundial.	26
Tabla 5. Porcentajes de inhibición de algunos ácidos fenólicos contra hongos patógenos alimentarios.	31
Tabla 6. Porcentajes de inhibición de algunos ácidos fenólicos contra micotoxinas producidas por hongos patógenos alimentarios.	32
Tabla 7. Contenido de AF en las variedades de maíz utilizadas.	35
Tabla 8. Concentración final de analitos para el análisis de capacidad antioxidante.	42
Tabla 9. Relación de AF y AC en el pericarpio de maíz (mg de ácido/mL) y en el extracto (mM).	43

I. RESUMEN

El maíz está expuesto a agentes que limitan su producción. El hongo ascomiceto *Fusarium verticillioides*, es el principal patógeno del maíz. Es responsable de enfermedades en plántulas y tallos, y en mazorcas produce pudrición de éstas y contaminación por micotoxinas. La fumonisina B1 es la toxina más abundante que produce esta especie y su presencia afecta la calidad del grano por sus efectos en animales y humanos que lo consumen. En la interacción entre *F. verticillioides* y el grano de maíz, el pericarpio de este representa la primera barrera de la planta. El pericarpio está formado por fibra, proteína, almidón, grasa y otras sustancias, entre las cuáles se encuentran en mayor proporción compuestos fenólicos. Entre éstos, el ácido ferúlico es el ácido fenólico más abundante y puede constituir hasta el 90% de los compuestos fenólicos en el pericarpio de maíz. El ácido ferúlico (AF) tiene actividad antifúngica pues inhibe el crecimiento de *F. verticillioides*, así como la producción de fumonisina B1. No se conoce su modo de acción, pero al igual que otros compuestos fenólicos poseen actividad antioxidante. El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de la composición del pericarpio de maíz sobre el crecimiento de *F. verticillioides* y la producción de fumonisina B1, y determinar si este efecto se asocia con la actividad antioxidante de los principales ácidos fenólicos.

Durante el desarrollo de este trabajo se utilizaron distintos genotipos de maíz, categorizados como de alto y bajo contenido de AF en el pericarpio de sus semillas. Mediante análisis por HPLC se corroboró que el AF es el principal compuesto fenólico en el pericarpio de las semillas. Asimismo, se determinó que los ácidos fenólicos presentes en el extracto de pericarpio de maíz, especialmente el AF, inhiben el crecimiento *in vitro* de *F. verticillioides*. Aunque en este trabajo no fue posible determinar que los extractos de pericarpio logaran una inhibición significativa en los niveles de FB1 producidos *in vitro*, se evaluó la capacidad antioxidante de los extractos de pericarpio de las distintas variedades. Encontramos una correlación directa entre la cantidad de AF en el extracto y la capacidad antioxidante de los mismos, siendo el AF el mayor contribuyente a dicha capacidad, por encima de los demás ácidos fenólicos presentes. El AF es el ácido fenólico que se encuentra en mayor cantidad en el extracto de pericarpio y el que exhibe una mayor capacidad antioxidante, esto está relacionado con la inhibición que provoca del crecimiento *in vitro* de *F. verticillioides*,

y posiblemente con la tolerancia a la colonización y producción de la toxina *in planta*.

II. INTRODUCCIÓN

A. Maíz

1. Botánica del maíz

El maíz (*Zea mays* L.) pertenece a la familia de las gramíneas (Poaceae) y es una planta anual de porte robusto dotada de un amplio sistema radicular fibroso (CONACyT, 2011), posee un tallo simple, erecto, cuya altura varía entre uno y cinco metros, con pocos macollos o ramificaciones. Las hojas nacen en los nudos de manera alterna a lo largo del tallo; se encuentran abrazadas a éste mediante la vaina que envuelve el entrenudo y cubre la yema floral, de tamaño y ancho variable. Las raíces primarias son fibrosas y presentan raíces adventicias, que nacen en los primeros nudos por encima de la superficie del suelo, la función de ambas es mantener la planta erecta (Kato, *et al*, 2009).

Es una especie monoica de flores unisexuales, masculinas y femeninas, bien diferenciadas en la misma planta: la inflorescencia masculina es terminal, se conoce como panícula (o espiga), consta de un eje central o raquis y ramas laterales; a lo largo del eje central se distribuyen los pares de espiguillas de forma polística (se disponen en varias filas o series) y en las ramas con arreglo dístico y cada espiguilla está protegida por dos brácteas o glumas, que a su vez contienen en forma apareada las flores estaminadas (Figura 1). En cada florecilla componente de la panícula hay tres estambres donde se desarrollan los granos de polen. Las inflorescencias femeninas (mazorcas) se localizan en las yemas axilares de las hojas, son espigas de forma cilíndrica que consisten de un raquis central u olote donde se insertan las espiguillas por pares, cada espiguilla con dos flores pistiladas, una fértil y otra abortiva, estas flores se arreglan en hileras paralelas, las flores pistiladas tienen un ovario único con un pedicelo unido al raquis, un estilo muy largo con propiedades estigmáticas donde germina el polen. La inflorescencia femenina (mazorca) puede formar alrededor de 400 a 1000 granos, arreglados en promedio de 8 a 24 hileras por mazorca; todo esto encerrado en numerosas brácteas o vainas de las hojas (tomoxtle). Los estilos largos se proyectan de la punta del raquis como una masa de hilo sedoso y se conocen como pelo de elote; el jilote es el elote tierno, el grano constituye aproximadamente el 42% del peso seco de la planta. Por las característi-

cas mencionadas, el maíz es una planta de polinización abierta (anemófila) propensa al cruzamiento, la gran mayoría de los granos de polen viajan de 100 a 1000 m (Kato, *et al*, 2009), Hay varios tipos de grano, que se distinguen por la composición química de los compuestos de reserva (CONACyT, 2011).

El desarrollo de la planta se puede dividir en dos fases fisiológicas. En la primera, o fase vegetativa, se desarrollan y diferencian los distintos tejidos hasta que aparecen las estructuras florales. A su vez, la fase vegetativa consta de dos ciclos: 1) En el primero se forman las primeras hojas y el desarrollo es ascendente; en este ciclo, la producción de materia seca es lenta y finaliza con la diferenciación tisular de los órganos de reproducción. 2) En el segundo ciclo se desarrollan las hojas y los órganos de reproducción; y concluye con la emisión de los estigmas (FAO, 1993).

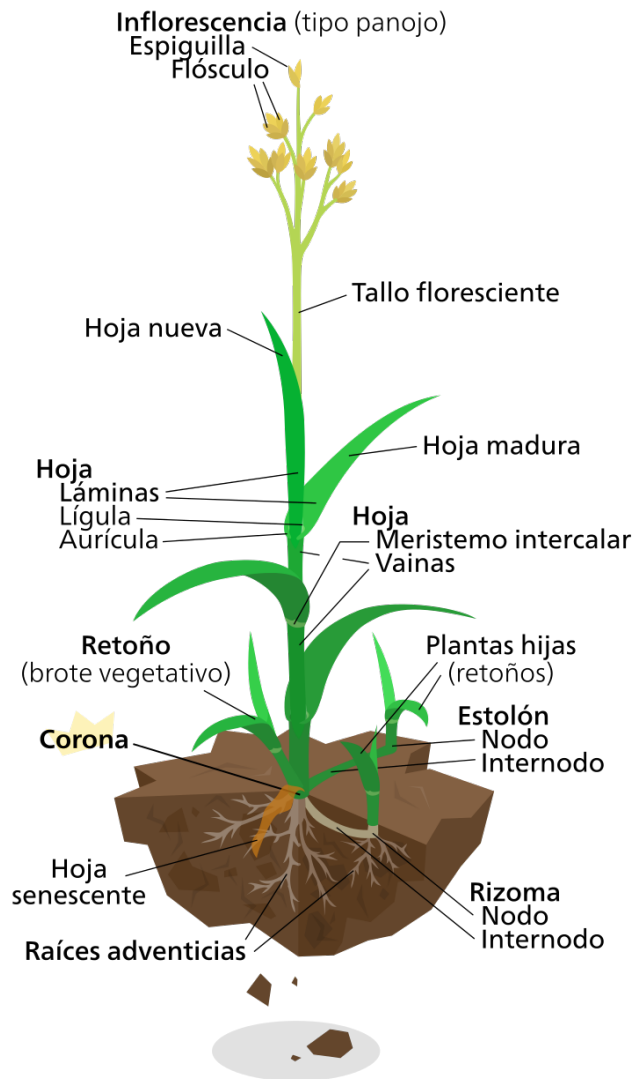


Figura 1: Planta de maíz con las partes que la constituyen, recurso digital, tomado de <https://es.wikipedia.org/wiki/Poaceae>.

La segunda fase, también llamada fase de reproducción, se inicia con la fertilización de las estructuras femeninas que se diferenciarán en espigas y granos. La etapa inicial de esta fase se caracteriza por el incremento de peso de las hojas y otras partes de la flor; durante la segunda etapa, el peso de los granos aumenta con rapidez (FAO, 1993). Desde que se siembran las semillas hasta la aparición de los primeros brotes, transcurre un tiempo de 8 a 10 días, donde se refleja el continuo y rápido crecimiento de la plántula (CONACyT, 2011).

2. Producción de maíz en México y usos del maíz

Durante 2019, en México se destinaron 7,143,102 ha para el cultivo de maíz en grano, con una producción total de 21,162,038 ton y un rendimiento de 4.233 ton/ha. (SIAP, 2020). La producción de maíz de grano se divide en blanco y amarillo. El maíz blanco representa 86.94% de la producción y se destina principalmente al consumo humano. Esa producción satisface la totalidad del consumo nacional. El maíz amarillo se destina a la industria en la fabricación de alimentos y para la producción pecuaria. Esa producción satisface sólo el 24% de los requerimientos nacionales (SAGARPA, 2017). La Tabla 1 presenta los datos de los últimos cinco años al respecto del cultivo de maíz en México.

Tabla 1: Datos de los últimos cinco años sobre superficie destinada a cultivo de maíz, producción y rendimiento (SIAP, 2020).

Año	Superficie destinada a cultivo de maíz (ha)	Producción (ton)	Rendimiento (ton/ha)
2019	7,143,102	21,162,038	4.233
2018	7,345,786	21,185,003	3.915
2017	7,567,017	21,545,631	3.841
2016	7,794,917	22,251,777	3.828
2015	7,626,771	19,504,050	3.582

El maíz es el cultivo más representativo de México por su importancia económica, social y cultural. Con un consumo promedio per cápita al año de 196.4 kg de maíz blanco, especialmente en tortillas, representa 20.9% del gasto total en Alimentos, Bebidas y Tabaco realizado por las familias mexicanas (SAGARPA, 2017), es consumido en varias formas: en elote, en tlaxcal, tamales, bebidas fermentadas, pero principalmente en forma de tortilla, con un consumo per cápita de 100 kg de maíz al año en diferentes formas. La tortilla es considerada como un alimento de primera necesidad para el 94% de la población mexicana (González-Cortés, *et al*, 2016).

Se siembra en diversas regiones agroecológicas que van desde nivel del mar hasta cerca de los 4,000 metros snm, se cultiva desde el ecuador hasta altas latitud-

des en los dos hemisferios, se siembra en regiones de precipitación pluvial desde menos de 400 mm hasta los 3000 mm, en suelos y climas muy variables, la mejor producción se logra en climas donde las temperaturas medias en los meses calurosos varían entre 21 y 27°C, con un periodo libre de heladas en el ciclo agrícola variable de 120 a 180 días (Kato, *et al*, 2009).

Gran parte del territorio nacional es propicio para la producción de maíz en grano; en estados como Tamaulipas y Nuevo León hay zonas con gran potencial de aprovechamiento. De las 7.76 millones de hectáreas de grano sembradas en 2016, el 75.59% de la superficie se encuentra no mecanizada, 65.06% no cuenta con tecnología aplicada a la sanidad vegetal, mientras que el 30.16% del territorio sembrado con este cultivo contó con asistencia técnica. Por otro lado, 3.55% de la producción es por modalidad de riego de gravedad, 0.19% de riego por bombeo, 42.25% de otro tipo de riego y el resto es de temporal (SAGARPA, 2017).

Las variedades cultivadas fundamentalmente para la alimentación comprenden el maíz dulce y el reventador, aunque también se usan en buena medida el maíz dentado, el amiláceo o harinoso y el cristalino; este último también se utiliza para piensos. El maíz harinoso es un grano con endospermo blando que se emplea mucho como alimento en México, Guatemala y los países andinos. El maíz de tipo dentado tiene un endospermo calloso y vítreo a los lados y en la parte posterior del grano, en tanto que el núcleo central es blando. El maíz de tipo cristalino posee un endospermo grueso, duro y vítreo, que encierra un centro pequeño, granuloso y amiláceo (FAO, 1993), también se utiliza para la elaboración de jarabe y almidón; este último tiene aportes energéticos importantes para los seres humanos y es fuente de materias primas para la industria alimentaria, tanto humana como pecuaria (SAGARPA, 2017).

3. Composición química del grano de maíz

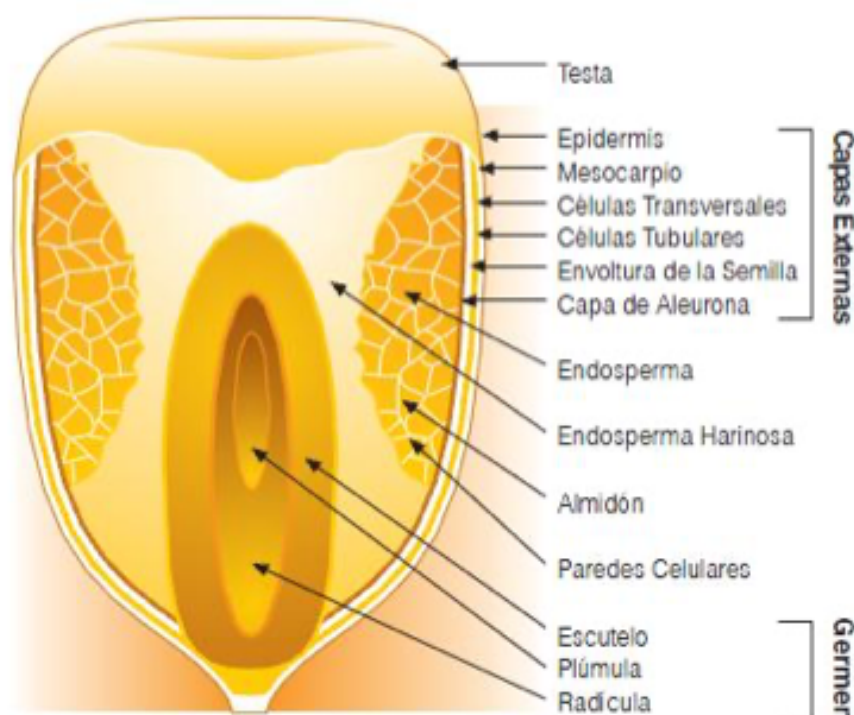


Figura 2: Grano de maíz con las partes que lo constituyen (Aimar Betiana, 2014).

El grano de maíz constituye aproximadamente la mitad de la materia seca de la planta, con exclusión de las raíces; es un fruto compuesto por un pericarpio que encierra una única semilla. Este tipo de fruto, en el cual el pericarpio no se abre para liberar a la semilla, es característico de los cereales y se conoce como cariósipide. En el grano de maíz existen tres partes bien diferenciadas: pericarpio, endospermo y germen. El componente mayoritario es el endospermo, con aproximadamente 85% en peso, seguido por el germen, 10% en peso, y finalmente el pericarpio, 5% en peso (Brites, *et al*, 2007), la Figura 2 muestra con detalle el grano de maíz con cada una de las partes que lo componen.

El grano de maíz está formado por fibra, proteína, almidón, grasa (Bartolo-Pérez, 1999) y otros componentes, entre los cuales destacan los compuestos fenólicos, por sus niveles y su actividad (Atanasova-Penichon *et al*, 2016). La Tabla 2 presenta los contenidos porcentuales aproximados de proteínas, grasas (extracto etéreo), fibra, minerales (cenizas), almidones y azúcares por fracción del grano.

Tabla 2: Composición química proximal promedio de las partes principales de los granos de maíz (FAO, 1993).

Componente químico	Pericarpio	Endospermo	Germen
Proteínas	3.7 %	8.0 %	18.4 %
Extracto etéreo	1.0 %	0.8 %	33.2 %
Fibra cruda	86.7 %	2.7 %	8.8 %
Cenizas	0.8 %	0.3 %	10.5 %
Almidón	7.3 %	87.6 %	8.3 %
Azúcar	0.34 %	0.62 %	10.8 %

4. Pericarpio: estructura y composición química

La estructura más externa del grano se denomina pericarpio, su grosor varía dependiendo del genotipo y oscila entre 25 μm y 140 μm , representando alrededor del 5% - 6% del peso total. Está formado por un conjunto de capas discontinuas, firmemente adheridas unas a otras, entre éstas se distinguen cuatro: epidermis, mesocarpio y las capas de células transversales y tubulares. La superficie externa de la epidermis, llamada cutícula, es rica en cutina y ceras cuticulares (polímeros lipofílicos que la hacen impermeable al agua) (Tafolla-Arellano, *et al*, 2013). La función de la cutícula es evitar la pérdida de humedad durante el desarrollo del grano. El mesocarpio está compuesto por células alargadas de pared gruesa que forman una estructura compacta, prácticamente sin espacios intercelulares, las capas internas de células transversales y tubulares están compuestas de células muertas ricas en celulosa que exhiben numerosos espacios intercelulares porque se contactan parcialmente entre sí. Debido a estas características se genera entre el mesocarpio y las capas internas del pericarpio una línea de debilitamiento a lo largo de la cual se separa fácilmente el pericarpio del resto del grano (Brites, *et al*, 2007; Mansilla, 2018).

El pericarpio se extiende desde la parte superior del grano hasta la base, en donde desaparece la epidermis, confundándose con la zona de unión a la mazorca. El pericarpio es más grueso en la base del grano que en las regiones central y superior, alcanzando su mínimo espesor sobre el germen (Brites, *et al* 2007), se caracte-

riza por un elevado contenido en fibra cruda, aproximadamente el 87%, la que a su vez está formada fundamentalmente por hemicelulosa (67%), celulosa (23%) y lignina (0.1%) (FAO, 1993).

B. Ácidos fenólicos

1. Diversidad Química

Los compuestos fenólicos son metabolitos distribuidos de manera ubicua en plantas superiores, originan una de las clases más importantes de metabolitos secundarios en plantas. Poseen un anillo aromático y contienen uno o más grupos hidroxilo, incluyendo sus derivados funcionales (Shahidi, Naczk, 1995). Se dividen en dos grupos, flavonoides (flavonas, flavonoles, flavanonas, antocianinas y chalconas) (Figura 3A) y no flavonoides (estilbenos, lignanos y ácidos fenólicos) (Figura 3B). La mayoría de estos compuestos se derivan de la fenilalanina y en menor cantidad de la tirosina (Figura 4) (Porrás-Loaiza, López-Malo, 2009).

