

ISBN 970-27-1045-6

CONTAMINACIÓN POR *Fusarium* EN MAÍZ ALMACENADO EN LA CIUDAD DE ZACATECAS Y EFECTO DEL PROCESO DE NIXTAMALIZACIÓN SOBRE FUMONISINAS E HIDROLIZADOS

**Reyes Escobedo Fuensanta del Rocío¹, Reyes Velázquez Waldina Patricia²,
Landeros Ramírez Patricia², Figueroa Gómez Rosa Marina², Rojo Federico².**

¹ Unidad Académica de Ciencias Químicas, Unidad Académica de Medicina Humana y Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma de Zacatecas. ² Departamento de Salud Pública, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Guadalajara.
Correo electrónico: waldinar@cucba.udg.mx

Introducción

El maíz es susceptible a la infección por hongos durante su producción, almacenamiento y/o elaboración de subproductos. En México se reporta un elevado consumo de este cereal y productos derivados como las tortillas (Reyes et al., 2002).

Las especies fúngicas asociadas frecuentemente al maíz pertenecen al complejo *Gibberella fujikuroi* [(Sawada) Ito in Ito & K. Kimura] y a *G. zae* [(anamorfo = *Fusarium graminearum*) Schwabe Petch]. *G. fujikuroi* esta compuesto por especies que comparten características morfológicas similares a *Fusarium* Sección *Liseola* distribuidas en al menos 9 especies biológicas aisladas reproductivamente (Leslie et al., 2004). Dentro de este complejo, las especies que se destacan por asociarse con plantas de maíz son: *F. verticillioides* [(Sacc.) Nirenberg (sinónimo = *F. moniliforme* Sheldon)], *F. proliferatum* [(Matsushima) Nirenberg] y *F. subglutinans* [(Wollenweber y Reinking) Nelson, Tousson y Marasas]. Las infecciones causadas por estas especies se asocian con enfermedades en plántulas, podredumbres de raíz, tallo y mazorcas e inclusive daños en maíz almacenado. Dada la capacidad de producir infecciones asintomáticas, el principal problema relacionado con la presencia de *F. verticillioides* se asocia con la pobre calidad de los granos y la potencial producción de micotoxinas (Munkvold y Desjardins, 1997).

Las micotoxinas se definen como compuestos orgánicos, biológicamente activos y de amplio espectro causantes de intoxicaciones agudas y crónicas, con efectos mutagénicos, teratogénicos y carcinogénicos. La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación estima que las micotoxinas afectan el 25% de la producción agrícola anual. Las fumonisinas (FBs) son producidas principalmente por *F. verticillioides* (Gelderblom et al., 1988), siendo una serie de amino-polioles de cadena larga (20 carbonos) esterificados en los carbonos 14 y 15 con cadenas laterales de ácidos tricarbálicos. Las fumonisinas (FBs), son responsables de la leucoencefalomalacia equina, del edema pulmonar porcino, además de asociarse en humanos con el desarrollo de cáncer esofágico y defectos en tubo neural de recién nacidos en Sudáfrica, China y la India (Riley et al., 1994).

La nixtamalización es el método tradicional para la elaboración de las tortillas de maíz. Los principales beneficios nutricionales de este proceso implican el aumento de la disponibilidad de niacina, lisina y calcio. Este tratamiento ha demostrado gran eficiencia en la descontaminación de las aflatoxinas (Guzman de Peña et al., 1995). Las condiciones de proceso parecen favorecer la hidrólisis de FBs con la generación de HFB₁ y HFB₂. Estos compuestos demostraron ser más tóxicos que las FB₁ y FB₂ (Abbas y col., 1993). Las FBs y sus hidrolizados no deberían estar presentes en las tortillas, sin embargo, las principales variables que afectan el proceso de descontaminación son: remoción incompleta del pericarpio, conjugación de las toxinas a proteínas del maíz, tiempo de cocción y reposo del nixtamal.

