**Determinación de fumonisinas en maíz de consumo humano y forrajero expedido en la ciudad de Tepic.**

Autor principal: Robledo Gutiérrez Reyna Guadalupe2

Coautores: Zambrano Soria M3; Carrillo Villalobos R2; Bueno Duran A2,3; Navidad Murrieta MS3; Ventura Ramón GH2,3; Toledo Ibarra GA1,3, Barcelos García RG3, Girón Pérez MI1,3.

Universidad Autónoma de Nayarit, 1Secreataría de Investigación y Posgrado, Laboratorio de Inmunotoxicología. 2Unidad Académica de Ciencias Químicas Biológicas y Farmacéuticas. Cd. De la Cultura Amado Nervo. C.P. 63000. Tepic, Nayarit. 3Unidad Especializada Laboratorio Nacional para la Investigación en Inocuidad Alimentaria-LANIIA-Unidad Nayarit. Centro Nayarita de Innovación y Transferencia de Tecnología A.C. Calle Tres S/N, Col. Cd. Industrial C.P. 63173. Tepic, Nayarit; México.

Resumen: Las fumonisinas son micotoxinas producidas principalmente por hongos de las especies: *Fusarium verticillioides, proliferatum, nygamai, anthophilum, napiforme, polyphialidicum, y oxysporum*. Estas micotoxinas se encuentran catalogadas por la IARC en el grupo 2B debido a sus efectos tóxicos. El objetivo de este trabajo fue determinar y cuantificar la presencia de Fumonisinas en Maíz en 16 muestras de maíz para el consumo humano y 15 muestras de maíz forrajero, en ambos casos de los diversos mercados establecidos en la ciudad de Tepic, Nayarit. Se realizó la determinación de fumonisinas por medio de ELISA competitiva utilizando un kit comercial RIDASCREEN®FAST Fumonisin R-Biopharme, el cual cuantifica la concentración de fumonisinas totales comparando los valores de las muestras contra una curva estándar. Una vez evaluadas las muestras se encontró que en el caso de maíz pozolero las concentraciones mínimas de fumonisinas fueron <0.222ppm, en cuanto al maíz forrajero las concentraciones se encontraron en niveles de <0.222ppm hasta 4 ppm.

**1-Introducción**

Las micotoxinas son metabolitos fúngicos secundarios producidos por mohos filamentosos. Son compuestos de bajo peso molecular y poseen una estructura química y actividad toxicológica muy variada (Ramos, 2011). En la actualidad, se conocen más de 300 micotoxinas, aunque la atención científica se centra principalmente en aquellas que han demostrado ser cancerígenos y/o tóxicos. La exposición humana a las micotoxinas puede resultar de consumo de alimentos derivados de las plantas los cuales son contaminados por el arrastre de dichas micotoxinas, otra fuente de exposición es por medio de alimentos como carne y huevos (Sánchez &Carrillo, 2010).

Las micotoxinas de mayor importancia de la salud pública y la agro-económica incluyen las aflatoxinas, ocratoxinas, tricotecenos, zearalenona, fumonisinas, y alcaloides del ergot (Zain, 2011).

Fumonisinas y su estructura química

Las fumonisinas son micotoxinas producidas principalmente por hongos de las especies: *Fusarium verticillioides, fusarium proliferatum, fusarium nygamai, fusarium anthophilum, fusarium napiforme, fusarium polyphialidicum, y fusarium oxysporum.* (Rodríguez et, al.2002). Estructuralmente, las fumonisinas son amino-polialcoholes formados por una cadena alifática de 20 carbonos sustituida con dos grupos tricarboxilicos unidos mediante enlaces tipo éster, los cuales les confieren solubilidad en agua, grupos hidroxilos, grupos metilo y amina (Martínez Cardoza 2016).

Efectos tóxicos de las fumonisinas

Estas toxinas causan leucoencefalomacia en equinos, edema pulmonar e hidrotórax en porcinos, así como efectos carcinogénicos y apoptosis en el hígado. En los seres humanos existe una asociación probable con el desarrollo de cáncer de esófago y la exposición a FB1. (Ramos,2011). La Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (IARC), catalogó a las fumonisinas, como posibles carcinógenos humanos (Grupo 2B). (Zain, 2011).