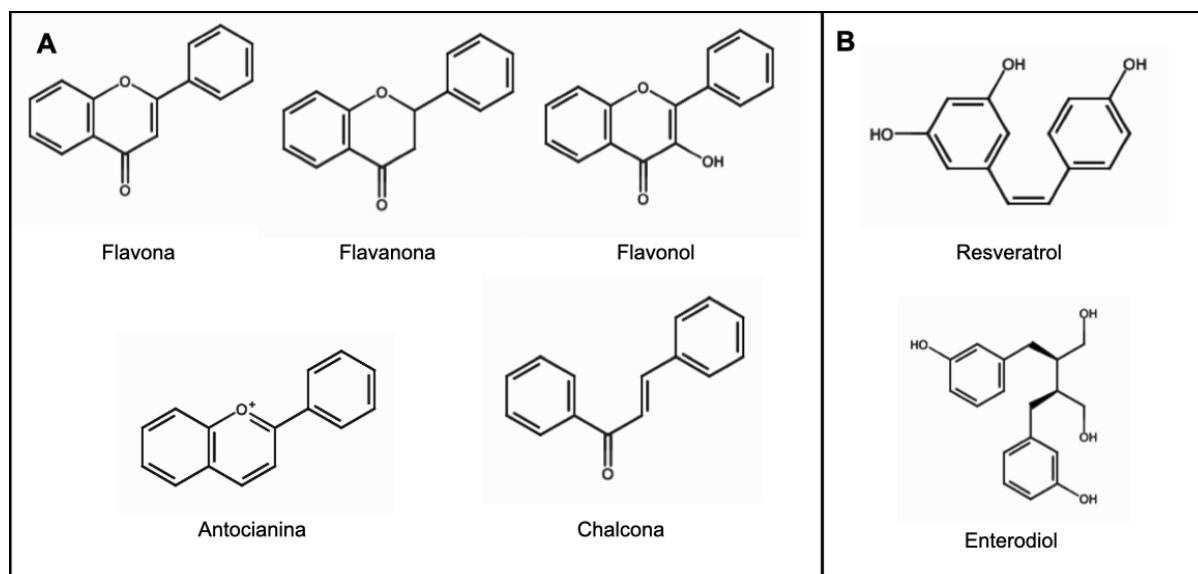


Figura 3: Compuestos fenólicos presentes en plantas. A) Estructuras representativas del grupo de los flavonoides. B) Estructuras representativas del grupo de los no flavonoides, exceptuando ácidos fenólicos (Resveratrol como estilbeno y Enterodiol como lignano). Estructuras dibujadas y tomadas de: <https://www.fishersci.es/es/es/search/chemical/substructure.html>

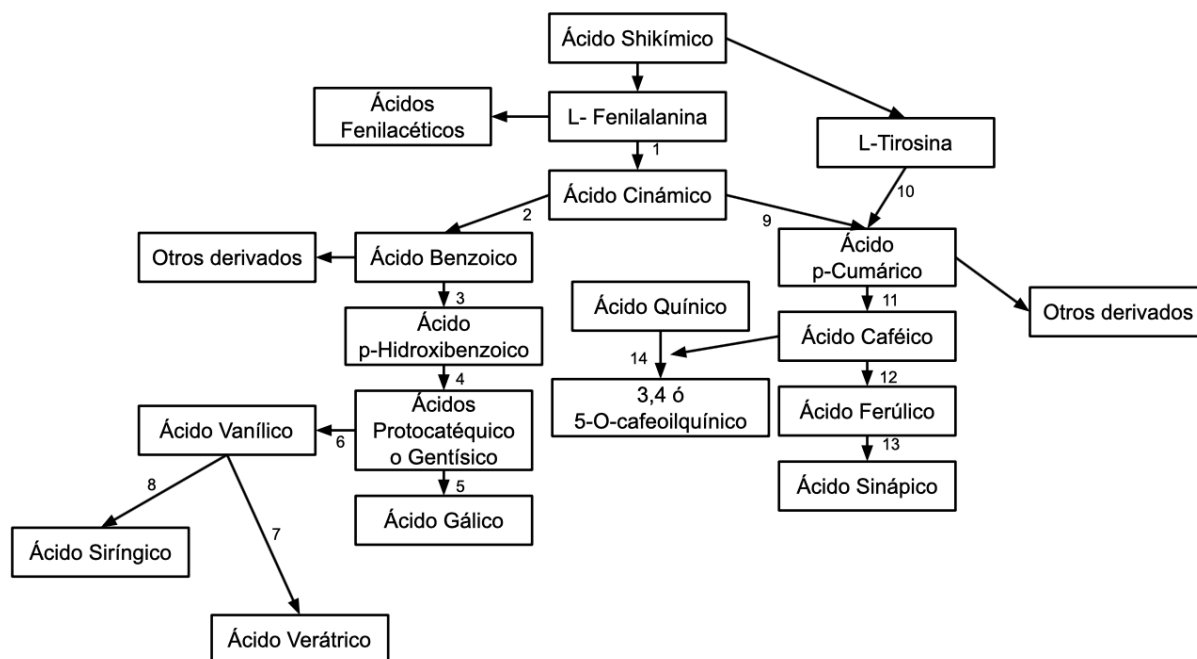


Figura 4: Esquema de los derivados fenólicos por la vía del ácido shikímico. **1.** Fenilalanina amonio liasa, sale NH_3 , **2.** Oxidasa, sale C_2H_4 , **3.** Ácido benzoico 4-hidroxilasa, entra OH , **4.** Ácido p-hidroxibenzoico 3-hidroxilasa, entra OH , **5.** Ácido protocatéquico 5-hidroxilasa, entra OH , **6.** Ácido protocatéquico 3-O-metiltransferasa, entra CH_3 , sale H , **7.** Ácido vanílico 4-O-metiltransferasa, entra CH_3 , sale H , **8.** Ácido vanílico 5-hidroxilasa y Ácido vanílico 5-O-metiltransferasa, entra OCH_3 , **9.** Ácido cinámico 4-hidroxilasa, entra OH , **10.** Tirosina amonio liasa, sale NH_3 , **11.** Ácido p-Cumárico 3-hidroxilasa, sale OH , **12.** Ácido caféico 5-hidroxilasa, entra CH_3 , sale H , **13.** Ácido ferúlico 5-hidroxilasa y Ácido caféico/5-hidroxiferúlico O-metiltransferasa, entra OCH_3 , **14.** 4-cafeato CoA ligasa y quinato O-hidroxicinamoil transferasa, (Tomado y editado de Heleno, *et al*, 2015).

Dentro del grupo de los compuestos no flavonoides, los ácidos fenólicos son predominantes en cereales, son derivados del ácido benzoico o del cinámico (Figuras 5B y 5C). Los ácidos fenólicos existentes en cereales se encuentran tanto de forma soluble (libre) e insoluble (unidos a la pared celular), tienen fuerte actividad antioxidante y para algunos de ellos se ha demostrado actividad antifúngica (Atan-sova-Penichon, *et al*, 2016; Vázquez-Olivo, *et al*, 2019).

En el pericarpio de maíz, el ácido ferúlico (AF) es el compuesto mayoritario, forma homodímeros llamados dehidrodímeros de ácido ferúlico (Figura 5D), éstos compuestos son fuertes antioxidantes y se encuentran unidos mediante enlaces éster a los polímeros de pared celular (Atanasova-Penichon, 2012), principalmente con el polímero de lignina, el cual recientemente se caracterizó como antioxidante (Vazquez-Olivo, et al, 2019). Los niveles más altos de los dehidrodímeros de ácido ferúlico en los granos de cereales se encuentran entre 250 y 475 µg/g (Atanasova-Penichon, *et al*, 2016).

Los ácidos fenólicos comúnmente existen como ésteres, glicósidos o amidas en la naturaleza, pero no en su forma libre. El factor determinante en las propiedades de los ácidos fenólicos es el número y la localización de los grupos hidroxilo en el anillo aromático (Teodoro, *et al*, 2015), algunos estudios en ácidos cinámicos han demostrado la importancia del grupo catecol (dihidroxibenceno) para la eficacia de la actividad antiradical (capacidad de un compuesto de eliminar radicales libres al donarles un hidrógeno), ya que aportan mayor estabilidad a la molécula (Silva, *et al*, 2000), en el caso de las moléculas que contienen el grupo catecol, los radicales fenoxilo formados al donar un protón se estabilizan formando quinonas (Figura 6), esto no se ve favorecido en compuestos como el ácido ferúlico, ya que el grupo metoxilo en la posición orto al hidroxilo interfiere con la capacidad de formar el doble enlace con el oxígeno deficiente. Los radicales fenoxilo también facilitan la dimerización (Figura 5D) (Anouar, *et al*, 2009).

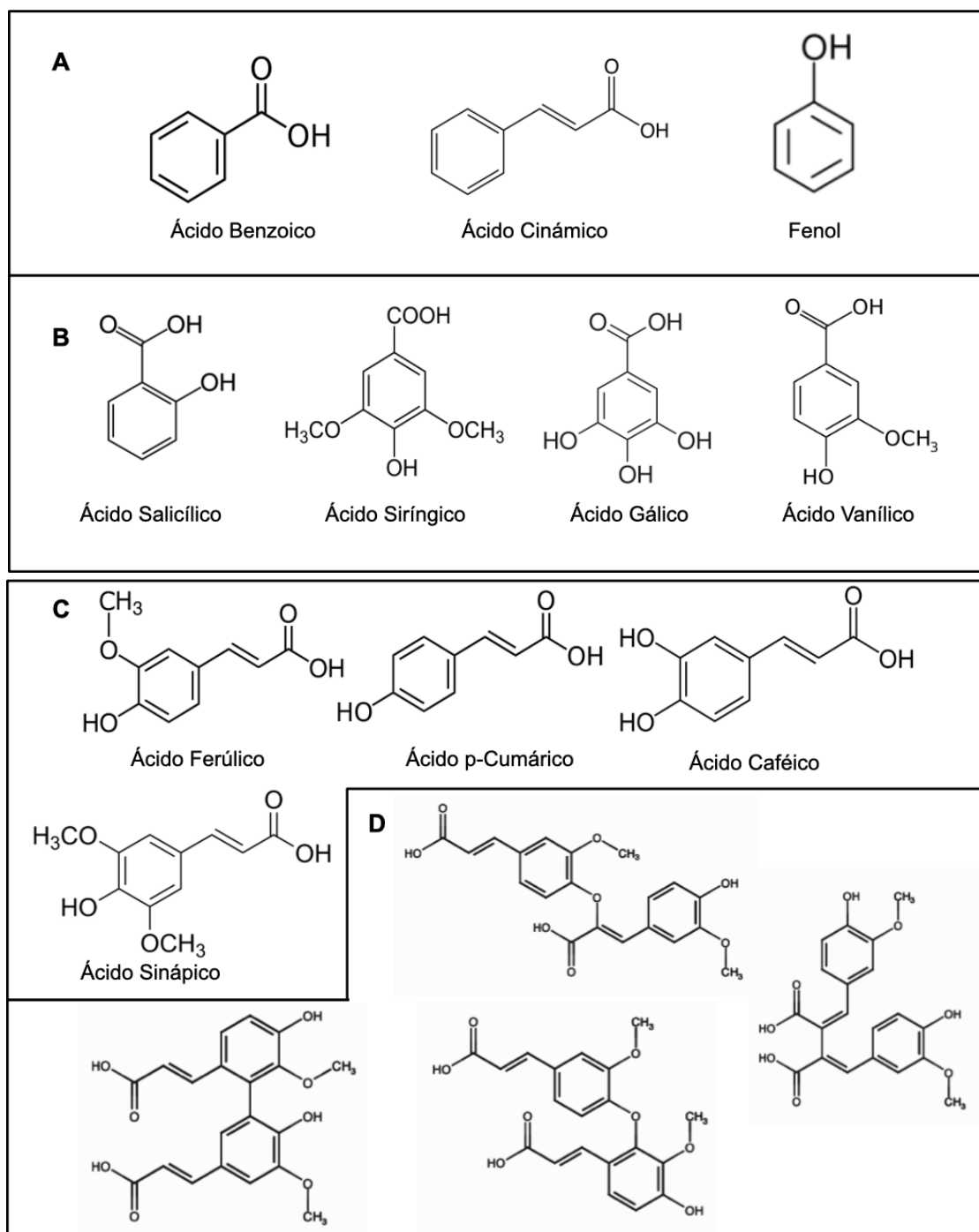


Figura 5: Estructuras de algunos ácidos fenólicos importantes presentes en plantas. A) Estructuras del fenol (estructura base de los ácidos fenólicos) y de los ácidos benzoico y cinámico, precursores de los ácidos fenólicos. B) Ácidos fenólicos derivados del ácido benzoico que se encuentran presentes en las plantas. C) Ácidos fenólicos derivados del ácido cinámico que se encuentran presentes en las plantas. D) Estructuras de algunos dehidrodímeros de ferúlico (Anouar, *et al*, 2009). Estructuras dibujadas y tomadas de: <https://www.fishersci.es/es/es/search/chemical/substructure.html>.

2. Funciones de los compuestos fenólicos en plantas

Los compuestos fenólicos son metabolitos esenciales para el crecimiento y reproducción de las plantas y actúan como agentes protectores frente a patógenos, siendo secretados como mecanismo de defensa a condiciones de estrés, tales como infecciones, radiaciones UV, entre otros. Tienen una función vital en las plantas como precursores para la síntesis de la lignina (Muñoz Jáuregui, *et al*, 2007), la composición de la lignina no es completamente clara debido a la complejidad de su aislamiento, pero los monómeros canónicos de los que típicamente está compuesta son: alcohol p-cumárico no metoxilado, alcohol coniferílico monometoxilado y el alcohol sinápico dimetoxilado, que respectivamente forman las unidades H (hidroxifenil), G (guayaquil) y S (siringil) en el polímero, unidos mediante enlaces tipo éter β -O-4, éstas unidades se forman a partir de algunos ácidos fenólicos desde la vía del ácido shikímico (Barros, *et al*, 2015). Asimismo, los compuestos fenólicos protegen a las macromoléculas de las células vegetales contra la radiación UV solar ya que tienen una alta absorción en el rango entre 195 a 400 nm (Reuber, *et al*, 1996).

Los ácidos fenólicos, como el ácido ferúlico y el ácido gálico, tienen actividad antimicrobiana pues son capaces de interferir con las membranas celulares de bacterias Gram positivas y Gram negativas, ya que inducen un cambio en la hidrofobicidad y carga de la superficie celular, causando una fuga del contenido citoplásmico. También es importante señalar que los antifúngicos poliénicos (compuestos que tienen dos o más dobles enlaces en su estructura, como los ácidos fenólicos) también causan filtración de los contenidos celulares mediante la unión directa con el ergosterol, distorsionando la función de la membrana (Teodoro, *et al*, 2015).

El modo de acción de los compuestos fenólicos mejor caracterizados aportan pistas para deducir el mecanismo de acción de algunos de ellos; por ejemplo, la isoquercetina, curcumina y lariciresinol pueden dañar la membrana celular, por otro lado, el eugenol y metileugenol causan reducción considerable en la biosíntesis de ergosterol y subsecuentemente afecta la membrana celular, efecto similar al de la epigalocatequina-3-galato, timol y carvacrol, estos efectos se han observado contra levaduras como *Candida* sp. (Teodoro, *et al*, 2015), también son fuertes antioxidantes y actúan como inhibidores de enzimas fúngicas (Ferrochio, *et al*, 2013).

3. Actividad Antioxidante

La actividad antiradical de los compuestos fenólicos depende de su estructura molecular, en particular a la deslocalización de los electrones en el núcleo aromático y de la disponibilidad de hidrógenos fenólicos y en la posibilidad de la estabilización de los radicales de fenoxilo resultantes de la donación de los protones, muchos ácidos fenólicos son conocidos por ser potentes antioxidantes, probablemente mediante su actividad de secuestrante de radicales. Cuando estos compuestos reaccionan con los radicales libres, generan un nuevo radical que se estabiliza mediante el efecto de resonancia en el núcleo aromático (Figura 6A), y en el caso de los ácidos hidroxicinámicos, como AF, también ocurre resonancia en la cadena alifática (Figura 6B), siendo posibles para éste último caso los mecanismos propuestos en la Figura 6A y 6B (Cuvelier, *et al*, 1992; Silva, *et al*, 2000).

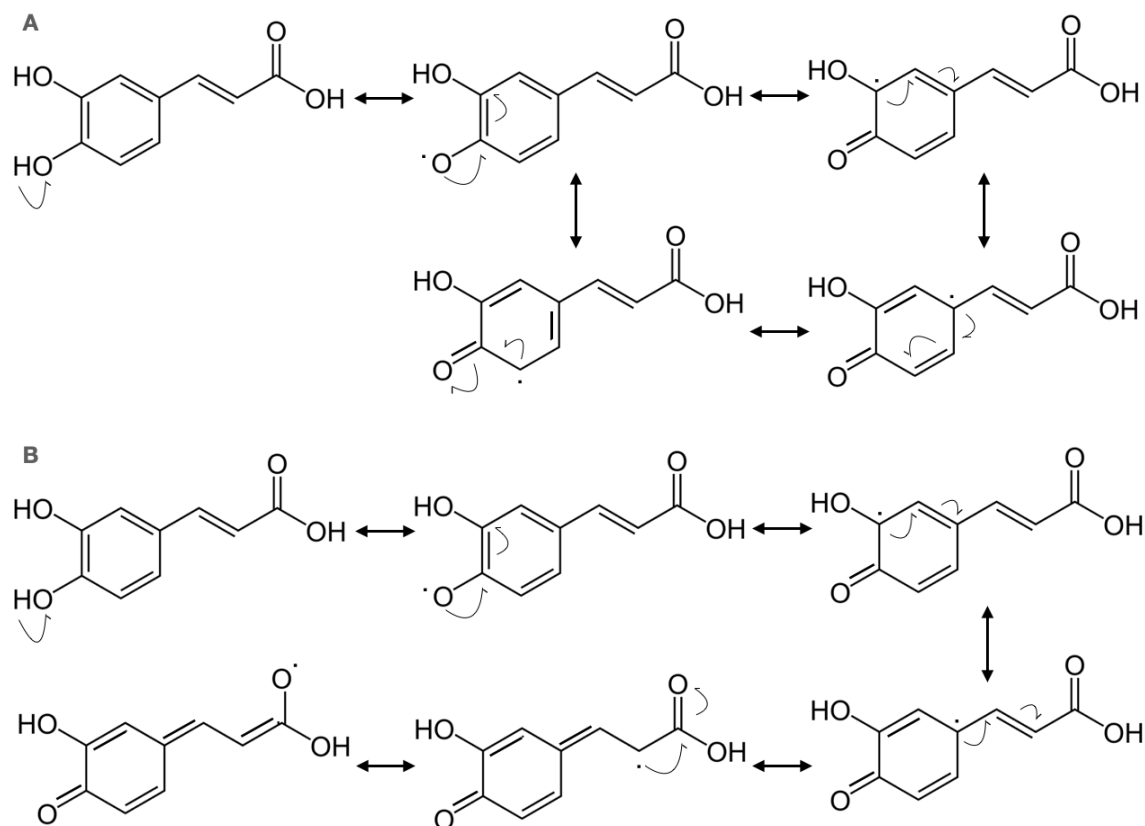


Figura 6: Representación de las estructuras resonantes del ácido ferúlico al donar un protón a un radical libre. A) Movimiento del electrón a través del anillo aromático. B) Movimiento del electrón a través de la cadena alifática.

Los ácidos fenólicos consisten en dos grupos: los ácidos hidroxibenzoicos y los ácidos hidroxicinámicos (Figura 5B y 5C). Debido a que la presencia de más de un grupo hidroxilo y una mayor separación del grupo carbonilo al anillo aromático aumentan la capacidad antioxidante de estos compuestos, los ácidos hidroxicinámicos presentan mayor actividad antioxidante que los ácidos hidroxibenzoicos (Peñarrieta, *et al*, 2014).

Los ácidos hidroxibenzoicos son compuestos que presentan un grupo carboxílico y grupos hidroxilo en un anillo aromático, los ácidos hidroxicinámicos (entre los que se encuentra el AF), se caracterizan por la presencia del grupo $\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$ en reemplazo del grupo COOH presente en los ácidos hidroxibenzoicos. El doble enlace carbono ($\text{C}=\text{C}$) de la cadena aumenta la resonancia química, que puede ser

descrita como una deslocalización de los electrones en los enlaces π estabilizando los radicales libres y por lo tanto, incrementa la capacidad antioxidante de la molécula (Figura 6B) (Peñarrieta, *et al*, 2014). Este comportamiento antioxidante de los compuestos fenólicos parece estar relacionado con su capacidad de quelar metales, ya sea manteniendo o incrementando su actividad catalítica o reduciéndolos (Porrás-Loaiza, López-Malo, 2009).

Los compuestos fenólicos son considerados los mayores contribuyentes a la capacidad antioxidante total de los granos de cereales, en el maíz se ha encontrado que varias partes de la planta tienen capacidad antioxidante, la comparación entre diferentes órganos demostró que el pericarpio de maíz es el que contiene mayor cantidad de compuestos fenólicos (Vázquez-Olivo, *et al*, 2019), en la tabla 3 se muestran los contenidos de algunos compuestos fenólicos en pericarpio de maíz, divididos entre las fracciones ligada y soluble, así como la actividad antioxidante que presentan.

Diferentes estudios han mostrado que los radicales libres presentes en el organismo humano causan daño oxidativo a diferentes moléculas, tales como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos y tiene que ver en la iniciación de algunas enfermedades degenerativas. El consumo de componentes antioxidantes en la dieta contribuye a neutralizar radicales libres, y pueden tener una actividad importante en la modulación de detoxificación enzimática, estimulación del sistema inmune, disminución de la agregación plaquetaria y modulación del metabolismo hormonal (Muñoz Jáuregui, *et al*, 2007).

Tabla 3: Contenido de fenoles y ácidos fenólicos en salvado de maíz y su actividad antioxidante (Urías-Orona, *et al*, 2016).

Fracción	Fenoles Totales (μg Eq. de AF/ g)	Ácido Ferúlico ($\mu\text{g/g}$)	Ácido Cumárico ($\mu\text{g/g}$)	Ácidos Diferúlicos	Actividad Antioxidante (DPPH) (% de inhibición)
Soluble	3,027 \pm 291	24 \pm 0.52	18 \pm 1.90	Ausencia	21.14 \pm 1.84
Ligada	9718 \pm 1630	4527 \pm 341	664 \pm 110	Presencia	64.95 \pm 5.40

C. *Fusarium verticillioides*

1. Taxonomía y características generales

Fusarium verticillioides es un hongo ascomiceto ubicuo, perteneciente a la subdivisión Deuteromycota (De la Torre-Hernández, *et al*, 2014), es una especie toxigénica y la principal toxina que produce es la fumonisina B1 (FB1). La taxonomía de este género es sumamente compleja y ha estado sujeta a múltiples revisiones basadas en distintos criterios. La clasificación, propuesta por Wollenweber y Reinking, basada en aspectos morfológicos y coloniales, reconocen 65 especies de *Fusarium*, agrupadas en 16 secciones. Cada sección incluye especies con características comunes, y algunas como *F. verticillioides* pertenece a la sección Liseola (especies de *Fusarium* que producen microconidias en cadenas y/o falsas cabezas y macroconidias, pero que no producen clamidosporas) (Leslie y Summerell, 2006), que incluye a otras especies como; *F. thapsinum*, *F. proliferatum* y *F. subglutinans* (Nelson, *et al*, 1983). La revisión más reciente incluye a *F. verticillioides* como miembro del complejo *Fusarium fujikuroi*, el cual incluye varias especies morfológicamente diversas. Este complejo de especies está dividido en los clados americano, asiático y africano, con *F. verticillioides* posicionado filogenéticamente en el clado africano, basado en análisis multilocus (Blacutt, *et al*, 2018).