Los objetivos del estudio fueron: (i) determinar la contaminación por especies de *Fusarium* de la Sección *Liseola* en el maíz almacenado en tortillerías de la ciudad de Zacatecas, y (ii) evaluar la eficiencia del proceso de nixtamalización sobre la reducción de fumonisinas en nixtamal, masa y tortilla y la generación de sus hidrolizados.

Materiales y métodos

Muestreo. Un total de 16 muestras (3 replicas/muestra) de maíz, nixtamal, masa y tortilla se obtuvieron de 4 tortillerías de la Ciudad de Zacatecas, ubicadas 2 en el centro de la Ciudad (molinos B y C) y 2 en la periferia de la misma (molinos A y D). Se definió el método de recolección por conveniencia y no probabilístico, en una única fecha de muestreo (noviembre 2005) y durante las actividades normales de elaboración y producción de los molinos.

Aislamiento e identificación de especies de *Fusarium*. De cada muestra de maíz se tomaron cien granos, los cuales se desinfectaron superficialmente con NaClO al 1% (1 min). Los granos se lavaron tres veces con agua destilada estéril y se depositaron en el medio de Nash–Snyder (Nelson et al., 1983). Las muestras se incubaron a 24°C durante 7 días bajo ciclos de 12h/12h de luz blanca y luz negra, respectivamente. Se determinó el porcentaje de infección con especies de *Fusarium* para luego transferir las mismas al medio Agar Hojas de Clavel (AHC) y Agar papa glucosado (APG). Para realizar la identificación se utilizaron las claves de Nelson et al. (1983).

Determinación de los niveles de fumonisinas e hidrolizados en maíz, nixtamal, masa y tortilla. La extracción y limpieza se realizó de acuerdo a la técnica descrita por Scott y Lawrence (1996). Se licuan 10 g de la muestra con 50 mL de metanol:agua (8:2 v v⁻¹) durante 2 minutos y se filtran en papel Whatman N°4. Se agrega el extracto a la columna Supelclean LC-SAX (Supelco) para la separación de las fumonisinas. La columna C₁₈-SPE (Supelco) se utilizó para separar los hidrolizados de las FBs. Las FBs se eluyeron con 1 mL de metanol:ácido acético (9:1) y los hidrolizados con 1 mL de metanol. Los residuos se evaporaron a sequedad para ser redissueltos en 100 µL de acetotrinilo:agua (5:5 v v⁻¹). Los soluciones testigo de HFB₁ y HFB₂ fueron preparados de acuerdo a la metodología descrita por Thakur y Smith (1996).

Cuantificación de FB₁ y FB₂. Para la detección y cuantificación de FB₁ y FB₂ se siguió la metodología propuesta por Shephard et al. (1990) modificada por Doko et al. (1995). Una alícuota de cada extracto se derivatizó con una solución de OPA/MCE. Las FBs derivatizadas se analizaron usando un sistema de detección de fluorescencia/HPLC fase reversa. La fase móvil empleada fue metanol/fosfato de sodio dihidrogenado 0.1 M (3:1, v v⁻¹), el pH de la solución se ajustó a 3.35 con ácido ortofosfórico. El flujo fue establecido en 1.5 mL min⁻¹. Los rangos de excitación y emisión usados fueron 335 y 440 nm, respectivamente. El límite de detección de la técnica fue de 1 µg g⁻¹ y el porcentaje de recuperación de la técnica fue > 85%. Los tiempos de retención para las FB₁ y FB₂ fueron 3 y 6.3 minutos, respectivamente.

Cuantificación de HFB₁ y HFB₂. La detección y cuantificación de HFB₁ y HFB₂ se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Thakur y Smith (1996). Una alícuota de los extractos se derivatizó con OPA/MCE. El sistema cromatográfico y la columna de separación fueron similares a la metodología utilizada en FBs. La solución A de la fase móvil estaba constituida por un mezcla de Acetonitrilo / Agua / Ácido Acético (40:59:1 v v⁻¹) y la solución B en la realación 60:39:1 v v⁻¹. El programa de elusión consistió en un gradiente lineal entre las soluciones A y B con 100% de A al inicio y 100% de B a los 9 minutos. Posteriormente, la fase móvil fue acetonitrilo (100%) hasta los 17 min. El flujo fue de 1 mL min⁻¹ y los rangos de excitación y emisión usados fueron de 229 y 442 nm, respectivamente. Los tiempos de retención para HFB₁ y HFB₂ fueron de 13.1 min. y 19.0 min, respectivamente.