Debido a que las fumonisinas tienen una estructura química similar a la cadena larga de los precursores de los esfingolípidos, se considera que el metabolismo de estos últimos es el blanco de la acción tóxica de la fumonisina. El metabolismo de los esfingolípidos consta de dos etapas, la síntesis de *novo* a partir del complejo serina palmitoil-CoA y el recambio de esfingolípidos que incluye la hidrólisis de esfingolípidos complejos. En ambas etapas interviene la enzima ceramida sintetasa, la cual es bloqueada por la acción de la fumonisina. Este bloqueo conlleva la inhibición en la síntesis de ceramida, incremento de la esfinganina y la esfingosina, una mayor degradación de las bases esfingoides provenientes de la dieta, y finalmente, una reducción en la formación de esfingomielina. (Sánchez & Carrillo,2010).

Factores determinantes en la producción de micotoxinas por fusarium

Son muchos los estudios realizados que tratan de determinar las condiciones ambientales que favorecen la biosíntesis de micotoxinas producidas por el género fusarium, entre los factores ambientales se encuentran actividad de agua (aw) la cual debe de oscilar entre 0.93 y 0.98, temperatura optima de 20-26°C (Mateo et al.,2002; Larsen et al.,2004).

MAÍZ EN MEXICO

De acuerdo a datos del año 2015, proporcionados por el atlas de agroalimentarios, México ocupa el décimo lugar en producción mundial de maíz forrajero, con una producción de 12,615,756 toneladas. En el caso de maíz de grano destinado al consumo humano, nuestro país ocupa el séptimo lugar a nivel mundial con una producción de 22,663,953 toneladas. Debido a la demanda del producto su importación ha aumentado significativamente hasta llegar a los 11.9 millones de toneladas en el año 2015, esto se debe a que la dieta de la población de nuestro país tiene como base dicho producto desde la tortilla, hasta productos comerciales como las harinas. (SAGARPA, 2016).

**ANTECEDENTES**

Aunque el descubrimiento de las fumonisinas no tiene mucho tiempo, la toxicidad del maíz contaminado por *Fusarium moniliforme* ha sido bien documentada por más de cien años. En 1850 Graham describió por primera vez en Estados Unidos una enfermedad de animales de granja conocida como "envenenamiento por maíz enmohecido" o "estancos ciegos". El agente causal permaneció desconocido hasta que Sheldon et.al en 1904 descubrió la relación que existía entre el crecimiento del hongo *Fusarium moniliforme* con un brote de enfermedad de maíz mohosa de caballos, vacas, mulos, cerdos, etc. Las fumonisinas fueron aisladas y descritas por primera vez en Sudáfrica en 1988, para el año 1993 la IARC ya las había categorizado como posibles carcinógenos en humanos a partir de este hecho se comenzaron a realizar investigaciones sobre la presencia de dichas fumonisinas en alimentos especialmente cereales y productos a base de maíz. Ghiasian y colaboradores en 2006 realizaron una evaluación sobre el contenido de fumonisinas en el maíz de las principales regiones en Irán, obteniendo que todas las muestras de la región de Mazandaran estaban contaminados con fumonisinas, en concentraciones promedio de 10.674 mg/kg. Para el 2007 Hollub evaluó la presencia de fumonisinas en alimentos a base de maíz en el estado de Texas, obteniendo como resultados que la concentración fumonisinas en dichos productos van desde 0,047 a 4,9 pg/g de muestra. Para el 2011 Magro y colaboradores evaluaron los niveles de fumonisinas B1 y B2 en maíz comercial en Estados Unidos encontrando una concentración superior a 15 µg/kg, esto en todas las muestras. Así mismo en el año 2012 Zhang y colaboradores realizaron análisis de maíz en las principales zonas productoras en el oeste de China encontrando que la concentración de fumonisinas está entre 186- 784 µg/ g en la mayoría de las muestras. Para el año 2016, Cong realizó un monitoreo de muestras de maíz en Shandong Provincia de China, obteniendo que el 19% de las muestras tenían niveles de contaminación por fumonisinas superiores a 2000 y 4000µg/g, que son los límites máximos establecidos por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos y la Comisión Europea, respectivamente.