Como Deuteromiceto, *F. verticillioides* presenta una fase sexual o forma perfecta (teleomórfica), que es muy difícil de observar en la naturaleza y se requieren condiciones especiales para observarla *in vitro*. Esta forma de reproducción sexual

corresponde a *Gibberella moniliformis*, que es una especie heterotálica, ya que el apareamiento ocurre entre colonias de distintos grupos. En el estado anamorfo, o de reproducción asexual, hay abundante producción de microconidias; éstas son células ovaladas con la base aplanada y agrupadas en cadenas, (Figuras 7A y 7B). Algunas cepas también generan macroconidias, que son alargadas y delgadas, con cinco o seis septos. Las macroconidias tienen dos células características: una apical, que es curva, y otra basal, en forma de pie. Este tipo de conidias se producen con estructuras que aparentan racimos denominados esporodoquios. Aunque *F. verticillioides* no produce clamidoconidias, hay células contenidas en una hifa engrosada que pueden ser confundidas como tales. Las características y la morfología de la colonia de esta especie varían de acuerdo con el medio de cultivo. Por ejemplo, en agar papa-dextrosa (PDA), el micelio es blanco al inicio, y forma pigmentos que van desde gris hasta violeta (Figuras 7C-D). En cambio, en algunos cultivos ya envejecidos, la hifa del hongo produce melanina para conformar estructuras llamadas esclerocios (De la Torre-Hernández, *et al*, 2014).

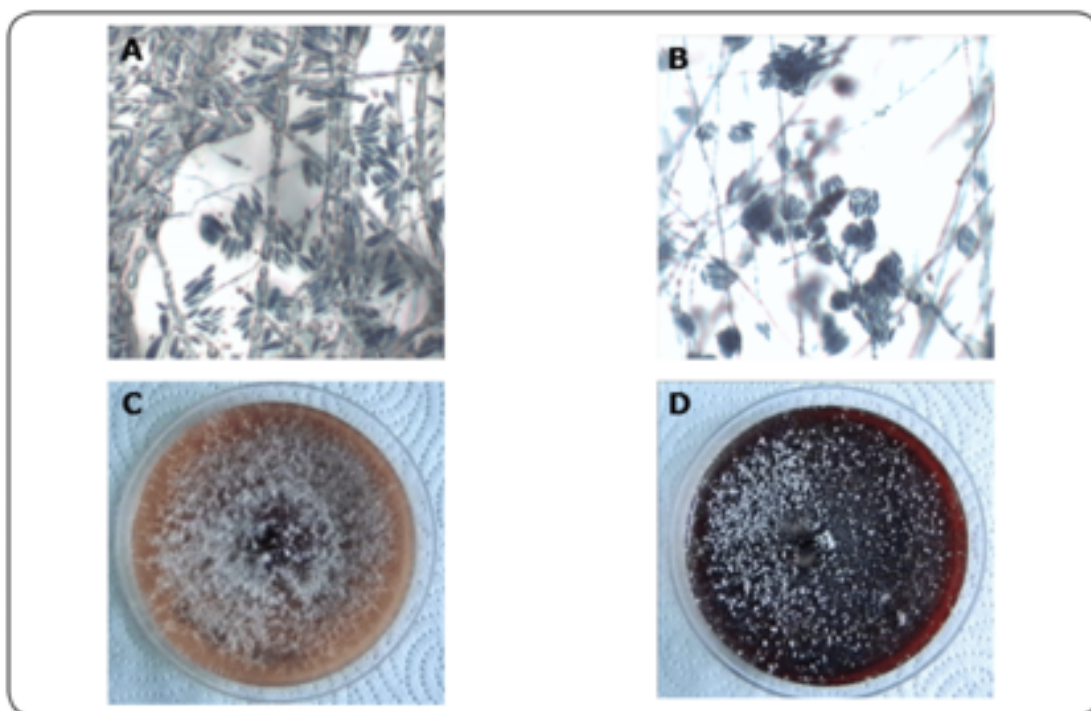


Figura 7: Características morfológicas y de colonias de *Fusarium verticillioides*. Microconidias de *F. verticillioides* producidas en esporodoquios (A) y en cadenas (B). Cultivos de *F. verticillioides* en agar papa-dextrosa (C-D), (De la Torre-Hernández, *et al*, 2014).

2. *F. verticillioides* como patógeno del maíz. Pudrición de mazorca y semilla.

El maíz, como todos los cultivos, es susceptible a la infección por múltiples microorganismos patógenos que incluyen a los hongos. *Fusarium* spp. contiene varias especies responsables de enfermedades como la pudrición de la mazorca, una de las enfermedades de maíz más importantes, debido a las pérdidas que produce anualmente (Picot, et al, 2010), de entre éstas, *F. verticillioides* y *F. proliferatum* son especialmente importantes ya que ocurren a nivel mundial y son productoras de micotoxinas (Ferrochio, et al, 2013).

F. verticillioides puede colonizar al maíz a través de distintas rutas de entrada: las conidias que sobreviven en el suelo pueden infectar la raíz de una plántula que está en desarrollo, el patógeno crece en la superficie de la raíz y puede causar pudrición de ésta si las condiciones son propicias y el inóculo es abundante y, luego, sobrevive como saprófito en el rastrojo. También, los insectos pueden acarrear las conidias del hongo hacia tallo o mazorca y las heridas que causen éstos constituyen una vía de entrada para el patógeno. Sin embargo, durante las etapas tempranas de la infección el hongo adquiere una base biotrofa, al grado de que puede sobrevivir como endófito en la semilla, las conidias y el micelio del hongo pueden diseminarse hacia las mazorcas en formación donde pueden colonizar de manera asintomática durante el desarrollo de la planta, y es capaz de provocar pudrición en órganos como la raíz, el tallo y la mazorca, este ciclo se puede observar con detalle en la Figura 8. Tal circunstancia resulta de la compleja interacción entre varios factores como son la virulencia de la cepa, el genotipo y la etapa del desarrollo del maíz, así como las condiciones ambientales. El clima caliente y húmedo favorece la pudrición de la mazorca durante el periodo de llenado del grano (de la Torre-Hernández, et al, 2014; Blacutt et al, 2018).

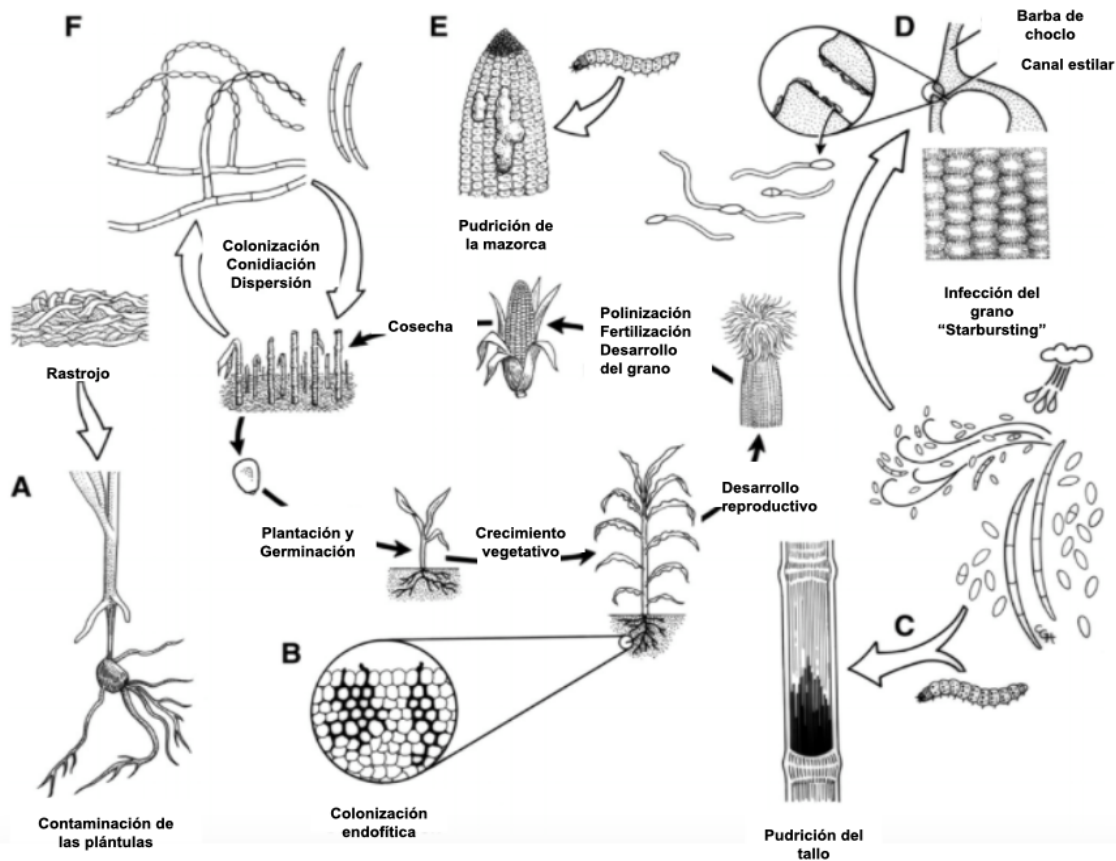


Figura 8: El ciclo de infección de *F. verticillioides*, centrado en el ciclo de vida del maíz. **A.** La semilla que germina en suelo infestado con *Fusarium* puede desarrollar infección en las plántulas. **B.** La colonización endofítica ocurre bajo condiciones que no favorecen a la infección. **C.** Las lesiones en tallo provocadas por daño mecánico o ataque de insectos se vuelven puntos de acceso para *F. verticillioides* y pueden derivar en pudrición del tallo. **D.** En el estado de floración, el hongo puede colonizar los granos de maíz a través del canal estilar, dando origen a los patrones tipo "starburst". **E.** Los insectos pueden alimentarse de varios órganos de la planta, causando heridas que se vuelven vías de entrada para el patógeno. **F.** Después de la cosecha, el hongo puede sobrevivir y esporular en el residuo. Tomado y editado de Blacutt, *et al*, 2018.

La resistencia de las plantas a *Fusarium* y a sus micotoxinas es un mecanismo altamente complejo. Se han clasificado cinco grandes tipos de resistencia para trigo y son aplicables también a cebada y maíz, sin embargo, los mecanismos asociados a uno de estos cinco tipos pueden ser específicos para cada hospedero. La resistencia de tipo I en maíz se asocia a la resistencia en el rastrojo, la resistencia de tipo II limita la extensión de la infección en el hospedero, la resistencia tipo III es

referente a la infección en los granos, la tolerancia tipo IV se refiere a la habilidad de mantener el rendimiento y finalmente la resistencia de tipo V reúne todos los mecanismos de resistencia ante la acumulación de micotoxinas (Boutigny, *et al*, 2008). Se ha propuesto dividir la resistencia tipo V en dos componentes, el primero, llamado tipo V-1, representa la resistencia a la acumulación de toxinas mediante transformación metabólica incluyendo la modificación bioquímica catalizada por enzimas como UDP-glicosiltransferasas, glutatión-S-transferasas o citocromo P450 monooxigenasas, el segundo tipo (V-2) corresponde a la inhibición de la síntesis de micotoxinas mediante la acción de los compuestos endógenos de la planta, estos compuestos incluyen tanto los compuestos constitutivos y los compuestos inducidos en respuesta a la infección (Atanasova-Penichon, *et al*, 2016).

D. Fumonisin

1. Diversidad química estructural

La infección por *F. verticillioides* no sólo merma el cultivo por el tizón de plántulas y pudrición de mazorca y granos, sino que también lo contamina por la capacidad que tiene producir micotoxinas (Sampietro, *et al*, 2013). Esta especie sintetiza varias toxinas, pero las principales, por los niveles de producción, son las fumonisinas, de las cuales se han identificado una variedad de análogos (alrededor de 60), siendo la más abundante la FB1, seguida por las fumonisinas B2 y B3 (Dall'Asta, *et al*, 2012).

Las fumonisinas son micotoxinas derivadas de policétidos (Picot, *et al*, 2010), cuya estructura química consiste en un esqueleto de aminopentol y dos cadenas de ácido tricarbálico con uno o más grupos hidroxilo (Picot, *et al*, 2010).

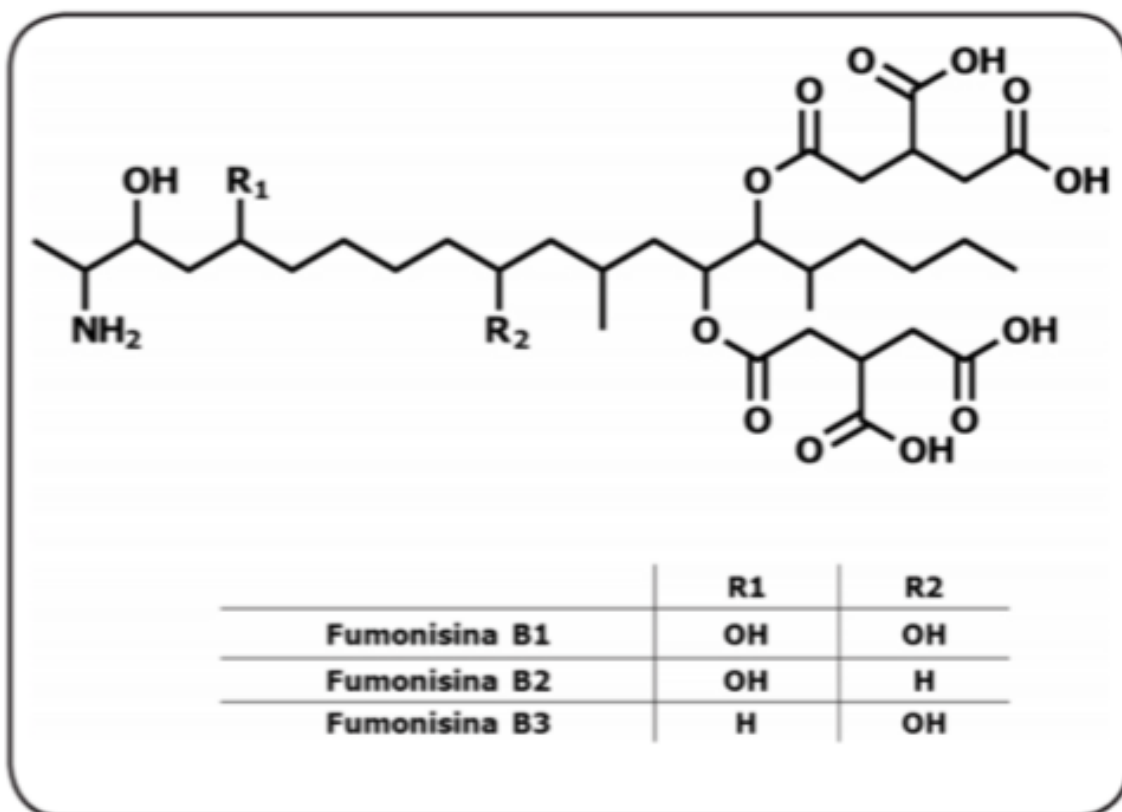


Figura 9: Estructura química de las fumonisinas del grupo B (De la Torre-Hernández, *et al*, 2014).

La figura 9 muestra la estructura general de las fumonisinas pertenecientes a la serie B, las diferencias entre estas son las hidroxilaciones en C-5 y C-10, siendo la FB1 la que presenta hidroxilaciones en ambas posiciones, la FB2 una hidroxilación en la posición 5 y la FB3 la presenta en la posición 10. Las fumonisinas de las series A y C difieren de las fumonisinas de la serie B en la acetilación del grupo amino y la carencia del grupo metilo terminal en C-1, respectivamente (Blacutt, *et al*, 2018).

2. Propiedades

Las fumonisinas son solubles en agua, acetonitrilo-agua o metanol, estables en agua y acetonitrilo-agua (1:1) e inestables en metanol, (Ariño Moneva, *et al*, 2008) son estables al calor, por lo que el tratamiento térmico que reciben los alimentos es insuficiente para la eliminación total de esta micotoxina, por esta razón, se debe prevenir la infección desde el cultivo (Picot, *et al*, 2013). Algunos modos de cocción pueden causar la acilación del grupo amino primario de la FB1 o la remo-

ción de los grupos tricarbálicos vía hidrólisis alcalina, como ocurre durante la nixtamalización, lo que reduce significativamente la toxicidad (Blacutt, *et al*, 2018). De igual manera, la tecnología de extrusión usada en la industria productora de cereales para desayuno, botanas y alimentos para animales, y durante la cual la harina de maíz se somete a alta presión a temperaturas que varían entre los 100 y 200 °C y a una humedad entre el 13 y 30%, disminuye significativamente las fumonisinas, en especial bajo condiciones de poca humedad (Torres-Sánchez & López-Carrillo, 2010).

3. Incidencia en maíz

Aunque muchos cultivos son susceptibles a la infección de hongos micotóxicos, los cereales son de especial cuidado debido a la frecuencia con la que se presentan altos niveles de micotoxinas en ellos y su uso común en alimentos sin procesamiento o procesados (Blacutt, *et al*, 2018).

Las fumonisinas son las micotoxinas más abundantes en el maíz, existen en niveles biológicamente significativos tanto en los granos como en los productos derivados de maíz destinados a la alimentación humana y animal (Ferrigo, *et al*, 2015). Debido a este problema muchas agencias oficiales como la JECFA (Join Expert Committee on Food Additives) (FAO/OMS), la FDA y la Unión Europea han establecido límites de fumonisinas de 4 ppm en maíz y productos derivados destinados para consumo humano (Sampietro, *et al*, 2013), en México no existen documentos oficiales que establezcan el límite de fumonisinas en cereales, sin embargo la NOM-247-SSA1-2008 establece un límite máximo de 20 ppm de aflatoxinas en cereales para consumo humano.

Las concentraciones de fumonisinas reportadas en la mayoría de los estudios superan por mucho estos niveles recomendados para el maíz destinado a la producción de tortillas o masa (Torres-Sánchez, López-Carrillo, 2010). Los niveles de fumonisinas reportados en el 2019 por región en el mundo en maíz y en productos de cereales terminados demuestran que, si bien, el promedio de muestras cumple con el límite máximo establecido de 4 ppm (4,000 ppb), en América y Asia se encuentran niveles más altos de fumonisinas en materia prima con respecto del resto del mundo. Asimismo, a nivel mundial, se encuentran niveles inferiores en productos

terminados, posiblemente debido al proceso al que se somete al maíz contaminado, sin embargo, los niveles máximos que se encontraron en todos los casos exceden la normativa establecida; a nivel mundial también se reporta que la cantidad de muestras contaminadas supera, en todos los casos, el 50% de muestras, lo cual indica una alta prevalencia del problema de contaminación en alimentos de maíz (Tabla 4).

Tabla 4: Niveles de Fumonisinias en alimentos de cereales y en maíz a nivel mundial (BIOMIN, 2019). (*MP: Materia Prima).

Región	Producto	Nivel máximo (ppb)	Promedio (ppb)	% Muestras Contaminadas
Europa y Rusia	Producto Terminado	11,210	358	71
	Maíz (MP*)	297,300	1,475	73
Canadá y E.E.U.U.	Producto Terminado	18,849	1,807	55
	Maíz (MP)	72,950	2,839	78
Latinoamérica	Producto Terminado	304,349	1,846	85
	Maíz (MP)	170,300	3,177	90
Asia	Producto Terminado	41,471	1,142	98
	Maíz (MP)	40,090	2,083	100
Medio Oriente y Norte de África	Producto Terminado	4,324	474	97
	Maíz (MP)	6,559	1,440	47
África	Producto Terminado	4,085	397	90
	Maíz (MP)	14,346	741	78

4. Actividad biológica

Las agencias reguladoras de alimentos le han prestado una mayor atención a las fumonisinas, especialmente a la FB1, por ser la más abundante y porque presenta efectos inmunotóxicos, neurotóxicos, hepatotóxicos, nefrotóxicos y carcinogénicos en animales (Dambolena, *et al*, 2011). Asimismo, se ha documentado que las fumonisinas pueden unirse a proteínas o a componentes alimentarios de manera no covalente mediante complejación supramolecular, para luego ser liberadas en el estómago (Dall'Asta, *et al*, 2012).

La fumonisina es un análogo estructural de la esfinganina, la cual es una molécula precursora de la síntesis de ceramida. El mecanismo de acción de FB1 que le confiere toxicidad celular, es que inhibe competitivamente la actividad de la ceramida sintasa y esta acumulación provoca la acumulación de bases esfingoideas como: (i) esfinganina, (ii) esfingosina, (iii) fitoesfingosina y (iv) esfinganina 1-fosfato, además, la inhibición de la ceramida sintasa resulta en la reducción de los niveles de esfingolípidos complejos derivados de la ceramida. El resultado final es una disrupción generalizada de las vías de señalización dependientes de esfingolípidos y de funciones fisiológicas. Se ha comprobado que la inhibición de la ceramida sintasa y los perfiles alterados de esfingolípidos en tejidos preceden las toxicidades que se han demostrado en animales, es decir, el metabolismo alterado de esfingolípidos ocurre previo a, o a menores concentraciones que la batería de toxicidades, y el grado de disrupción metabólica y la severidad toxicológica están ampliamente relacionados (Blacutt, *et al*, 2018).

Las consecuencias de su consumo en humanos no se han establecido, aunque existe evidencia epidemiológica que asocian la presencia de *F. verticillioides* y las fumonisinas con una mayor incidencia de cáncer esofágico y defectos de desarrollo del tubo neural en recién nacidos (Marasas, 2001; OMS, 2018). En animales sí se ha demostrado que el consumo de fumonisinas en la dieta produce leucoencefalomalacia en equinos y edema pulmonar e hidrotórax en porcinos (Picot, *et al*, 2010).