Resultados y discusión

Los resultados del presente estudio demuestran que el maíz almacenado en los molinos de las tortillerías de Zacatecas presentó alto porcentaje de infección con especies de *Fusarium* (media 89%; rango 78%-99%), siendo *F. verticillioides* la especie predominante en todas las muestras evaluadas seguida por *F. subglutinans* y *F. proliferatum* (Tabla 1). Estos resultados concuerdan con lo informado por otros investigadores a nivel mundial (Bottalico, 1998). La alta frecuencia de presentación de *F. verticillioides* en el maíz almacenado en Zacatecas, coincide con otros estudios realizados en México, en los estados de Nuevo León (Desjardins et al. 1994), Jalisco (Reyes et al., 2000) y Sonora (Cortez-Rocha et al. 2003). En distintas regiones geográficas, de climas y cultivares diferentes, la distribución de las especies de *Fusarium* de la Sección *Liseola* puede variar. Se ha demostrado que *F. verticillioides* tiene una distribución cosmopolita, no sólo en climas húmedos y templados sino también en regiones tropicales y subtropicales.

Tabla 1. Incidencia de *Fusarium* (Sección *Liseola*) en muestras de cuatro molinos de la ciudad de Zacatecas

M	Infección con <i>Fusarium</i> spp. ^a número ^b (%)	Distribución de las especies ^a			Otros ^b número ^{b,c} (%)
		<i>F.</i> <i>verticillioides</i> número ^b (%)	<i>F.</i> <i>subglutinans</i> número ^b (%)	<i>F.</i> <i>proliferatum</i> número ^b (%)	
A	54 (80)	34 (63)	3 (5.5)	3 (5.5)	14 (26)
B	54 (78)	47 (87)	2 (4)	3 (5)	2 (4)
C	54 (99)	50 (93)	3 (5)	-	1 (2)
D	54 (99)	11 (20)	9 (17)	4 (7)	30 (56)

Referencia: M: molinos

El ciclo de infección propuesto para *F. verticillioides* en maíz (Munkvold y Desjardins, 1997), describe la posibilidad de que esta especie infecte el cultivo en diferentes estadios de su desarrollo y pueda encontrarse asociado a las plantas desde etapas tempranas, inclusive hasta la época reproductiva y cosecha de los frutos. Como parte de las estrategias tendientes a reducir el impacto negativo dado por la presencia de estos hongos en el cultivo, es necesario desarrollar variedades de maíz resistentes a la infección y practicar la rotación de cultivos. La utilización de cultivares transgénicos podría reducir la vulnerabilidad del maíz a las injurias producidas por los insectos y, por ende, a la presencia de especies de *Fusarium* y sus micotoxinas. Así mismo, es indispensable contar con un sistema de almacenamiento del maíz que reúna condiciones mínimas para impedir el desarrollo fúngico (Munkvold y Hellmich, 2000).

El contenido de FBs totales en todos los molinos se muestra en la Tabla 2. En los molinos A, C y D, el análisis determinó que no existió una reducción significativa entre el maíz y los productos de este molino ($P < 0.05$). En el molino B, el contenido de FBs totales fue de $1.16 \mu\text{g g}^{-1}$ en el maíz, siendo éste el valor más alto entre todos. El análisis estadístico determinó que existió una reducción significativa ($P < 0.05$) entre el maíz y el nixtamal ($0.923 \mu\text{g g}^{-1}$), masa ($0.988 \mu\text{g g}^{-1}$) y tortilla ($0.945 \mu\text{g g}^{-1}$). Por otra parte, los valores de FBs totales encontrados en los productos nixtamalizados fueron similares estadísticamente ($P > 0.05$). El porcentaje de reducción de la contaminación por FBs totales fue del 42.5, 38.4 y 41% para nixtamal, masa y tortilla, respectivamente.