La inhibición de la ceramida sintasa que sigue a la exposición a fumonisinas ocurre en todos los mamíferos, aves y especies marítimas en las que se ha probado hasta la fecha, y también en plantas, como el maíz (Sánchez-Rangel y Plasencia, 2010; Blacutt, *et al*, 2018).

5. Biosíntesis de fumonisinas

a. Locus *FUM* y ruta biosintética

La producción de fumonisinas está determinada por la presencia de un conjunto de 16 genes contiguos y coexpresados, (Blacutt, *et al*, 2018) que están contenidos en el locus *FUM* y comprende una región de aproximadamente 46 kpb en el cromosoma 1 de *F. verticillioides*, (Picot, *et al*, 2010). Los genes codifican las enzimas involucradas en la síntesis de la toxina y de otras proteínas que median la secreción y resistencia a la misma (De la Torre-Hernández, *et al*, 2014).

Las fumonisinas se sintetizan a partir de unidades de acetato para formar un policétido lineal dimetilado, que se condensa con el aminoácido *L*-alanina, seguido de hasta cinco reacciones de oxigenación y dos esterificaciones. El primer paso es catalizado por una policétido sintasa (PKS), codificada por el gen *FUM1*. Se trata de una enzima modular que tiene varios dominios catalíticos: β -cetoacil sintasa, acil-transferasa y proteína acarreadora de acilos, responsables de la cadena del policétido. Además del gen *FUM1*, que es esencial para la síntesis de fumonisinas, hay otros genes cuyos productos participan en la síntesis de fumonisinas; el producto del gen *FUM8* es una aminotransferasa que acarrea el grupo amino de la alanina al policétido de 18 carbonos, por medio de la condensación descarboxilativa. Después ocurren oxidaciones en las posiciones C-14 y C-15, posiblemente por la acción del producto del gen *FUM6*. El intermediario 3-ceto se reduce a un grupo hidroxilo por una reductasa codificada por el gen *FUM13* (Figura 10; De la Torre-Hernández, *et al*, 2014).

Los productos de los genes *FUM7*, *FUM10*, *FUM11* y *FUM14* participan en la esterificación de los ácidos tricarbóxicos. Es probable que estos últimos provengan de derivados del ácido cítrico (como el ácido aconítico), pero aún no se demuestra de manera concluyente. El gen *FUM11* codifica un transportador de tricarbóxilatos, mismo que podría estar involucrado en la transferencia de sustratos a través de los diferentes compartimentos celulares. No todos estos genes participan en la biosíntesis; el gen *FUM19* codifica un transportador tipo ABC, que podría actuar en la excreción de la toxina para evitar su acumulación en la célula fúngica. El producto de

FUM21 es un factor de transcripción del tipo Zn(II)-2Cys6, regulador de la expresión de los genes estructurales del locus (De la Torre-Hernández, *et al*, 2014). La figura 10 presenta la estructura del locus *FUM* y el esquema general de la biosíntesis de la FB1.

Además de la presencia del locus *FUM*, la capacidad de producir fumonisinas es afectada por factores ambientales en la interacción *F. verticillioides* – maíz. Por ejemplo, el pH, la relación C:N durante la germinación del maíz, (Picot, *et al*, 2013) la actividad de agua (*aw*) y la temperatura, fuentes de nutrientes y la composición del grano de maíz (Atanasova-Penichon, *et al*, 2016; Dall'Asta, *et al*, 2012).

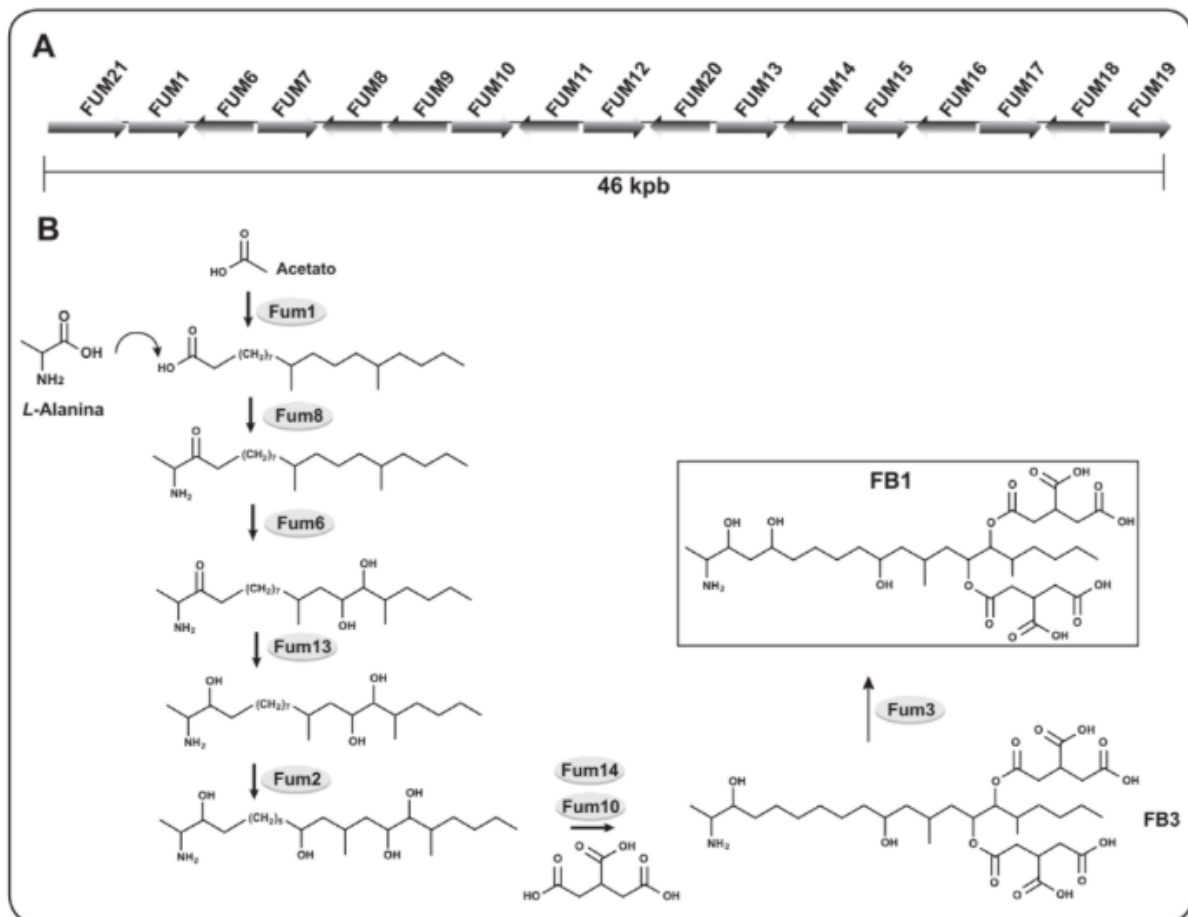


Figura 10: Biosíntesis de fumonisinas. A. Estructura genómica del locus *FUM* en el cromosoma 1 de *F. verticillioides*. B. Ruta biosintética de las fumonisinas. Se indican los pasos en los que participan los productos de los genes del locus *FUM*, (De la Torre-Hernández, *et al*, 2014).

6. Efecto de los compuestos fenólicos sobre la síntesis de fumonisinas

Durante la colonización de una planta de maíz, *F. verticillioides* debe contener con las defensas preformadas e inducidas del hospedero. Entre estas defensas se encuentran los compuestos fenólicos que pueden inhibir la actividad de enzimas hidrolíticas que secretan *F. verticillioides* y *F. proliferatum*, necesarias para la degradación de la pared celular de maíz. Además, algunos de estos compuestos pueden inhibir la síntesis de fumonisinas sin afectar el crecimiento fúngico (Picot, *et al*, 2013).

Algunos compuestos fenólicos tienen un efecto antifúngico, su efecto inhibitorio podría explicarse por la rápida acumulación de éstos en el tejido infectado, inactivando las enzimas fúngicas o fortaleciendo la pared celular de la planta, la cual actúa como defensa mecánica contra el patógeno. Asimismo, los compuestos fenólicos pueden interferir con las membranas celulares, causando una fuga del contenido citoplásmico (Teodoro, *et al*, 2015). *In vitro*, la producción de fumonisina así como de tricotecenos B es inhibida por antioxidantes naturales de plantas (Picot, *et al*, 2013).

El efecto específico de los antioxidantes no se ha dilucidado aún, una hipótesis es que los antioxidantes pueden bloquear alguno de los pasos de la cadena sintética de fumonisinas, dicha ruta tiene muchos pasos oxidativos que requieren una gran cantidad de oxígeno, por lo tanto, podría ser que los compuestos antioxidantes, al limitar la cantidad de oxígeno disponible, inhiba la ruta biosintética. Otra hipótesis es que los compuestos antioxidantes pueden modificar el potencial redox de la célula fúngica, lo cual induce una cascada regulatoria río arriba de la ruta sintética de fumonisina. Alternativamente, los compuestos antioxidantes pueden reducir o suprimir las señales como el estrés oxidativo, que induce la ruta de síntesis de fumonisina. Por ejemplo, el caso del ácido caféico, que induce la expresión de genes de algunas enzimas antioxidantes del hongo, como la alquil-peróxido reductasa, provocando una disminución del estrés oxidativo en el hongo y por lo tanto menor producción de micotoxinas sin afectar el crecimiento fúngico (Picot, *et al*, 2013).

Los antioxidantes también se conocen por inhibir el crecimiento fúngico y la producción de micotoxinas asociada para varias especies toxigénicas del género

Fusarium (Coma, et al, 2011). Se ha encontrado este efecto antifúngico también en especies del género *Aspergillus* y *Penicillium* (Tabla 5).

Tabla 5: Porcentajes de inhibición de algunos ácidos fenólicos contra el crecimiento de hongos patógenos alimentarios. *Inhibición en la concentración más alta probada contra el control o la más baja probada.

Ácido Fenólico	Concentración	Hongo	Inhibición*	Referencia
Ácido Vanílico	500 - 2500 (µg/mL) (aprox. 3 - 14 mM)	<i>Fusarium verticillioides</i>	100%	Samapundo, 2007
Ácido Caféico			100%	
Tetrahidrocurcuminoides	13.4 mM	<i>Fusarium proliferatum</i>	67%	Coma, 2011
Ácido Ferúlico	26.8 mM		29%	
Ácido Cinámico	0.5 - 10 mM	<i>Aspergillus niger</i>	100%	Kim, 2016
		<i>Aspergillus flavus</i>	100%	
	0.5 - 5.0 mM	<i>Penicillium expansum</i>	100%	

Como muestran las tablas 5 y 6, algunos compuestos fenólicos provenientes de plantas son capaces de inhibir el crecimiento fúngico y la producción de micotoxinas, incluyendo fumonisinas, tricotecenos y aflatoxinas, de los hongos patógenos (Samapundo, et al, 2007)

Tabla 6: Porcentajes de inhibición de algunos ácidos fenólicos contra micotoxinas producidas por hongos patógenos alimentarios. *Inhibición en la concentración más alta probada contra el control o la más baja probada. **INRA 117 e INRA 319 son cepas de *Fusarium culmorum*, productoras de TCTB.

Concentración	Ácido fenólico	Micotoxina	Inhibición*	Referencia
Ácido Benzoico	1 (µg/mL) (0.0082 mM)	FB1 de <i>Fusarium verticillioides</i>	1%	Beekrum, 2003
Ácido Caféico	1 (µg/mL) (0.0055 mM)		90%	
Ácido Ferúlico	1 (µg/mL) (0.0051 mM)		90%	
Ácido Vanílico	1 (µg/mL) (0.0059 mM)		90%	
Iroko	1 (µg/mL)		89%	
Maakianina	1 (µg/mL)		91%	
Cloroforina	0.8, 1, 1.45 (µg/mL) (0.0021, 0.0026, 0.0038 mM)		0.8: 88% 1: 94% 1.45: 93%	
Ácido Vanílico	1000 (µg/g)	FB1 de <i>Fusarium verticillioides</i>	100%	Samapundo, 2007
Ácido Caféico	1000, 2000 (µg/g)		99.2%	
Extracto Natural de Trigo	0.1 - 0.5 mM	TCTB: INRA 117	100%	Boutigny, 2009
		TCTB: INRA 319	100%	
Mezcla Reconstituida		TCTB: INRA 117	79%	
		TCTB: INRA 319	14%	
Ácido Ferúlico	0.5, 1 (mM)	FB(1, 2 y 3) de <i>Fusarium verticillioides</i>	0.5: 66% 1: 86%	Picot, 2013
Ácido Ferúlico	0.05, 0.1 (mM)	FB1 de <i>Fusarium verticillioides</i>	0.05: 11% 0.1: < 20%	Martínez-Fraca, 2019

Estudios previos han mostrado que el estrés oxidativo intracelular puede afectar a la producción de aflatoxinas y tricotecenos, también se ha observado una correlación positiva entre estas micotoxinas y la acumulación de especies reactivas de oxígeno. Particularmente en *F. graminearum*, durante el crecimiento *in vitro*, se modularon mediante el estrés oxidativo inducido por H₂O₂ (0.5 y 2.0 mM), tanto la acumulación de micotoxinas como la expresión de los genes TRI, el incremento en la producción de deoxinivalenol estuvo acompañada por un aumento de los genes TRI (genes que regulan la producción de TCT B en *F. graminearum*) en medios suplementados con H₂O₂, estos datos apoyan la hipótesis de que la producción de DON puede ser parte de la respuesta adaptativa contra el estrés oxidativo (Ponts, *et al*, 2007).

En el caso de *F. verticillioides*, se encontró que con algunas cepas, a la concentración de 0.5 mM de AF la cantidad de fumonisinas producida era mayor hasta en un 550%, mientras que en algunas otras cepas se reducía la cantidad de fumonisinas producida hasta en un 84%, a la mayor concentración probada de H₂O₂ se encontró que ambos efectos, tanto la reducción como el aumento de fumonisinas eran menos drásticos. Se ha propuesto que la modulación diferencial de la biosíntesis de toxinas está ligada a la habilidad del hongo de protegerse a sí mismo del daño oxidativo, además, se ha encontrado que dosis subletales de fungicidas, conocidos por desencadenar estrés oxidativo, activan el gen *FUM1* en *F. verticillioides* (Ferrigo, *et al*, 2015).

En respuesta al estrés, tanto biótico como abiótico, las plantas han desarrollado un amplio rango de estrategias para protegerse, estas respuestas pueden incluir la producción rápida de especies reactivas de oxígeno como el anión superóxido (O₂⁻), peróxido de hidrógeno (H₂O₂), radicales hidroxilo (HO⁻) y lipoperóxidos (ROOH). La habilidad de los compuestos fenólicos antioxidantes y de las especies químicas con capacidad de robar oxidantes de disminuir la biosíntesis de micotoxinas *in vitro*, sugieren que pueden estar involucrados compuestos ROS (Ferrigo, *et al*, 2015).

E. Antecedentes inmediatos

En estudios previos en el laboratorio se encontró que *in vitro*, el ácido ferúlico (0.1 mM) causa una inhibición del 50% en la cantidad de FB1 producida por *F. verticillioides*, (Figura 11) y se asoció con la represión de la expresión de dos genes del locus FUM (FUM1 y FUM8) (Martínez-Fraca, 2017, Martínez-Fraca, 2019).

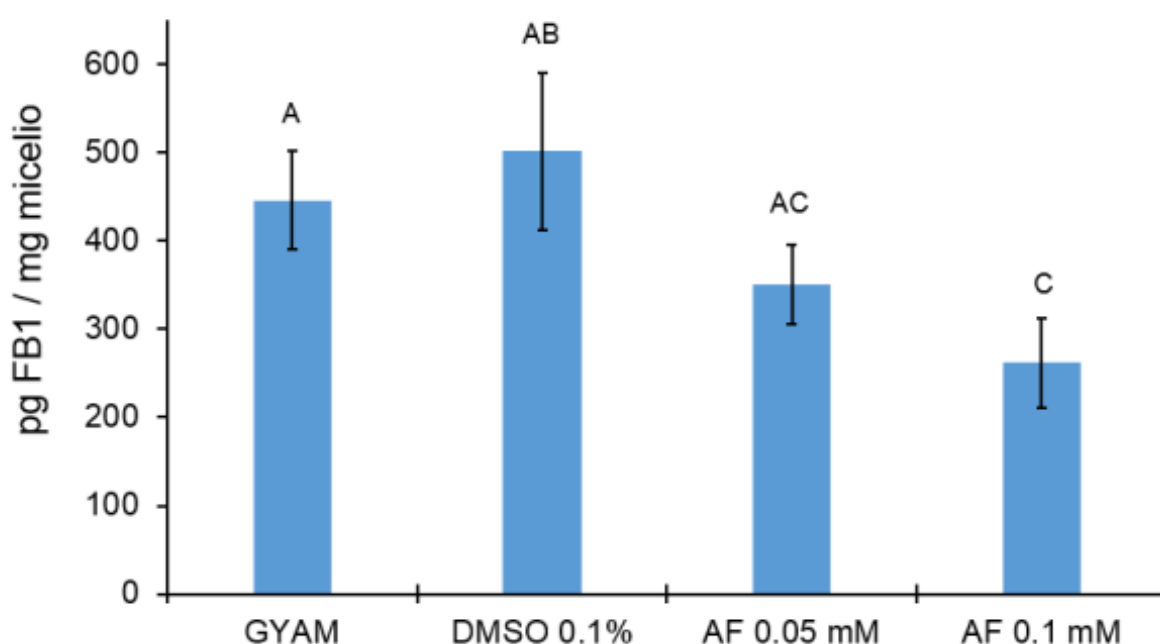


Figura 11. Niveles de FB1 producidos por *F. verticillioides* en presencia de AF. Letras distintas sobre las barras indican diferencias significativas (ANOVA; seguida por prueba de Tukey (GYAM, DMSO 0.1% y AF 0.05 mM: $p > 0.05$; AF 0.1 mM: $p < 0.05$; $n=4$)). (Martínez-Fraca, 2019).

Para extender estos hallazgos *in planta*, se estudiaron genotipos contrastantes de maíz con respecto al contenido de ácido ferúlico en el pericarpio (Tabla 7); se encontró que en semilla, las variedades de alto contenido en ferúlico eran menos susceptibles a la infección por *F. verticillioides*, que las de bajo contenido de ácido ferúlico, determinada por niveles de ergosterol, y había menor producción de FB1

(40% menor en las semillas de alto contenido de AF con respecto a las de bajo contenido de AF).

Tabla 7. Contenido de AF en las variedades de maíz utilizadas (Martínez-Fraca, 2019).

Genotipo	Contenido de ácido ferúlico en pericarpio de maíz		
	AF total (mg/g pericarpio)	AF conjugado (mg/g pericarpio)	AF libre (mg/g pericarpio)
Semillas con bajo AF	6.14 ± 0.40	6.12 ± 0.40	0.0185 ± 0.0028
Chalqueño	13.726	13.718	0.008
Semillas con alto AF	15.49 ± 1.31	15.46 ± 1.31	0.0207 ± 0.0026

III. HIPÓTESIS

El extracto de pericarpio de granos de maíz inhibirá el crecimiento de *Fusarium verticillioides* así como la producción de FB1, posiblemente debido a su capacidad antioxidante.

IV. OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar el efecto de la composición del pericarpio de maíz en la producción de fumonisina B1 por *Fusarium verticillioides*.

Objetivos Particulares

1. Determinar la posible participación de otros compuestos, aparte del AF, presentes en el pericarpio de maíz sobre el crecimiento de *F. verticillioides*, así como sobre la producción de FB1.
2. Determinar el efecto del extracto de pericarpio de maíz sobre el crecimiento de *F. verticillioides*, así como sobre la producción de FB1.
3. Determinar si este efecto se asocia con la actividad antioxidante del extracto de pericarpio de maíz.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Material Biológico

Cepa de *Fusarium verticillioides*

Se utilizó la cepa de *F. verticillioides* MY3, la cual se aisló de semillas de maíz recolectadas en el Valle del yaqui, Sonora, México (Sánchez-Rangel, *et al*, 2005). Dicha cepa se mantiene en sustrato estéril a -20°C y para producir el inóculo de conidias se plaquea éste en medio Papa – Dextrosa – Agar (PDA).

Genotipos de maíz

→ Semillas de maíz de las razas “Chalqueño” y “Cacahuacintle”, obtenidas en el mercado de Chalco, Edo. Mex.

→ Semillas de líneas híbridas y endogámicas de maíz proporcionadas por el Centro de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT), El Batán, Edo. Mex.

1. Preparación del medio de cultivo PDA 0.5X suplementado con EP y AF.

Para preparar 250 mL de medio de cultivo PDA al 0.5X con un contenido de agar de 1.5%, se pesaron 4.9 g de PDA y 3.8 g de agar, se suspendieron en 250 mL de agua desionizada y se mezclaron en un frasco con tapón de rosca de 500 mL. El medio se esterilizó en autoclave por 20 minutos a 1.2 kg/cm² y 120°C y se dejó enfriar aproximadamente a 40- 45°C. En la campana de flujo laminar se vaciaron 25 mL de medio PDA en cajas Petri estériles, se adicionaron los diferentes tratamientos a las cajas correspondientes (Control, MeOH, EP 0.25 mM y 0.5 mM y AF 0.25 mM y 0.5 mM), se enfriaron y se solidificaron a temperatura ambiente por 24 h, se almacenaron para su uso a 4°C.

2. Inóculo y conteo de conidias.

La cepa MY3 de *F. verticillioides* almacenada en congelamiento se inoculó en el medio PDA y se incubó por 7 días a 28°C en oscuridad. Transcurrido ese tiempo se añadieron de 5 a 10 mL de agua estéril al micelio, se agitó la caja Petri por 90 min a 150 rpm a temperatura ambiente. La superficie del medio fue raspada con una

punta estéril para desprender las conidias del micelio. Se recolectaron 1.5 mL de la suspensión de conidias en un tubo Eppendorf de 2 mL. Se realizaron diluciones para determinar la más adecuada para realizar el conteo de conidias, se tomó una alícuota y se colocó en la cámara de Neubauer (Figura 11) y se contaron en el microscopio. Se calculó el volumen necesario para preparar una suspensión de conidias de concentración adecuada para inocular 1,000,000 de conidias/mL en un disco de papel filtro estéril de 5 mm de diámetro colocado en el centro de la caja Petri con el medio PDA.

Se midió el crecimiento radial de las cajas Petri cada 24 h durante 7 días y se analizaron los datos obtenidos determinando el promedio de los triplicados de cada tratamiento y su desviación estándar.

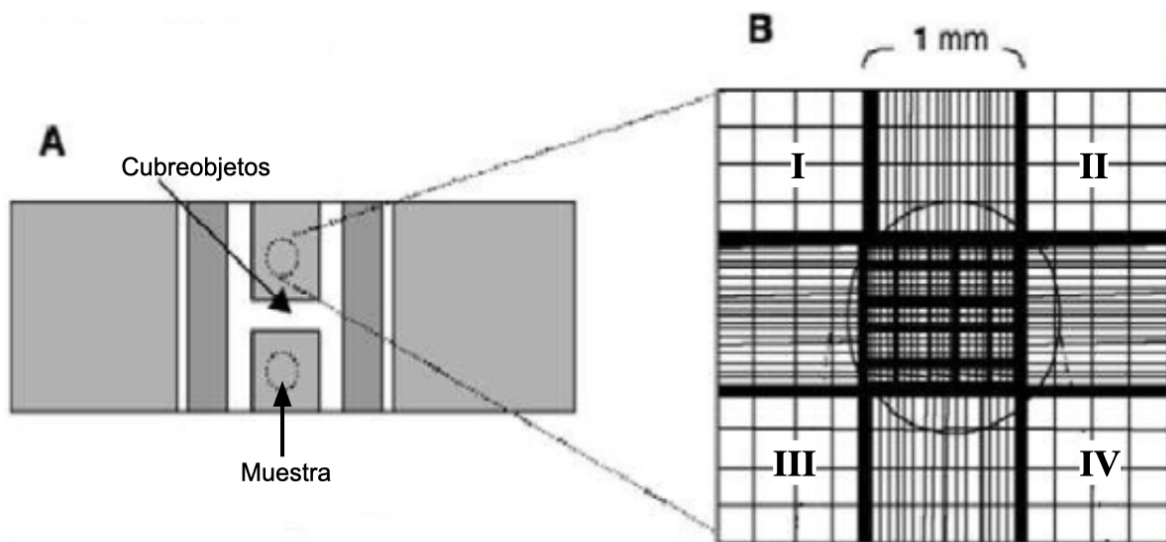


Figura 12. Cámara de Neubauer. **A.** Vista superior de la cámara. **B.** Vista de los cuadrantes, se cuenta el número de células en los cuadrantes marcados. Tomado y editado de <https://es.slideshare.net/eliciruella/camara-de-recuento-neubauer> .

Para obtener el número de conidias se utilizó la fórmula:

$$\text{Conidias/mL} = (X)(Fd)(10^4)$$

Donde:

X: Promedio del número de conidias en I, II, III y IV.

Fd: Factor de dilución.

10⁴: Volumen en cada uno de los cuadrantes, (10⁻⁴ mL)

B. Efecto del extracto de pericarpio de maíz en el crecimiento radial de *F. verticillioides*.

1. Extracción del pericarpio de maíz.

Se pesaron lotes de 50 g de semillas de maíz y se colocaron en un matraz Erlenmeyer al cual se adicionó agua desionizada hasta cubrir todas las semillas. Los matraces se incubaron a temperatura ambiente con agitación a 200 rpm por 2 h (Lab-line® Orbit Environ-Shaker, USA). Se decantó el agua y el pericarpio se removió de manera manual de cada semilla y se secó en capas de papel absorbente durante 24 h. Los 1.99 g de pericarpio seco se molieron con nitrógeno líquido en un mortero hasta obtener un polvo fino, se añadió NaOH (8% m/v) y se agitó a 200 rpm en oscuridad por 2 h, pasado este tiempo se llevó a pH 2 mediante la adición de HCl concentrado. El extracto se centrifugó durante 10 minutos a 3,000 rpm (Beckman GS-6R), se recuperó el sobrenadante y se añadió el mismo volumen de acetato de etilo, se agitó en vórtex y la emulsión se centrifugó y se recuperó la fase orgánica. La extracción se realizó una vez más, se juntaron las fracciones orgánicas y se evaporó a sequedad el disolvente en campana de extracción bajo un flujo de nitrógeno gaseoso. El residuo se disolvió en metanol: agua 1:1 y se almacenó a -20°C hasta su análisis mediante HPLC (Martínez-Fraca, 2019).

2. Análisis de los niveles de ácido ferúlico (AF) y ácido cumárico (AC) en pericarpio de semillas de maíz.

Se realizó este análisis por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC de fase reversa, columna: C18 Ascentis® (15 cm x 4.6 mm, Millipore Sigma), fase móvil: ácido acético 4% en agua: metanol, 75:25) con un detector de UV-VIS (RF-10, Shimadzu, E.U.A.) a 335 nm, bomba (LC10-AD, Shimadzu, E.U.A.) con flujo de 1.2 mL/min). Se generó una curva patrón en un rango de 0.3125 µg/mL hasta 5 µg/mL.

C. Efecto del extracto de pericarpio de maíz en la producción de FB1 de *F. verticillioides*.

1. Preparación del medio GYAM.

El medio GYAM es un medio de cultivo que estimula la producción de fumonisina (Bojja, *et al*, 2004), para su elaboración se preparó un stock de sales 10X (1.3 % de cloruro de calcio, 0.77% de fosfato dibásico de potasio, 0.49% de sulfato de magnesio, 0.99% de cloruro de sodio en agua desionizada) y un stock de asparagina 40 mM (Se pesaron 0.6 g de asparagina, se disolvieron en 100 mL de agua desionizada estéril y se filtró a través de una membrana Millipore de 0.22 μ m estéril).

Se pesaron 2.16 g de glucosa, 0.05 g de extracto de levadura y 0.67 g de ácido málico, se disolvieron en 20 mL de agua desionizada, se agregaron 10 mL de stock de sales 10X y 50 mL de agua desionizada, se esterilizó en autoclave por 20 minutos a 1.2 kg/cm² y 121°C, se enfrió a temperatura ambiente, se adicionaron 20 mL de solución de asparagina 40 mM y se vaciaron 15 mL de medio a matraces de 50 mL con tapón de rosca estériles.

Se adicionaron las cantidades necesarias de extracto de pericarpio y ácido ferúlico a los matraces correspondientes (cada tratamiento se evaluó por triplicado).

Se preparó la suspensión y conteo de conidias de la misma manera que en el experimento anterior. Se inocularon los matraces de medio GYAM adicionando la cantidad calculada de la suspensión al medio a temperatura ambiente, siendo la concentración final de 910 conidias/mL de medio GYAM.

2. Preparación de o-ftaldialdehído (OPA) (7.45 mM).

Se pesaron 2 mg de OPA y se disolvieron en 400 μ L de metanol grado HPLC, se diluyeron con 2 mL de buffer de boratos 50 mM, pH 9.7, se adicionaron 3 μ L de β -mercaptoetanol, se mezclaron en vórtex y se almacenó a 4°C hasta su uso, el mismo día.

3. Análisis de la cantidad de FB1 en medio GYAM.

Se realizó este análisis por HPLC (HPLC de fase reversa, columna: C18 Ascentis[®], fase móvil: Buffer de fosfatos: Metanol 25:72 (pH= 3), detector de fluorescencia programado a una longitud de onda de excitación de 335 nm y una longitud

de onda de emisión de 440 nm, flujo de 1.0 mL/min), se generó una curva patrón con patrones de FB1 que se hicieron reaccionar con OPA (se mezclaron 10 μ L del estándar con 25 μ L de OPA en un tubo Eppendorf de 2 mL, se mezcló en vórtex y se centrifugó, se dejó incubar a temperatura ambiente por 3 min, se agregaron 465 μ L de acetonitrilo: agua (1:1) y se mezcló en vórtex, los tubos correspondientes a la curva patrón se almacenaron en hielo hasta su análisis (que se realizó el mismo día de su preparación). Las muestras con FB1 se trataron de la misma manera que los puntos de la curva patrón. Los resultados obtenidos se trataron con la ecuación obtenida de la curva de calibración, se obtuvieron los promedios y la desviación estándar de los datos.

D. Evaluación de la capacidad antioxidante de los extractos de pericarpio de maíz con reactivo de ABTS.

1. Preparación del reactivo de ABTS oxidado (ABTS+).

Se adicionaron 1.5 mL de ABTS (1.8 mM) en un tubo Eppendorf de 2 mL, se adicionaron 27 μ L de persulfato de potasio (0.63 mM) y se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 14 h.

2. Preparación de las muestras.

En una microplaca de 96 pozos con fondo plano se añadieron alícuotas de disoluciones de los ácidos fenólicos o extractos de pericarpio (cada tratamiento se evaluó por triplicado) disueltos en etanol absoluto hasta obtener un volumen total de 50 μ L en cada pocillo de la placa. Se adicionaron 100 μ L del reactivo ABTS+ a cada pocillo con muestra y se leyó la absorbancia inmediatamente después del añadido en un espectrofotómetro a 450 nm. Se calculó el % de reducción de la absorbancia con respecto del blanco de ABTS+, se obtuvieron los promedios y desviación estándar de cada uno de los tratamientos, los reactivos a los que se les midió la capacidad antioxidante se encuentran especificados en la Tabla 8.

Tabla 8. Concentración final de analitos para el análisis de capacidad antioxidante.
*Concentración de trabajo de ABTS⁺.

Compuesto	Concentración (μM)
ABTS⁺	60 - 1200*
Ácido Ferúlico	3.33 - 167
Ácido Cumárico	167
Ácido Vanílico	167
Ácido Siríngico	167
Extracto de Pericarpio	8 - 333
Extracto de Pericarpio de Alto Contenido de Ferúlico	8 - 333
Extracto de Pericarpio de Bajo Contenido de Ferúlico	8 - 167
Curcumina	16.7 - 500

VI. RESULTADOS

A. Efecto del extracto de pericarpio de maíz en el crecimiento radial de *F. verticillioides*.

1. Niveles de AF y AC en el pericarpio de semillas de maíz (raza Chalqueño) y concentración (mM) de los ácidos fenólicos en el extracto.

El contenido de AF y AC en el pericarpio de semillas de maíz se determinó por HPLC empleando una solución estándar de cada compuesto (el anexo R1 y R2 presenta las curvas std.), y se encontró que los niveles de AF fueron aproximadamente 20 veces más altos que los de AC. Los resultados se presentan en la Tabla 9, como mg/g de pericarpio y su conversión a concentración (mM) en el extracto.

Tabla 9. Relación de AF y AC en el pericarpio de maíz (mg de ácido/mL) y en el extracto (mM). Se presenta la media \pm D.E. (n = 4).

Número de extracto	Nivel de AF (mg/g pericarpio)	Concentración de AF presente (mM)	Nivel de AC (mg/g pericarpio)	Concentración de AC presente (mM)
1	21.03	108.28	0.88	5.33
2	32.20	165.80	1.11	6.78
3	21.21	109.20	1.84	11.22
4	18.06	93.03	0.96	5.82
PROMEDIO	23.12 \pm 5.88	119.08 \pm 32.02	1.20 \pm 0.44	7.29 \pm 2.69

2. Efecto del extracto de pericarpio de maíz sobre el crecimiento de *Fusarium verticillioides* en medio PDA.

El efecto de los extractos de pericarpio y del AF sobre el crecimiento radial de *F. verticillioides* se muestran en la Figura 13.

Los resultados muestran que el extracto de pericarpio (0.5 mM eq.) provocó una inhibición de aproximadamente un 30% del crecimiento del hongo con respecto al control, el extracto de pericarpio a la concentración más baja (0.25 mM eq.) generó una inhibición de 25% aproximadamente. En el caso del AF puro, la concentración de 0.5 mM provocó una inhibición equivalente (aproximadamente 25%) a la de la concentración más baja de extracto de pericarpio, la concentración más baja de AF (0.25 mM) presentó una inhibición del 7% aproximadamente. No se encontró que el disolvente tuviera un efecto en el crecimiento.

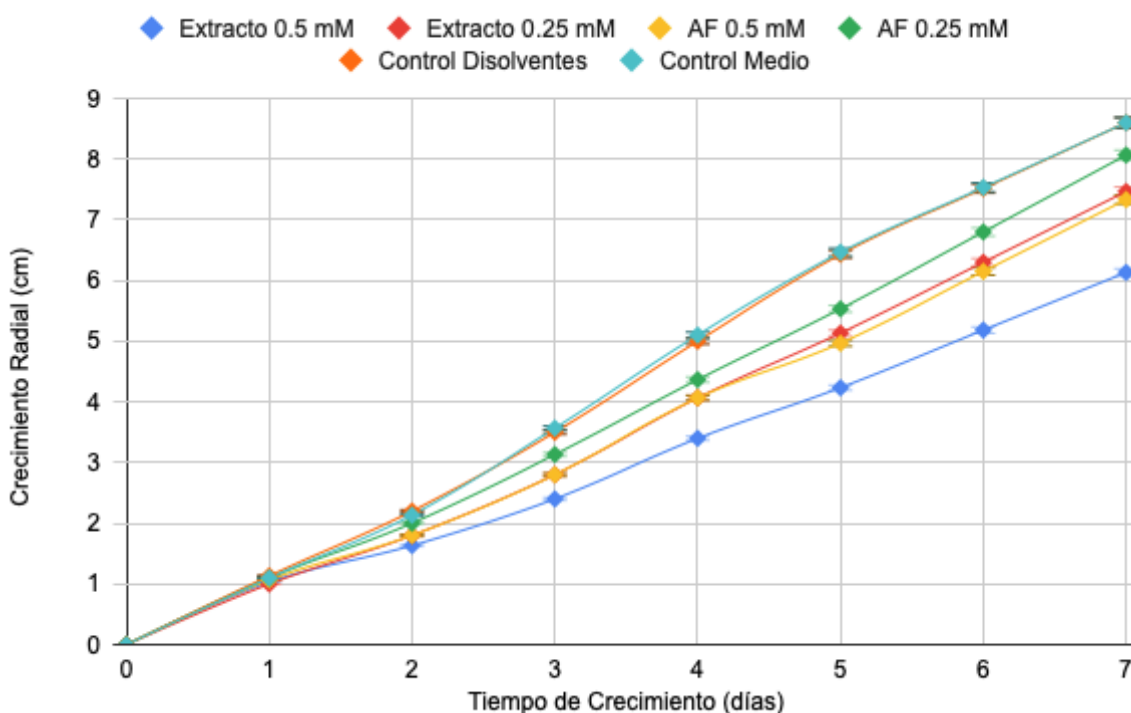


Figura 13. Efecto del extracto de pericarpio de maíz y del AF en el crecimiento radial de *F. verticillioides* medido en placas de PDA 0.5X suplementados con las concentraciones indicadas, (n = 3, se muestra el valor promedio \pm D.E.).

La Figura 14 muestra cultivos representativos del crecimiento radial de *F. verticillioides* al día 7 post-inoculación en presencia de dos concentraciones de AF y de

extracto de pericarpio. Se observa que al día 7, el hongo inoculado en el medio control ya había llenado la caja (Figuras 14-1), y había alcanzado casi la totalidad de la caja en el control de disolvente (Figura 14-4), mientras que en las cajas con la concentración más alta de AF (Figura 14-3) y con el extracto de pericarpio (Figuras 14-5 y 14-6) se observa un crecimiento más pobre, en el caso de los medios suplementados con la concentración más baja de AF (Figura 14-2) se observa una inhibición del crecimiento, pero el hongo aún logra alcanzar los bordes de la caja.

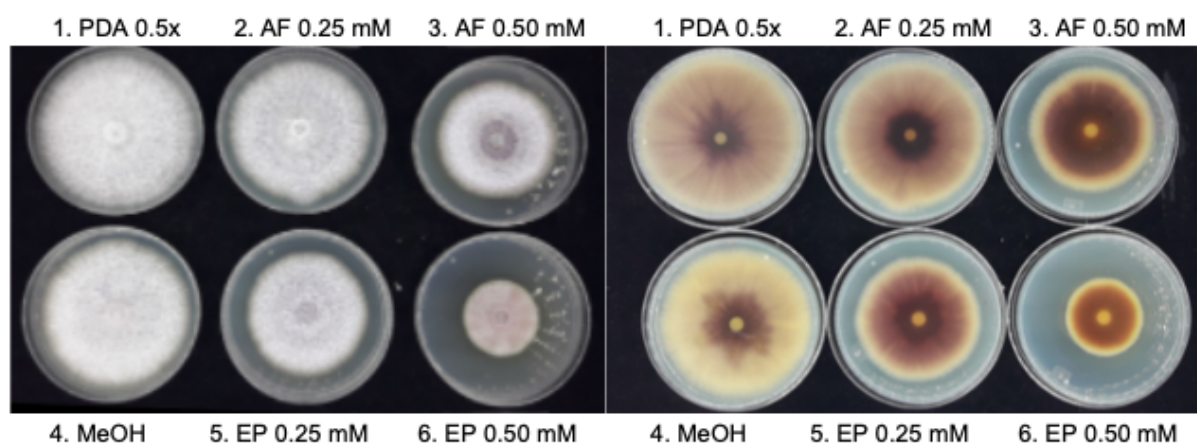


Figura 14. Anverso y reverso del crecimiento de *F. verticillioides* (7 días) en placas suplementadas con extracto de pericarpio (EP) o ácido ferúlico (AF) a las concentraciones indicadas. El control de disolvente fue metanol al 0.27% v/v, equivalente a lo añadido en los medios suplementados.

3. Efecto de otros compuestos presentes en el pericarpio de maíz en el crecimiento de *F. verticillioides*.

Dado que el pericarpio de maíz también contiene otros ácidos fenólicos, además del AF, se evaluó la presencia de AV, AC y AS, en los extractos de pericarpio por HPLC y comparación de los tiempos de retención de estándares puros. Los tiempos de retención de AF, AC, AV y AS fueron de 7.7 min, 6.8 min, 4.1 min y 4.3 min, respectivamente y en el extracto de pericarpio se identificaron picos con tiempos de retención muy cercanos (Figura 15). Como muestra la figura, el tamaño de los picos de AC, AV y AS es muy pequeño y corresponden aproximadamente a 2.67%, 0.1% y 0.2% respectivamente, del contenido de AF.

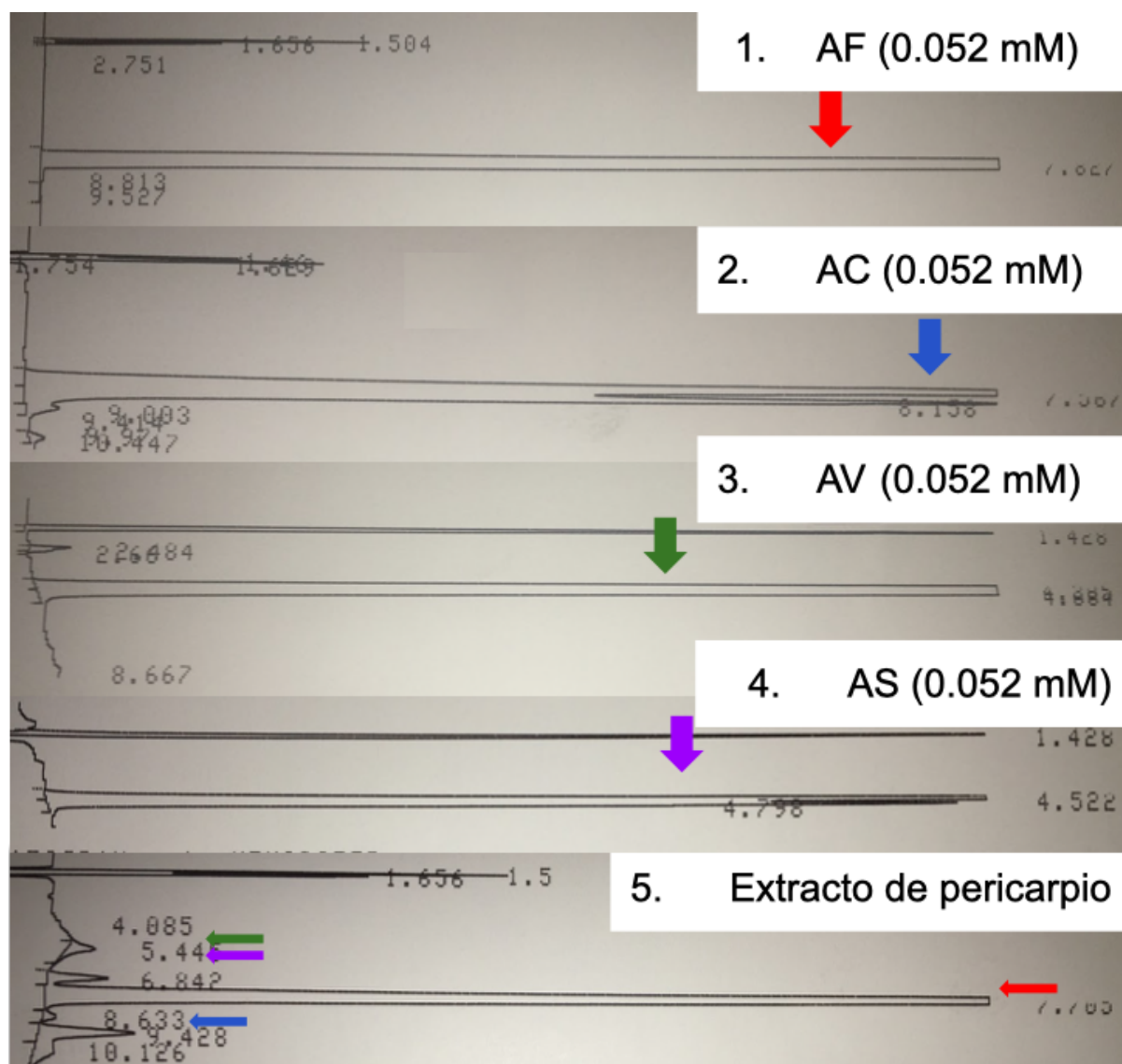


Figura 15: Cromatogramas de HPLC de: 1. Ácido Ferúlico, 2. Ácido p-Cumárico, 3. Ácido Vanílico, 4. Ácido Siríngico, 5. Extracto de Pericarpio de Maíz (Dilución de la matriz concentrada 1:10,000).