Tabla 2. Niveles de contaminación por fumonisinas totales ($FB_1 + FB_2$) e HFB_1 ($\mu g g^{-1}$) en maíz, nixtamal, masa y tortilla
LD para FBs = $1 \mu g g^{-1}$

En ninguna de las muestras analizadas se detectó HFB_2 . Los niveles de FBs totales y de sus hidrolizados son bajos si se comparan con los reportados por Reyes et al. (2002), quienes encontraron niveles de FBs totales de $1.47 \mu g g^{-1}$ en nixtamal, $2.95 \mu g g^{-1}$ en masa y de $1.41 \mu g g^{-1}$ en tortillas; y niveles de HFB_1 de $0.524 \mu g g^{-1}$ y de $0.874 \mu g g^{-1}$ en masa y tortilla. Estudios realizados por Dombrink et al. (2000), demuestran que el proceso tradicional de

	Molino A		Molino B		Molino C		Molino D	
	FB_1+FB_2 $\mu g g^{-1}$	HFB_1 $\mu g g^{-1}$	FB_1+FB_2 $\mu g g^{-1}$	HFB_1 $\mu g g^{-1}$	FB_1+FB_2 $\mu g g^{-1}$	HFB_1 $\mu g g^{-1}$	FB_1+FB_2 $\mu g g^{-1}$	HFB_1 $\mu g g^{-1}$
MAIZ	0.980	--	1.605 a	--	0.560	--	0.502	--
NIXTAMAL	0.961	0.342	0.923 b	0.032	0.499	0.064	0.511	0.080
MASA	0.970	0.320	0.988 b	0.036	0.516	0.021	0.522	0.092
TORTILLA	0.928	0.042	0.945 b	0.017	0.504	0.030	0.528	0.040

nixtamalización, cuando cubre los tiempos y temperaturas recomendados de cocción, reducen significativamente la contaminación de FB_1 ($0.50 \mu g g^{-1}$) y de HFB_1 ($0.36 \mu g g^{-1}$), teniendo previamente una contaminación del maíz de $8.79 \mu g g^{-1}$. Estos resultados son comparables a los encontrados en el presente estudio, sin embargo debe mencionarse que el nivel de contaminación inicial del maíz procesado en los molinos de Zacatecas fue menor. Sydenham et al. (1995) han reportado que el proceso de nixtamalización reduce el contenido de fumonisinas dependiendo del grado de remoción del pericarpio, sin embargo, otros estudios demuestran la posible conjugación de estos compuestos a proteínas del maíz. El contenido final medio de $FBs + HFB_1$ representó el 44% de la concentración inicial de FB_1 presente en el maíz almacenado.

Conclusiones

El maíz almacenado en los molinos del estado de Zacatecas presentó alto porcentaje de infección con especies de *Fusarium*, siendo la especie de mayor presentación *F. verticillioides*, seguida de *F. subglutinans* y *F. proliferatum*. Se determinó contaminación por fumonisinas, los niveles de FBs totales e HFB1 en los productos nixtamalizados se consideran aceptables para el consumo humano. La nixtamalización del maíz generó la formación de hidrolizados de fumonisinas B₁ (HFB₁) en los productos nixtamalizados, sin embargo, bajo condiciones adecuadas del proceso disminuyeron los niveles de contaminación.