Aunque la concentración de estos ácidos fenólicos es muy baja en los extractos de pericarpio, se evaluó su actividad antifúngica y los resultados se presentan en la Figura 16.

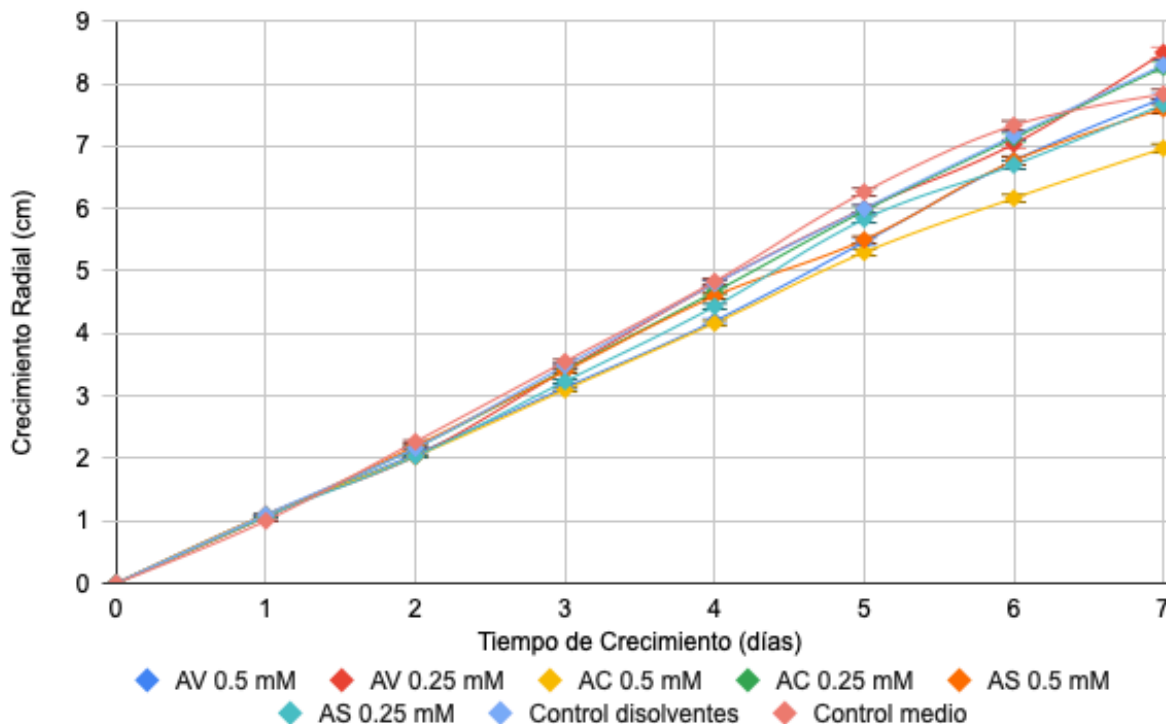


Figura 16. Efecto de diferentes ácidos fenólicos (AC, AS y AV) presentes en extracto de maíz en el crecimiento radial de *F. verticillioides* medido en placas de PDA 0.5X suplementados con las concentraciones indicadas (n = 3, se muestra el valor promedio \pm D.E.).

La concentración más alta de AC (0.5 mM) es la que causó la mayor inhibición del hongo (aproximadamente 13%), mientras que la concentración más alta del AV (0.5 mM) y las dos concentraciones utilizadas del AS (0.5 mM y 0.25 mM) no provocaron una inhibición significativa. Este experimento muestra que el AC tiene una mayor acción antifúngica sobre *F. verticillioides* que el AV y el AS, sin embargo, no alcanzaron la misma potencia que el AF.

B. Efecto del extracto de pericarpio de maíz sobre la producción de FB1 de *F. verticillioides*.

Para evaluar el efecto del extracto de pericarpio sobre la producción de FB1, se incubó *F. verticillioides* por 7 días en medio GYAM como control y en medio GYAM suplementado con 1) metanol-agua (M:A) donde la concentración final de metanol en el medio fue 0.088% v/v; 2) ácido ferúlico (AF 0.1 mM) y 3) extracto de pericarpio (AF eq 0.1 mM). El crecimiento del micelio fue pobre en este experimento

como se muestra en la Figura 17. Esto se reflejó en los niveles de fumonisina producida que fueron muy bajos y apenas en el límite de cuantificación del método. La Figura 18 presenta cromatogramas de estas determinaciones. Esto dificultó mucho el análisis, los resultados preliminares que se presentan en la Figura 19 sugieren que no hay diferencias entre los tratamientos. Para resolver este problema, se recomienda repetir el experimento incrementando el inóculo inicial (910 conidias/mL) para tener mayor biomasa y poder realizar un análisis confiable de los niveles de fumonisina.

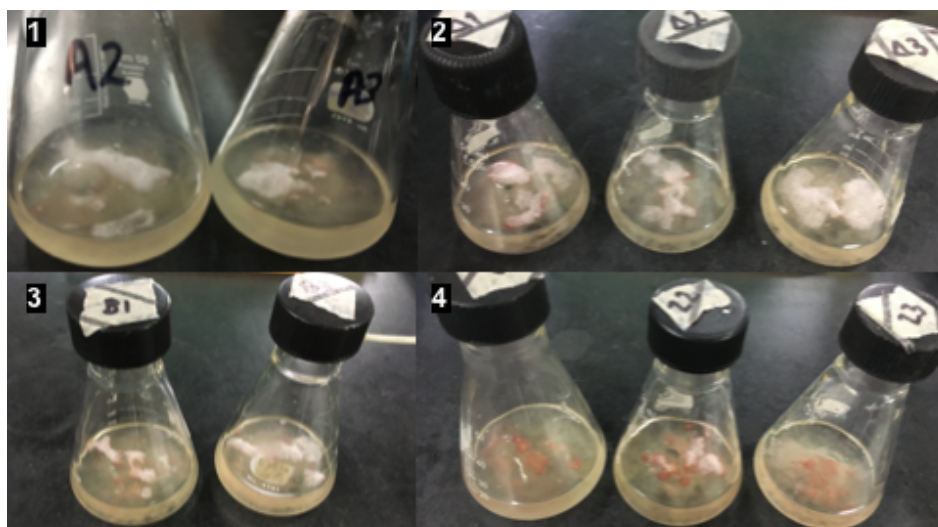


Figura 17. Crecimiento al día 7 de *F. verticillioides* en matraces de medio GYAM (1. Control de medio GYAM, 2. Extracto de pericarpio 0.1 mM, 3. Control de disolvente Metanol: Agua, 4. AF 0.1 mM).

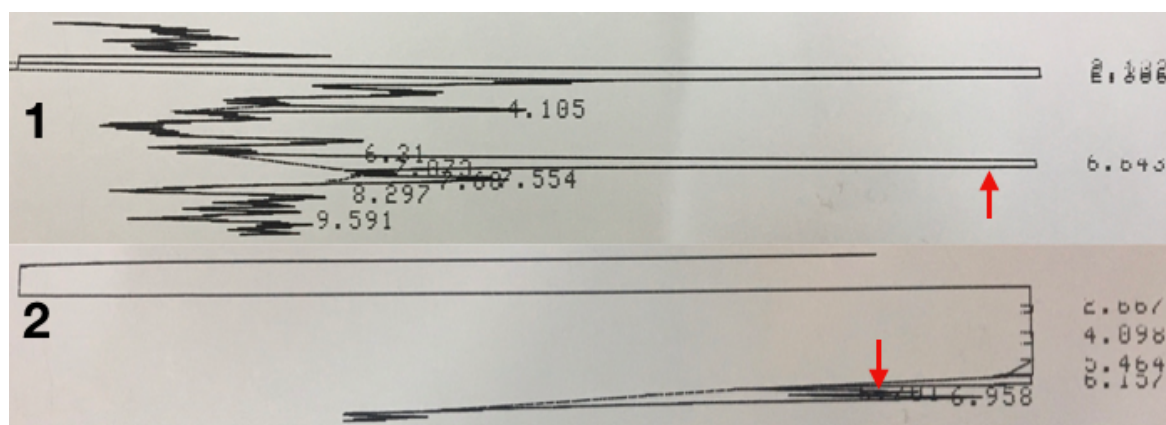


Figura 18. Ejemplos de cromatogramas obtenidos para la cuantificación de FB1 (Tiempo de retención: ~6.7 min) en medio GYAM (1. Cromatograma de un estándar de FB1 50 μ M dilución 1:100, 2. Cromatograma de una muestra de medio GYAM, dilución 1:5).

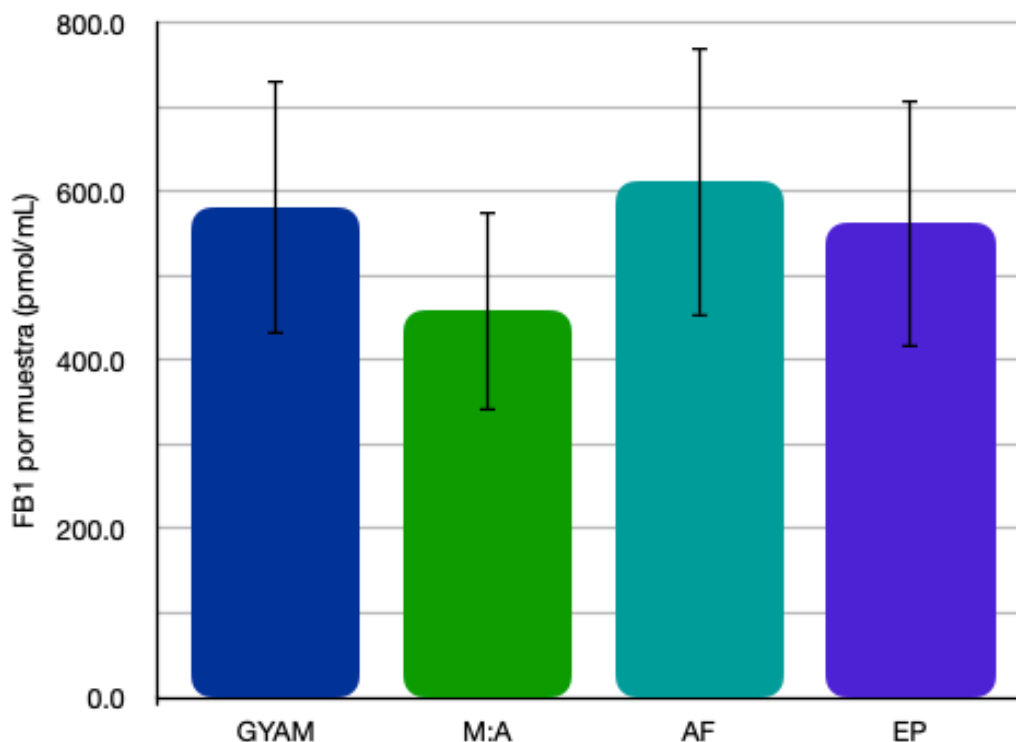


Figura 19. Efecto de diferentes tratamientos sobre la producción de FB1 por *F. verticillioides* medido en matraces de medio GYAM suplementados con las disoluciones indicadas M:A (metanol/agua 1:1), AF (Ácido ferúlico 0.1 mM), EP (extracto de pericarpio, AF eq 0.1 mM) (n = 3, se muestra el valor promedio \pm D.E.).

C. Evaluación de la capacidad antioxidante de los extractos de pericarpio de maíz con reactivo de ABTS.

Se implementó el método de ABTS+ para medir la actividad antioxidante del ácido ferúlico y otros ácidos fenólicos presentes en el pericarpio de maíz, así como de diferentes concentraciones del extracto de pericarpio (EP). El método se basa en la reducción del ABTS+ por los agentes antioxidantes que se sigue por el decremento de la A_{450} . La figura 20 muestra una comparación entre los % de absorbancia de la curva de concentraciones crecientes de AF (3.33 - 167 μ M) y la curva estándar de ABTS+ (60 - 1200 μ M). Se observa que el comportamiento de la A_{450} del ABTS+ es lineal en el rango de concentraciones probado, lo cual permitió establecer la concentración de trabajo de este reactivo para los ensayos, mientras que el comportamiento de la actividad antioxidante del AF sigue un comportamiento exponencial depen-

diente de la concentración, la cual alcanza un máximo después de 167 μM , lo que permitió establecer la concentración para los resultados posteriores.

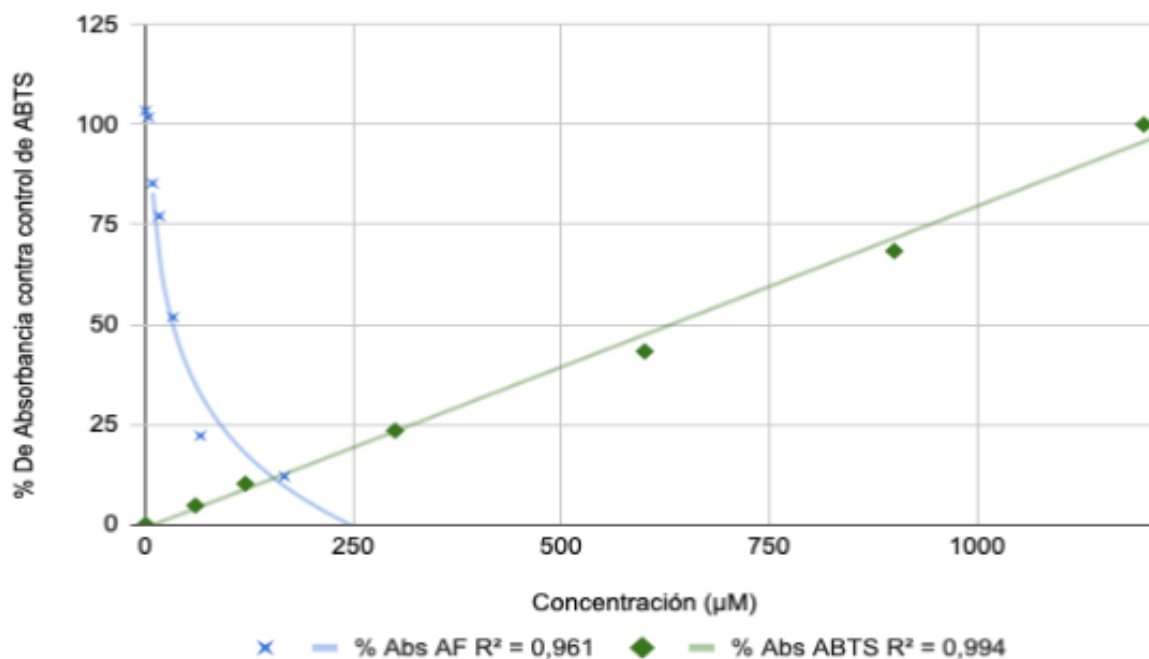


Figura 20. % de inhibición de absorbancia de ABTS+ por la concentración de AF y % de inhibición de la absorbancia por efecto de la concentración del ABTS+ (n = 3, se muestra el valor promedio).

La Figura 21 compara la actividad antioxidante de 4 ácidos fenólicos a una concentración de 167 μM (concentración establecida como el máximo en la A_{450} , mostrado en la figura 20) que se encuentran en el pericarpio de maíz y del extracto de pericarpio a dos diluciones distintas. Se observa que solamente el ácido ferúlico y el ácido sirínigico poseen capacidad antioxidante pues alcanzaron una inhibición del 85% y del 50%, respectivamente. Asimismo, la actividad que exhibe el extracto de pericarpio (167 μM eq. AF) fue comparable a la del ácido ferúlico puro. Esto se explica con el hecho de que el ácido fenólico que se encuentra en mayor abundancia en el extracto es el AF, así, aunque el AS presenta una actividad antioxidante alta, la concentración en la que se encuentra presente no es la suficiente para que tenga un impacto sobre la capacidad total del extracto.

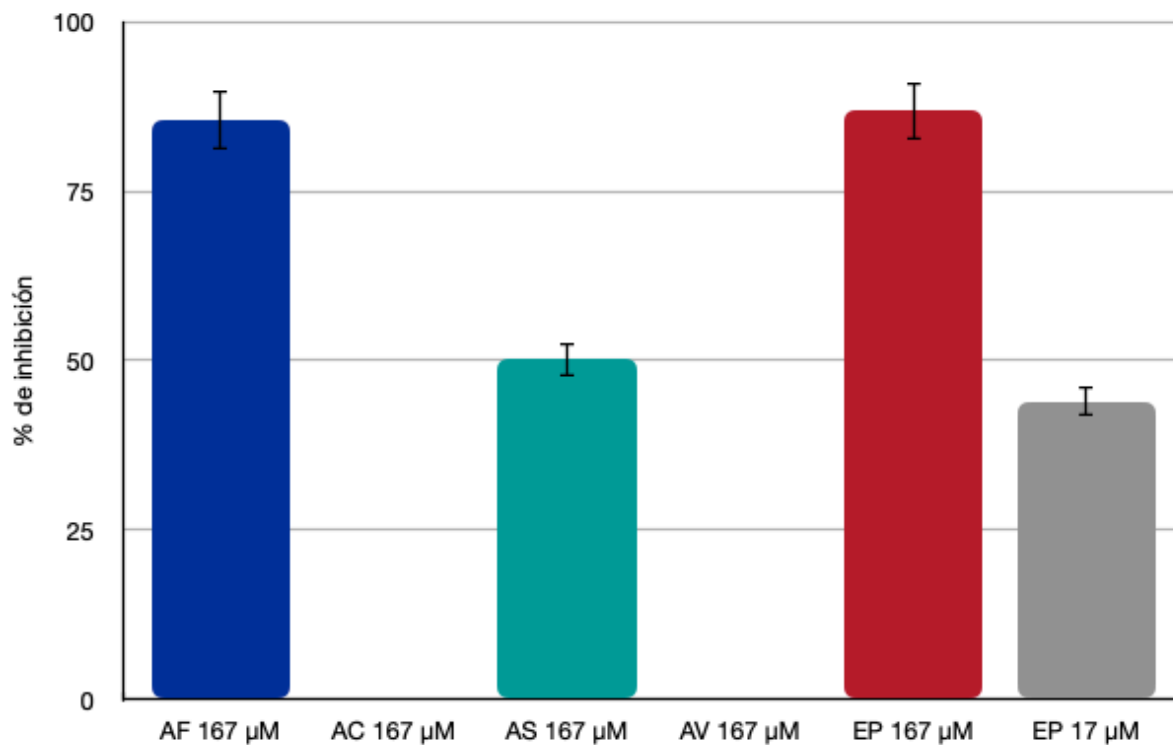


Figura 21. Capacidad antioxidante de diferentes ácidos fenólicos (167 μ M) presentes en pericarpio de maíz (Ácido ferúlico (AF), ácido p-cumárico (AC), ácido siríngico (AS) y ácido vanílico (AV)) y de diferentes concentraciones de extracto de pericarpio (EP) (n = 3, se muestra el valor promedio \pm D.E.).

También se determinó la capacidad antioxidante de algunas mezclas de los ácidos fenólicos con el fin de simular el efecto de los extractos de pericarpio que contienen distintos compuestos; los resultados se muestran en la Figura 22.