Bibliografía

- Abbas, H. K., Gelderblom, W. C. A., Cawood, M. E., Shier, W. T. (1993). Biological activities of fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme* in jimsonweed (*Datura stramonium* L.) and mammalian cell cultures. *Toxicology*. 31: 345-353.
- Bottalico, A. (1998). *Fusarium* diseases of cereals: species complex and related mycotoxin profiles, in Europe. *J. Plant Pathol.* 80: 85-103.
- Cortez-Rocha, M. O.; Ramírez-Asrudillo, W. R.; Sanchez-Mariñez, R. I.; Rosas-Burgos, E. C.; Wong-Corral, F. J.; Borboa-Flores, J.; Castellón-Campaña, L. G., Tequida-Meneses, M. (2003). Fumonisins and fungal species in corn from Sonora, México. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 70: 668-673.
- Desjardins, A. E.; Plattner, R. D.; Nelson, P. E. (1994). Fumonisin production and other traits of *Fusarium moniliforme* from maize in northeast Mexico. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 1695-1697.
- Dombrink-Kurtzman M.A., Dvorak, T.J., Barron M.E., Rooney, L.W. (2000) Effect of nixtamalization (alkaline cooking) on fumonisin-contaminated corn for production of masa and tortillas. *J. Agric. Food Chem.* 48(11):5781-5786.
- Doko, B., Rapior, S., Visconti, A., Schjoth, J. (1995). Incidence and levels of fumonisins contamination in maize genotypes grown in Europe and Africa. *J. Agric. Food Chem.* 43: 429-434.
- Guzman de Peña, D., Trudel, L. And Wogan, G. N. 1995. Corn nixtamalization and the fate of radiolabelled aflatoxin B1 in tortilla making process. *Bull Environ, Contaminations, Toxicology* 55: 858-864.
- Leslie, J. F., Zeller, K. A., Logrieco, A., Mule, G., Moretti, A., Ritieni, A. (2004). Species Diversity of and Toxin Production by Gibberella fujikuroi Species Complex Strains Isolated from Native Prairie Grasses in Kansas. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:2254-2262.
- Munkvold, G. P., Desjardins A. E. 1997. Fumonisins in Maize. Can we reduce their occurrence?. *Plant Dis.* 81(6):556-565.
- Munkvold, G. P., Hellmich, R. L. 2000. Genetically modified, insect resistant maize: Implications for management of ear and stalk diseases. Online. *Plant Health Progress* doi:10.1094/PHP-2000-0912-01-RV.
- Nelson, P. E.; Toussoun, T. A.; Marasas, W. F. O. (1983). *Fusarium* species. An illustrated manual for identification. The Pennsylvania State. University Press. University Park.

- Reyes V., WP.; Landeros R., P.; Ramirez A., A.; Carbajal M., M. (2002). Efecto del proceso de nixtamaización sobre los niveles de Fumonisin y la Producción de Hidrolizados en masa y tortillas. *Scientia-Cucba*. 4(2): 173-182.
- Reyes V., WP.; Nuño R., A.; Ramírez A., A and A.V. González A. (2000). Detección de *Fusarium moniliforme* y Fumonisin en tres híbridos de maíz en Ameca, Jalisco. *Scientia-Cucba*. 2(1): 594-603.
- Reynoso, M. M., Torres, A. M., Chulze, S. N. (2004). Fusaproliferin, beauvericin and fumonisin production by different mating populations among the *Gibberella fujikuroi* complex isolated from maize. *Mycol. Res.* 108:154-160.
- Riley, R.T., Voss, K. A., Yoo, H. G., Gelderblom, W. A. C., Merrill, A. H. Jr. (1994). Mechanism of fumonisins toxicity and carcinogenesis. *J. Food Prot.* 57: 638-645.
- Shephard G.S., Sydenham E.W., Thiel P.G., Gelderblom, W. A. C. (1990). Quantitative determination of fumonisins B1 and B2 by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Liq. Chromatogr.* 13:2077-2080.
- Sydenham, E. W., Stockenstrom, S., Thiel, P. G., Shephard, G. S., Kooch, K. R., Marasas, W. F. O., (1995). Potential of alkaline hydrolysis for the removal of fumonisin from contaminated corn. *J. Agric. Food Chem.* 43: 1198-1201.
- Thakur, R., Smith, J. S. 1996. Determination of fumonisin B1 and B2 and their major hydrolysis products in corn, feed and meat, using HPLC. *J. Agric. Food Chem.* 44:1047-1052.