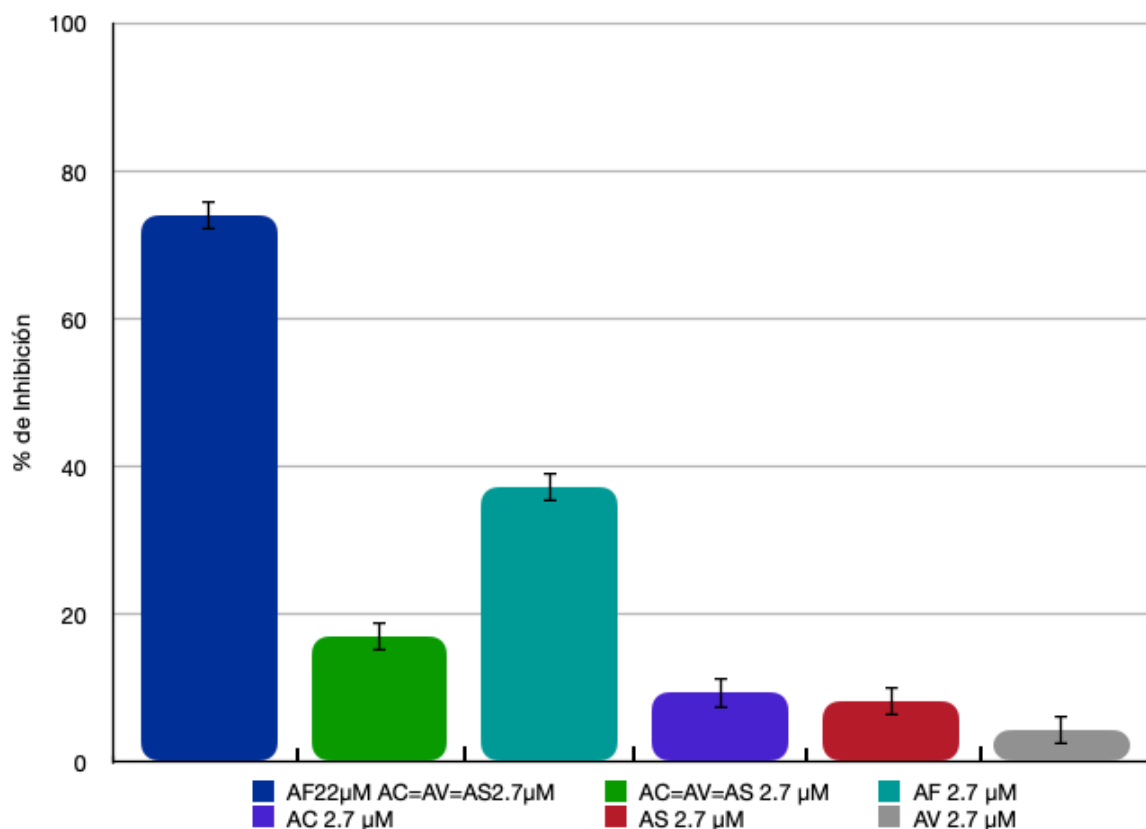


Figura 22. Capacidad antioxidante de ácidos fenólicos presentes en pericarpio de maíz y diferentes mezclas de ellos (Ácido ferúlico (AF), ácido p-cumárico (AC), ácido siríngico (AS) y ácido vanílico (AV)) (n = 3, se muestra el valor promedio \pm D.E.).

En este experimento se observó que la capacidad antioxidante que presentan las mezclas está determinada principalmente por la cantidad de ácido ferúlico presente en ellas, y que en las mezclas que carecen de ácido ferúlico, la capacidad antioxidante corresponde aproximadamente a la suma de las de los ácidos presentes, esto demuestra que no existe un efecto sinérgico antioxidante entre los ácidos evaluados y confirma que la capacidad antioxidante de una mezcla de ácidos fenólicos en la cual se encuentre el AF, va a presentar la capacidad antioxidante del AF solo.

Para apoyar esto, se determinó la capacidad antioxidante de extractos de pericarpio de diferentes variedades de maíz, una de alto contenido de AF (EA) y una de bajo contenido de AF (EB), y se normalizaron a una concentración equivalente de 167 μ M de ácido ferúlico. Los resultados se presentan en la Figura 23, la cual mues-

tra que no hay diferencias significativas en el % de inhibición de la A_{450} entre el extracto fresco, el estándar de AF y el extracto de alto contenido de AF, pero si existe una diferencia entre los extractos frescos y los antiguos, indicando una pérdida de la capacidad antioxidante de los extractos a través del tiempo, también se observa una diferencia entre los extractos de alto y bajo contenido de AF, indicando que este factor influye determinantemente en la capacidad antioxidante de los extractos.

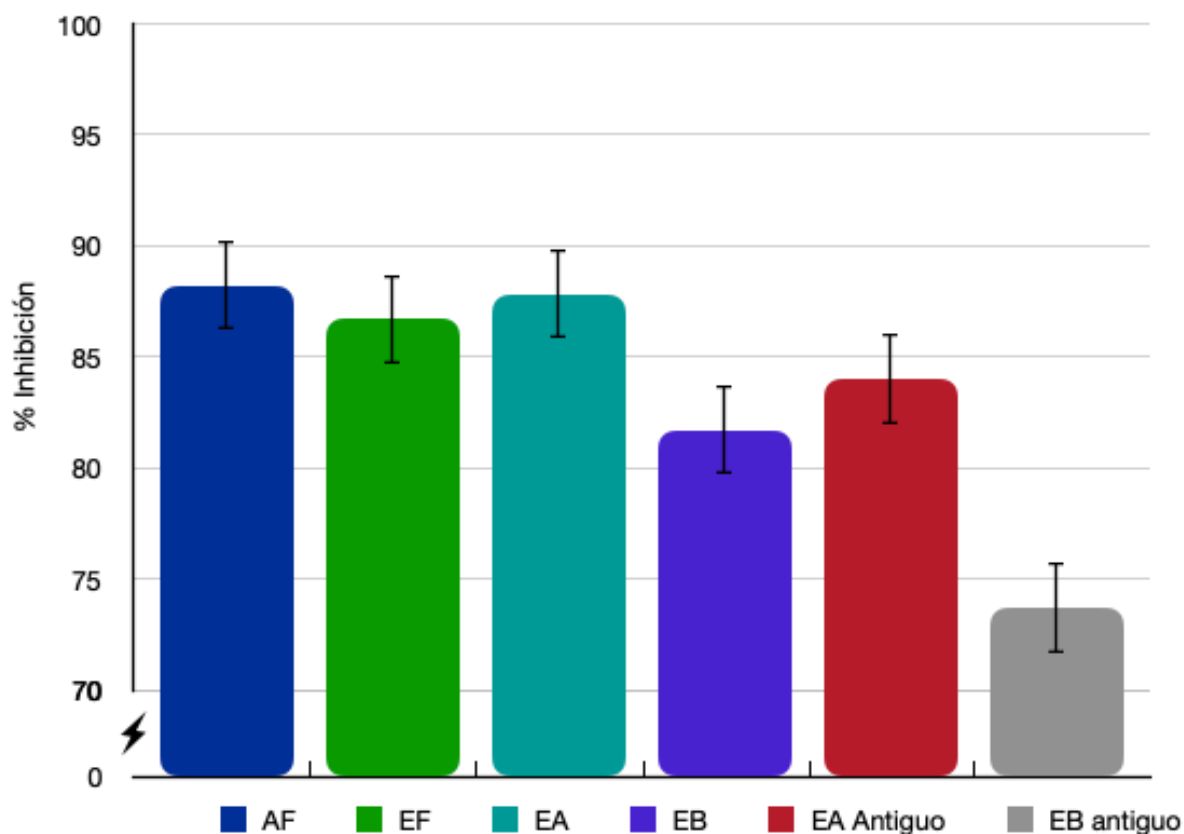


Figura 23. Capacidad antioxidante de extractos de pericarpio de alto y bajo contenido de AF, frescos y antiguos comparado contra estándar de AF y extracto fresco de raza Chalqueño, los extractos de alto contenido de ferúlico y estándares se encuentran a una concentración de $167 \mu\text{M}$ equivalente de AF, los extractos de bajo contenido de ferúlico se encuentran a la misma dilución que los extractos de alto contenido de ferúlico y su concentración es de $130 \mu\text{M}$ equivalente de AF ($n = 3$, se muestra el valor promedio \pm D.E.).

Se evaluó también la capacidad antioxidante de los extractos de alto y bajo contenido de AF, añadiendo distintos volúmenes de estos (0 - $1.8 \mu\text{L}$) que corresponden a concentraciones de 0 - $300 \mu\text{M}$ del extracto de alto contenido de AF (Figura 24). Los perfiles de las curvas de inhibición de oxidación para ambos extractos

fueron contrastantes; para el extracto de alto AF, se alcanzó un 90% de inhibición a partir de 0.2 μL , mientras que para el de bajo AF, se requirieron 0.85 μL del extracto. Con estos datos se determinó una CI_{50} de 16.7 μM (0.1 μL) para el extracto de alto contenido de AF y de 65 μM (0.5 μL) para el extracto de bajo contenido.

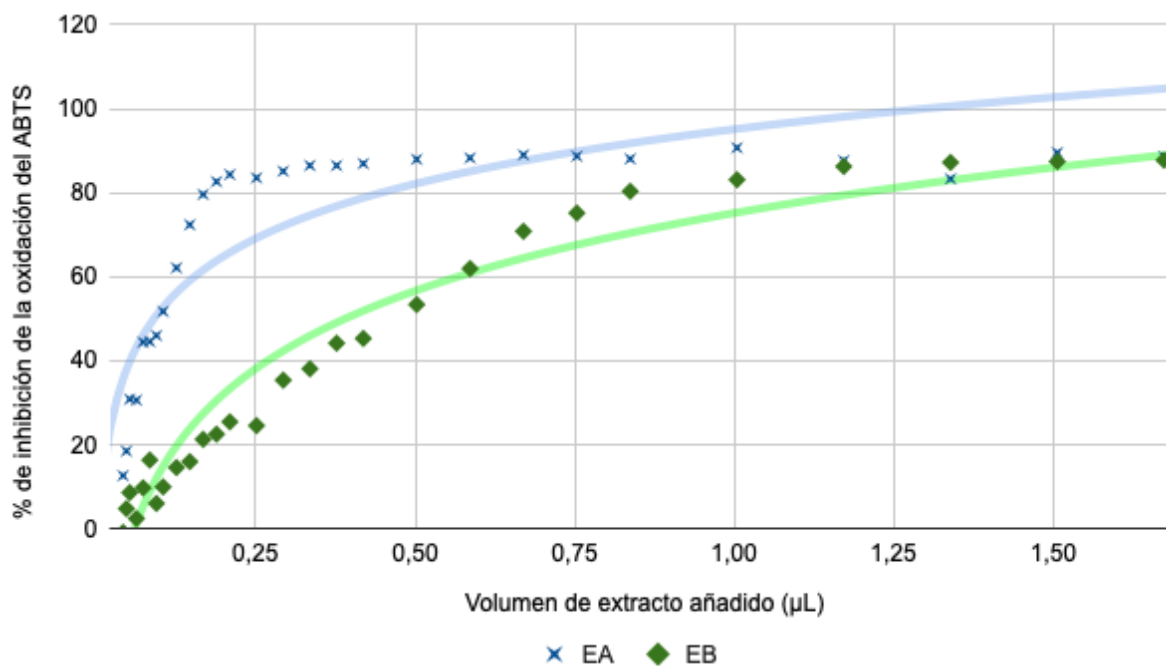


Figura 24. Actividad inhibitoria de la oxidación del ABTS de los extractos de alto y bajo contenido de AF. Se probaron volúmenes equivalentes de cada extracto y se evaluó su capacidad antioxidante en el ensayo de ABTS.

VII. DISCUSIÓN

En este trabajo se encontró que el extracto de pericarpio de semilla de maíz inhibe el crecimiento en placa de *F. verticillioides*, así como la producción *in vitro* de FB1, lo anterior se asoció a la capacidad antioxidante de los ácidos fenólicos, principalmente el AF, presentes en el EP.

A. Efecto del extracto de pericarpio de semilla de maíz sobre el crecimiento en placa de *F. verticillioides*.

Se determinaron mediante HPLC los niveles de algunos ácidos fenólicos presentes en el pericarpio de semilla de maíz, los resultados muestran que el AF es el ácido que existe predominantemente, y algunos otros ácidos como AC, AS y AV existen en cantidades entre 37 hasta 1,000 veces menores que el AF, existen otros compuestos fenólicos que existen en el EP que no fueron analizados en este trabajo, así como precursores de los mismos, tales como ácido clorogénico, ácido cinámico y ácido benzoico, los cuales podrían también contribuir a la defensa contra hongos patógenos (Atanasova-Penichon, *et al*, 2016).

Se encontró que el EP a una concentración equivalente de AF de 0.25 mM produce una inhibición del crecimiento de *F. verticillioides* similar a la provocada por AF 0.5 mM, aproximadamente de 25% con respecto del control, sugiriendo que en el caso del extracto, no es el AF el único compuesto que puede causar este efecto, pudiendo existir un efecto sinérgico entre los demás ácidos fenólicos presentes. Coma, *et al* (2011) reporta que a una concentración de AF de 26.8 mM existe una inhibición del 29% del crecimiento de *Fusarium proliferatum* (Tabla 5), en comparación, *F. verticillioides* presenta una mayor sensibilidad al AF, ya que presenta una inhibición similar del crecimiento en placa a una concentración 5 veces menor.

B. Efecto del extracto de pericarpio de semilla de maíz sobre la producción de FB1 por *F. verticillioides*.

En este trabajo no se encontró que existiera una diferencia significativa entre la cantidad de FB1 producida en medio GYAM solo y suplementado con AF 0.1 mM y EP 0.1 mM eq. de AF respectivamente. Este experimento preliminar tuvo el inconveniente del pobre crecimiento del micelio y no se pudo repetir por el confinamiento. Sin embargo Martínez-Fraca (2019) reporta una diferencia en el crecimiento *in vivo* de *F. verticillioides* en las variedades de alto y bajo contenido de AF, siendo 20% mayor en la variedad con menor contenido, de esta manera comprobó la influencia de la cantidad de AF sobre el crecimiento del patógeno, asimismo, reporta que en el medio GYAM suplementado con AF a una concentración de 0.1 mM existe una reducción de 50% en la cantidad de fumonisina producida por *F. verticillioides* con respecto del control del medio GYAM (Figura 11), al trabajar con un modelo *in vivo*, con semillas de las variedades con alto y bajo contenido en AF, notó una diferencia entre la expresión de algunos genes responsables de la síntesis de FB1 en semillas de maíz de alto y bajo contenido de AF, siendo mayor la expresión de estos genes en el genotipo de bajo contenido de AF, lo que sugiere que el AF induce un efecto inhibitorio de la producción de FB1, para comprobar este efecto, analizó por HPLC los niveles de FB1 producidos, en la variedad de alto contenido en AF encontró una reducción de hasta el 60% de los niveles de FB1 con respecto de la variedad de bajo contenido de AF, también reporta, a distintos tiempos post-inoculación (desde 6-24 h), que la producción de FB1 es abundante en las semillas con bajo contenido de AF, mientras que en el genotipo con alto contenido, la producción no incrementa de manera significativa en los distintos tiempos, esto es consistente con la hipótesis de que la variedad de mayor contenido de AF logrará resistir mejor la infección por *F. verticillioides* y contendrá menores cantidades de FB1.

C. Capacidad antioxidante de los ácidos fenólicos presentes en el pericarpio de semilla maíz.

Los resultados obtenidos al determinar la capacidad antioxidante de algunos de los ácidos fenólicos presentes en el EP muestran que la capacidad antioxidante exhibida por el AF es muy similar a la capacidad del EP, sugiriendo que el AF es el mayor contribuyente a la actividad antioxidante, lo anterior es consistente con los niveles en los que se encuentra en el extracto, al comparar los resultados obtenidos en el experimento de crecimiento en placa de *F. verticillioides* contra la capacidad antioxidante de los compuestos y mezclas, se observa que existe una relación entre la capacidad de inhibir el crecimiento fúngico y la capacidad antioxidante (en ambos casos el EP presenta mayor efecto que el AF por sí solo), la capacidad antioxidante puede no ser el único factor que influye en la inhibición (mientras el AF y el EP presentan capacidades antioxidantes similares, el EP presenta una inhibición casi 2 veces mayor que el AF).

En cuanto al posible mecanismo de inhibición de los compuestos antioxidantes, una hipótesis es que estos pueden modificar el potencial redox de la célula fúngica, que podría inducir una cascada regulatoria río arriba de la ruta sintética de fumonisina (Picot, *et al*, 2013), de igual manera, Ponts, *et al* (2006) encontraron que suplementando el medio en el que crece *F. graminearum* con H₂O₂, mejora la producción de 15-ADON-DON (TCTB), llegando a aumentar la producción de esta micotoxina hasta 7 veces, complementando esta información, realizan una suplementación de los medios de crecimiento con otros compuestos oxidantes, como diamida, obteniendo el doble de cantidad de 15-ADON-DON en el medio suplementado con diamida con respecto del suplementado con H₂O₂. Dado que el H₂O₂ y la diamida son compuestos que inducen al estrés oxidativo en la célula fúngica, se ha propuesto la idea de que la modulación de la síntesis de micotoxinas está ligada a la habilidad del hongo de protegerse a sí mismo del estrés oxidativo, se ha observado también, una correlación entre la acumulación de especies reactivas de oxígeno con la producción de algunas micotoxinas como tricotecenos y aflatoxinas, el mismo hecho de que algunos compuestos fenólicos antioxidantes tengan la capacidad de impactar la producción de micotoxinas, disminuyendo la misma, se debe al hecho de que la síntesis de éstas, tiene varios pasos oxidativos que requieren una gran cantidad

de oxígeno, los compuestos antioxidantes, al limitar el oxígeno disponible, puede afectar esta vía, de igual manera, es posible que durante la síntesis estén involucradas EROs, las cuales también se pueden ver afectadas por la presencia de antioxidantes en el medio (Ferrigo, *et al*, 2015, Picot, *et al.*, 2013).

Otro factor que afecta a la síntesis de micotoxinas, es el entorno físico en el que se encuentra el patógeno, se sabe que existen algunos factores ambientales que afectan tanto el crecimiento fúngico como la síntesis de fumonisinas, tales como el a_w y la temperatura, también se conoce que factores fisicoquímicos y nutricionales como el pH, la proporción de C:N y el contenido de amilopectina en los granos infectados afectan a la síntesis de micotoxinas (Dall'Asta, *et al*, 2012), por ejemplo, las condiciones ideales de síntesis para *F. verticillioides* son entre 20°C y 30°C y entre 0.97 a 0.98 de a_w (Picot, *et al.*, 2010), Samapundo, *et al* (2007) encontraron que se requieren altos niveles de compuestos fenólicos y una baja a_w para inhibir por completo el crecimiento de *F. verticillioides*, Martínez-Fraca (2019) reporta que la presencia de AF en un medio en el que crece *F. verticillioides* reprime la expresión de algunos genes del locus FUM (FUM1 y FUM8), afectando así, la síntesis de FB1.

VIII. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

A. Conclusión

Hay una amplia diversidad en el contenido de ácidos fenólicos en el pericarpio de distintos genotipos de maíz y es el AF el más abundante de éstos. Además, es el que tiene mayor capacidad antioxidante, determinada por el ensayo de ABTS. El extracto de pericarpio de semillas de maíz logró inhibir el crecimiento *in vitro* de *F. verticillioides*, también se encontró una relación entre la inhibición del crecimiento y la actividad antioxidante del extracto, los genotipos con mayor contenido de AF contienen la mayor actividad antioxidante. El ensayo preliminar realizado en este trabajo, no permitió determinar que estos extractos inhibieran la producción de FB1 *in vitro*.

B. Perspectivas

Dado que en este trabajo se demostró que los extractos de pericarpio de maíz inhibieron el crecimiento de *F. verticillioides*, de una forma dependiente de concentración, estos resultados se verían complementados con los experimentos sobre la producción de FB1 *in vitro*. Nuestros resultados preliminares no fueron concluyentes y la perspectiva inmediata sería repetirlos, una vez solucionado el problema del inóculo.

Para abundar en la relación entre el efecto inhibitorio del crecimiento de los ácidos fenólicos con su actividad antioxidante, se puede determinar el crecimiento de *F. verticillioides* en un medio suplementado con una mezcla de compuestos presentes en el extracto de pericarpio, así como el crecimiento en medios suplementados con ácidos fenólicos por separado.

IX. REFERENCIAS

- Aimar Betiana, M., (2014), Producción de maíz para bioetanol en la zona de Las Junturas, Trabajo final, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, Recurso digital tomado de: <https://rdu.unc.edu.ar/bits-tream/handle/11086/1735/Aimar%20-%20Producción%20de%20ma%C3%ADz%20para%20bioetanol%20en%20la%20zona%20de%20Las%20Junturas.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Anouar, E., Košinová, P., Kozłowski, D., Mokri, R., Duroux, J., Trouillas, P. (2009), New aspects of the antioxidant properties of phenolic acids: a combined theoretical and experimental approach. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 11(35), 7659. DOI:10.1039/b904402g.
- Ariño Moneva, A., Comisión Científica de la Agencia Aragonesa de Seguridad Alimentaria (2008), Informe relativo a las micotoxinas fumonisinas. Recurso digital tomado de: https://www.aragon.es/documents/20127/674325/INFORME_RELATIVO_MICOTOXINAS_FUMONISINAS.pdf/3d7bf286-bb27-825f-1f7c-61d252d3bde9.
- Atanasova-Penichon, V., Pons, S., Pinson-Gadais, L., Picot, A., Marchegay, G., Bonnin-Verdal, M.-N., Ducos, C., Barreau, C., Roucolle, J., Sehabiague, P., Carolo, P., Richard-Forget, F. (2012). Chlorogenic acid and maize Ear Rot Resistance: a dynamic study investigating *Fusarium graminearum* development, deoxynivalenol production, and phenolic acid accumulation. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 25, 1605–1616. DOI: 10.1094/MPMI-06-12-0153-R.
- Atanasova-Penichon, V., Barreau, C., Richard-Forget, F., (2016), Antioxidant Secondary Metabolites in Cereals: Potential Involvement in Resistance to *Fusarium* and Mycotoxin Accumulation. *Frontiers in Microbiology*, Vol 7, Article 566, DOI: 10.3389/fmicb.2016.00566.
- Barros, J., Serk, H., Granlund, I., Pesquet, E. (2015), The cell biology of lignification in higher plants. *Annals of Botany*, DOI: 10.1093/aob/mcv046.
- Bartolo-Pérez, P., Peña, J., Cruz-Orea, A., Calderón, A., (1999), Estudio de la Composición Química de Pericarpio de Maíz con las Técnicas XPS y EDAX. *Superficies y Vacío*, No. 8, 64-68.
- Beekrum, S., Govinden, R., Padayachee, P., Odhav, B., (2003), natural occurring phenols: a detoxification strategy for fumonisin B1. *Food Additives & Contaminants*, 20:5, 490-493, DOI: 10.1080/0265203031000098678.
- Blacutt, A., Gold, S., Voss, K., Gao, M., Glenn, A., (2018), *Fusarium verticillioides*: Advancements in understanding the toxicity, virulence, and niche adaptations of a model mycotoxigenic pathogen of maize. *Phytopathology*, 108, 312-326, DOI: 10.1094/PHYTO-06-17-0203-RVW.

- Bojja, RS., Cerby, RL., Proctor, RH., Du, L. (2004), Determining the biosynthetic sequence in the early steps of the fumonisin pathway by use of three gene-disruption mutants of *Fusarium verticillioides*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 2855-2860.
- Boutigny, A., Barreau, C., Atanasova-Penichon, V., Verdal-Bonnin, M., Pinson-Gadais, L., Richard-Forget, F., (2009), Ferulic acid, an efficient inhibitor of type B trichothecene biosynthesis and Tri gene expression in *Fusarium* liquid cultures. *Mycological Research* 113, 746-753, DOI: 10.1016/j.mycres.2009.02.010.
- Brites, C., Haros, C., Trigo, M., Islas, R., (2007), Maíz, De tales harinas, tales panes: granos, harinas y productos de panificación en Iberoamérica. Publicado por: Hugo Báez, Córdoba, Argentina. Recurso digital tomado de https://www.researchgate.net/publication/316285235_Maiz_in_De_tales_harinas_tales_-_panes_granos_harinas_y_productos_de_panificacion_en_Iberoamerica
- Coma, V., Portes, E., Gardrat, C., Richard-Forget, F., Castellan, A., (2011), *In vitro* inhibitory effect of tetrahydrocurcuminoids on *Fusarium proliferatum* growth and fumonisin B1 biosynthesis. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 28:2, 2018-225, DOI: 10.1080/19440049.2010.540721.
- Cuvelier, M., Richard, H., Berset, C. (1992), Comparison of the Antioxidative activity of some acid-phenol: Structure-activity relationship. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 56(2), 324-325. DOI: 10.1271/bbb.56.324.
- Dall'Asta, C., Falavigna, C., Galaverna, G., Battilani, P., (2012), Role of maize hybrids and their chemical composition in *Fusarium* infection and fumonisin production. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 3800-3808, DOI: 10.1021/jf300250z.
- Dambolena, J., Zygadlo, J., Rubinstein, H., (2011), Antifumonisin activity of natural phenolic compounds. A structure-property-activity relationship study. *International Journal of Food Microbiology*, 145, 140-146, DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.12.001.
- De la Torre-Hernández, M., Sánchez-Rangel, D., Galeana-Sánchez, E., Plasencia-de la Parra, J., (2014), Fumonisin - Síntesis y función en la interacción *Fusarium verticillioides* - Maíz. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 17(1), 77-91, 2014.
- FAO (1993), El maíz en la nutrición humana. Colección FAO: Alimentación y nutrición, No 25, ISBN 92-5-303013-5. Recurso digital en <http://www.fao.org/3/t0395s/T0395S00.htm#Contents>
- Ferrigo, D., Raiola, A., Bogialli, S., Bortolini, C., Tapparo, A., Causin, R., (2015), *In vitro* production of fumonisins by *Fusarium verticillioides* under oxidative stress induced by H₂O₂. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63, 4879-4885, DOI: 10.1021/acs.jafc.5b00113.
- Ferrochio, L., Cendoya, E., Farnochi, M., Massad, W., Ramirez, M., (2013), Evaluation of ability of ferulic acid to control growth and fumonisin production of *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum* on maize based media. *In-*

- ternational Journal of Food Microbiology*, 167, 215-220, DOI: 10.1016/j.ij-foodmicro.2013.09.005.
- González-Cortés, N., Silos-Espino, H., Estrada Cabral, J. C., Chávez-Muñoz, J. A., Tejero Jiménez, L., (2016) Características y propiedades del maíz (*Zea mays L.*) criollo cultivado en Aguascalientes, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, Vol. 7, No. 3, Instituto nacional de investigaciones forestales, agrícolas y pecuarias, EdoMex, Méx. Recurso digital tomado de: <https://www.redalyc.org/pdf/2631/263145554016.pdf>
- Heleno, S., Martins, A., Queiroz, M., & Ferreira, I., (2015), Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds: A review. *Food Chemistry*, 173, 501-513. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.10.057
- Kato Yamakake, T., Mapes Sánchez, Mera Ovando, L., C., Serratos Hernández, J., Bye Boettler, R., (2009), Origen y diversificación del maíz: una revisión analítica. Universidad Nacional Autónoma de México, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. 116 pp. México, D.F., Recurso digital tomado de https://www.biodiversidad.gob.mx/publicaciones/versiones_digitaes/Origen_deMaiz.pdf
- Kim, J., Mahoney, N., Chan, K., Molyneux, R., Campbell, B. (2006), Controlling food-contaminating fungi by targeting their antioxidative stress-response system with natural phenolic compounds. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 70, 735-739, DOI: 10.1007/s00253-005-0123-6
- Leslie, J., Summerell, B., (Eds.) (2006), The *Fusarium* laboratory manual. Blackwell Publishing Hoboken, 1-2. DOI: 10.1002/9780470278376.
- Mansilla, S., (2018), Tesis: Evaluación del valor nutricional de maíces especiales (*Zea mays L.*): Selección para la calidad agroalimentaria. Universidad nacional de Córdoba, facultad de Ciencias Agropecuarias, Córdoba, Argentina. Recurso digital en <https://rdu.unc.edu.ar/bitstream/handle/11086/6107/Mansilla%20C%20P.%20S.%20Evaluación%20del%20valor%20nutricional%20de%20ma%C3%ADces%20especiales...pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Marasas, W. (2001), Discovery and occurrence of the fumonisins: A historical perspective. *Environmental Health Perspectives*, 109, 239-243.
- Martínez-Fraca, F., (2017), Tesis: Efecto del ácido ferúlico sobre la biosíntesis de fumonisinas B1 y la expresión de los genes del locus FUM de *Fusarium verticillioides*. Ciudad de México.
- Martínez-Fraca, F., (2019), Tesis Maestría en Ciencias Bioquímicas: Estudios in planta del efecto del ácido ferúlico sobre la expresión de los genes reguladores y estructurales de la biosíntesis de fumonisina B1 en *Fusarium verticillioides*. Ciudad de México.
- Muñoz Jáuregui, A., Ramos-Escudero, D., Alvarado-Ortiz Urueta, C., Castañeda Castañeda, B., (2007) Evaluación de la capacidad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos en recursos vegetales promisorios. *Revista de la Sociedad Química de Perú*, Vol. 73, No. 3, Lima, Perú. Recurso Digital to-

- mado de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1810-634-X2007000300003&script=sci_arttext&tlng=pt
- Nelson, P.E., Toussoun, T.A., Marasas, W.F.O., (1983). *Fusarium Species: an Illustrated Manual for Identification*. Pennsylvania State University Press, University Park, Pennsylvania.
- Norma Oficial Mexicana NOM-247-SSA1-2008, Productos y servicios. Cereales y sus productos. Cereales, Harinas de cereales, Sémolas o Semolinas. Alimentos a base de: Cereales, Semillas comestibles, De harinas, Sémolas o Semolinas o sus mezclas. Productos de panificación. Disposiciones y especificaciones sanitarias y nutrimentales. Métodos de Prueba. Recurso digital tomado de http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/NOMcereales_12434.pdf.
- Organización Mundial de la Salud (2018), Resumen sobre inocuidad de los alimentos, Departamento de Inocuidad de los Alimentos y Zoonosis. No. WHO/NHM/FOS/RAM/18.1.
- Peñarrieta, J., Tejeda, L., Mollinedo, P., Vila, J., Bravo, J., (2014), Compuestos fenólicos y su presencia en alimentos. *Revista Boliviana de Química*, Vol. 31, No. 2, 68-81, Universidad Mayor de San Andrés, La Paz, Bolivia. Recurso digital tomado de <https://www.redalyc.org/pdf/4263/426339682006.pdf>
- Picot, A., Barreau, C., Pinson-Gadais, L., Caron, D., Lannou, C., Richard-Forget, F., (2010), Factors of the *Fusarium verticillioides*-maize environment modulating fumonisin production. *Critical Reviews in Microbiology*, 36(3), 221-231.
- Picot, A., Atanasova-Pénichon, V., Pons, S., Marchegay, G., Barreau, C., Pinson-Gadais, L., Roucolle, J., Daveau, F., Caron, D., Richard-Forget, F., (2013), Maize kernel antioxidants and their potential involvement in *Fusarium* ear rot resistance. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 3389-3395, DOI: 10.1021/jf4006033.
- Ponts, N., Pinson-Gadais, L., Verdal-Bonnin, M., Barreau, C., Richard-Forget, F. (2006), Accumulation of deoxynivalenol and its 15-acetylated form is significantly modulated by oxidative stress in liquid cultures of *Fusarium graminearum*. *FEMS Microbiology Letters*, 258, 102-107, DOI:10.1111/j.1574-6968.2006.00200.x.
- Ponts, N., Pinson-Gadais, L., Barreau, C., Richard-Forget, F., Ouellet, T. (2007), Exogenous H₂O₂ and catalase treatments interfere with TRI genes expression in liquid cultures of *Fusarium graminearum*. *FEBS Letters* 581, 443-447, DOI: 10.1016/j.febslet.2007.01.003.
- Porrás-Loaiza, A., López-Malo, A., (2009), Importancia de los grupos fenólicos en los alimentos, Temas selectos de Ingeniería de Alimentos 3- 1, 121- 134, Departamento de Ingeniería Química y Alimentos, Universidad de las Américas, Puebla, México. Recurso digital tomado de [https://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No3-Vol-1/TSIA-3\(1\)-Porrás-Loaiza-et-al-2009.pdf](https://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No3-Vol-1/TSIA-3(1)-Porrás-Loaiza-et-al-2009.pdf)
- Reuber, S., Bornman, J.F., Weissenböck, G. (1996), A flavonoid mutant of barley (*Hordeum vulgare* L.) exhibits increased sensitivity to UV-B radiation in the

- primary leaf. *Plant, Cell and Environment*, 19, 593-601. DOI: 10.1111/j.1365-3040.1996.tb00393.x
- Samapundo, S., De Meulenaer, B., Osei-Nimoh, D., Lamboni, Y., Debevere, J., Devlieghere, F., (2007), Can phenolic compounds be used for the protection of corn from fungal invasion and mycotoxin contamination during storage?. *Food Microbiology* 24, 465-473.
- Sampietro, D., Fauguel, C., Vattuone, M., Presello, D., Catalán, C., (2013), Phenylpropanoids from maize pericarp: resistance factors to kernel infection and fumonisin accumulation by *Fusarium verticillioides*. *European Journal of Plant Pathology*, 135, 105-113, DOI 10.1007/s10658-012-0069-3.
- Sánchez-Rangel, D., SanJuan-Badillo, A., Plasencia, J., (2005), Fumonisin production by *Fusarium verticillioides* strains isolated from maize in Mexico and development of a polymerase chain reaction to detect potential toxigenic strains in grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53, 8565-8571.
- Sánchez-Rangel, D. & Plasencia, J., (2010), The role of sphinganine analog mycotoxins on the virulence of plant pathogenic fungi. *Toxin Reviews*, 29(3-4), 73-86, DOI: 10.3109/15569543.2010.515370.
- Shahidi, F., Naczsk, M. (1995), Food phenolics sources, chemistry, effects, applications. Technomic Publishing Co. EE.UU. 106 p.
- Silva, F., Borges, F., Guimarães, C., Lima, J., Matos, C., Reis, S. (2000), Phenolic acids and derivatives: Studies on the relationship among structure, radical scavenging activity, and physicochemical parameters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(6), 2122-2126, DOI: 10.1021/jf9913110.
- Tafolla-Arellano, J. C., González-León, A., Tiznado-Hernández, M. E., Zacarías García, L., Báez-Sañudo, R., (2013), Composición, fisiología y biosíntesis de la cutícula en plantas. *Revista Fitotecnia Mexicana*, Vol. 36, No.1.
- Teodoro, G., Ellepola, K., Seneviratne, C., Koga-Ito, C., (2015), Potential Use of Phenolic Acids as Anti-*Candida* Agents: A Review. *Frontiers in Microbiology*, Vol 6, Article 1420, DOI: 10.3389/fmicb.2015.01420.
- Torres-Sánchez, L., López-Carrillo, L. (2010), Consumo de fumonisinas y daños a la salud humana. *Salud Pública de México* Vol. 52, No. 5, Cuernavaca, Morelos. Recurso digital tomado de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-36342010000500014
- Urías-Orona, V., Heredia, J., Muy-Rangel, D., Niño-Medina, G., (2016), Ácidos fenólicos con actividad antioxidante en salvado de maíz y salvado de trigo. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, Vol.3, No.7, Villahermosa, Tabasco, México. Recurso digital tomado de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-90282016000100005
- Vázquez-Olivo, G., López-Martínez, L., Contreras-Angulo, L., Heredia, J., (2019), Antioxidant capacity of lignin and phenolic compounds from corn stover. *Waste Biomass Valor*, 10, 95, DOI: 10.1007/s12649-017-0028-5.

Páginas WEB

BIOMIN, (2019), World Mycotoxin Survey, Recurso digital tomado de: <https://www.-biomin.net/downloads/>.

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), (2011), Maíz [En línea] (Actualizado en 2011). Disponible en: <https://www.conacyt.gob.mx/cibiogem/index.php/maiz> [Último acceso el 23 de Septiembre de 2020].

SAGARPA, (2017), Maíz Grano Blanco y Amarillo Mexicano, (Planeación Agrícola Nacional 2017 - 2030). Recurso digital tomado de https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/256429/B_sico-Ma_z_Grano_Blanco_y_Amarillo.pdf.

SIAP, (2020), Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, recuperado el 23/Sept/2020 de <https://www.gob.mx/siap>.

X. ANEXO

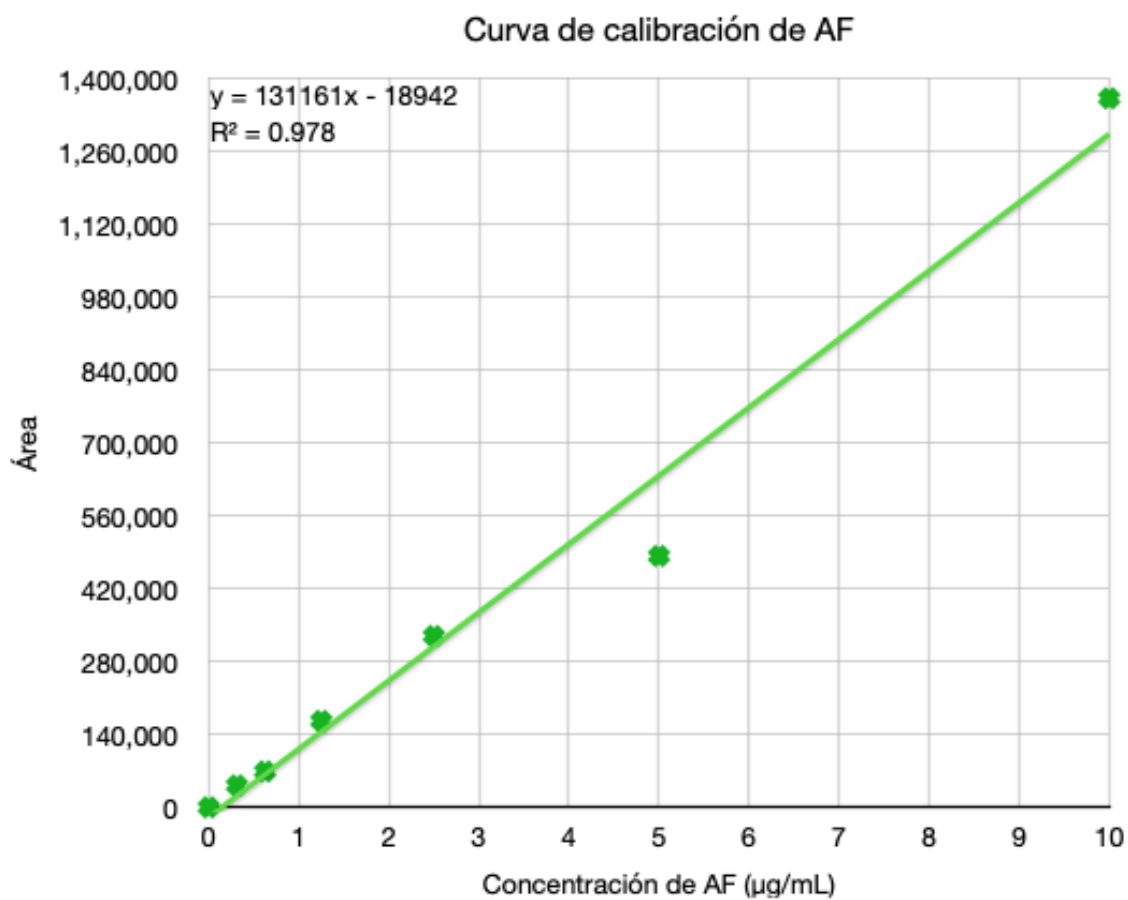


Figura R1: Curva de calibración de AF mediante HPLC (HPLC de fase reversa, columna: C18 Ascentis[®], fase móvil: ácido acético 4% en agua: metanol, 75:25, con un detector de UV-VIS a 335 nm, bomba con flujo de 1.2 mL/min).

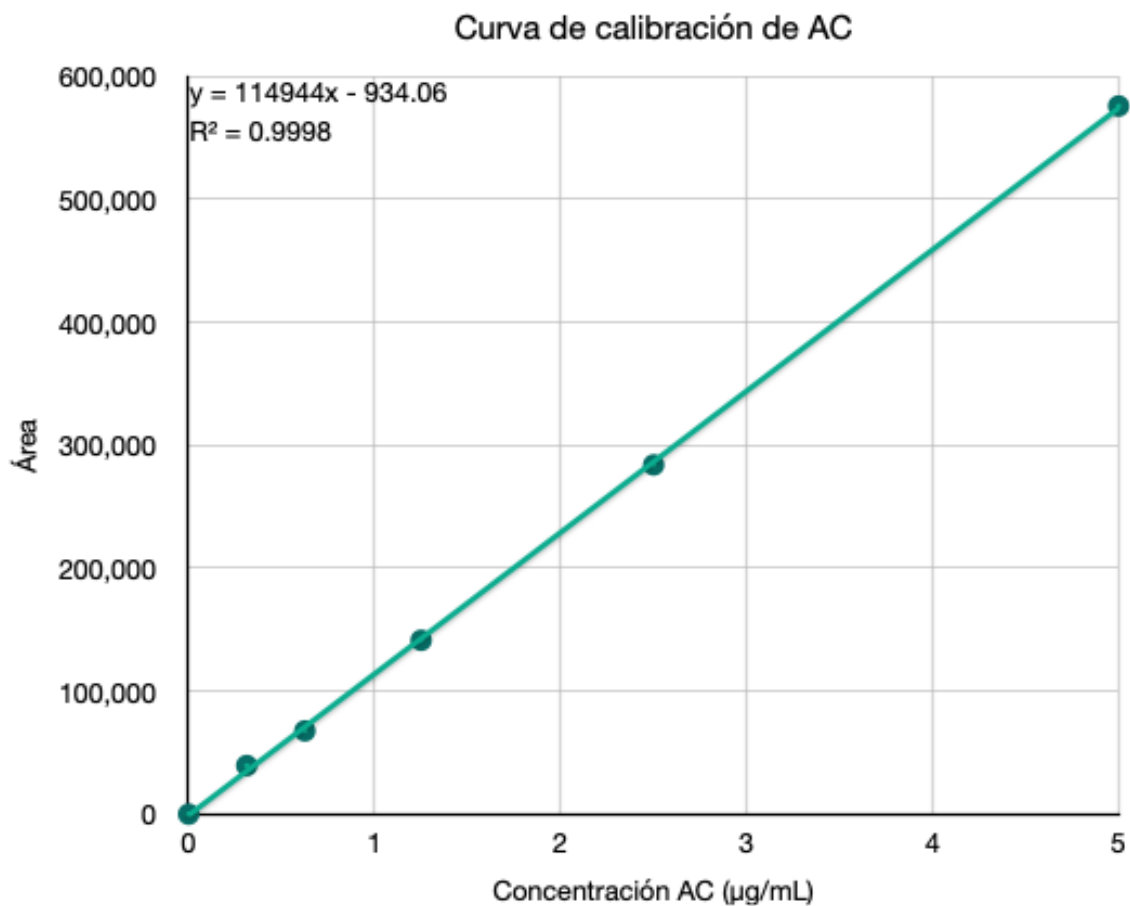


Figura R2: Curva de calibración de AC mediante HPLC (HPLC de fase reversa, columna: C18 Ascentis[®], fase móvil: ácido acético 4% en agua: metanol, 75:25, con un detector de UV-VIS a 335 nm, bomba con flujo de 1.2 mL/min).