**2.Justificación**

El maíz es uno de los principales granos de consumo diario en las familias mexicana, donde se han reportado cantidades la presencia de hongos productores de Fumonisinas, dichas micotoxinas provocan daños a la salud, así como perdidas económicas significativas a los productores.

En este trabajo se evaluarán el maíz forrajero y de consumo humano, ya que de acuerdo a datos del año 2015 proporcionados por el atlas de agroalimentarios México ocupa el décimo lugar en producción de maíz forrajero, por otra parte, ha incrementado las exportaciones e importaciones de dicho producto. En el caso de maíz de grano destinado al consumo humano nuestro país ocupa el séptimo lugar a nivel mundial, debido a la demanda del producto su importación ha aumentado significativamente en el año 2015, esto se debe a que la dieta de la población de nuestro país tiene como base dicho producto desde la tortilla, hasta productos comerciales como las harinas. Nayarit no se encuentra entre los estados con mayor producción de maíz, no obstante, la dieta de los nayaritas también lo incluye como principal materia prima, de igual manera la ganadería en el estado es una de las principales actividades económicas para lo cual utilizan como principal alimento el maíz forrajero, a pesar de los riesgos que implica la contaminación de dichos granos en nuestro estado son pocos, sino es que nulos, los estudios que se han realizado sobre dicho tema , por lo que en este trabajo pretendemos brindar información que sea útil para la regulación de dichos productos y así disminuir el riesgo que esto puede ser tanto para las personas como para los animales de nuestro estado.

**3.Objetivos**

3.1Objetivo general

Evaluar la presencia de fumonisinas en Maíz de uso forrajero y para consumo humano que se expende en Tepic Nayarit.

3.2. Objetivos específicos

1. Determinar Fumonisinas por un método inmunoenzimatico
2. Determinar la presencia de mohos y hongos productores de fumonisinas
3. Determinar la aw en las muestras

**4.Metodologia**

4.1Muestreo

Para la colección de las muestras se localizaron los expendios de maíz más importantes de la ciudad de Tepic, Nayarit, de los cuales se colectaron 15 muestras de granos de maíz forrajero y 16 muestras de consumo humano, las cuales fueron transportadas al laboratorio en bolsas cerradas para su posterior análisis.

4.2 Determinación de Fumonisinas

La determinación de Fumonisinas se realizó con un kit comercial (RIDASCREEN®FAST Fumonisin R-Biopharm) para la determinación de fumonisinas totales. se pesaron 5g de la muestra de maíz se le agrego 25 ml de metanol al 70%, se licuo por 2 min, posteriormente se filtró la muestra través de un papel de filtro Whatman número 1, a partir de este filtrado se realizó una dilución 1:14 con agua destilada, el filtrado obtenido se utilizó para el análisis de fumonisinas correspondiente. Para lo cual se agregaron 50 μL de los estándares y de las muestras a analizar a los pocillos de la placa, enseguida se agregaron 50 μL del conjugado fumonisina -enzimay 50 μL del anticuerpo anti-fumonisina, se mezclaron e incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente.A continuación, se vaciaron sobre un papel absorbente limpio y se realizaron tres lavados adicionando 250 μL del tampón de lavado a cada pocillo. Enseguida se agregaron 100 μL del substrato/cromógeno a cada pocillo y se mezclaron e incubaron por 5 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente. Finalmente se agregaron 100 μL de la solución stop a cada pocillo mezclando suavemente para posteriormente medir la absorbancia a 450 nm en un lector de micro placa (EPOCH).

4.3 Determinación de mohos y hongos productores de fumonisinas

Se realizará conforme a NOM-111-SSA1-1994., bienes y servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos, para lo cual se pesa 10 gr de muestra y se colocan en 90ml de solución reguladora de fosfatos, posteriormente se coloca por duplicado en cajas Petri 1 ml de la muestra, y se le agrega agar papa dextrosa acidificado, dichas cajas se incuban a temperatura ambiente. Una vez trascurrido el tiempo de incubación se realiza una resiembra en agar rosa de bengala, y posteriormente se procede a la identificación microscópica del hongo.

4.4Determinación de actividad de agua

Se llevará a cabo en base a la norma NMX-FF-034/2-SCFI-2003.Productos alimenticios no industrializados para uso humano - cereales - maíz amarillo para

elaboración de almidones y derivados especificaciones y métodos de prueba. Utilizando un medidor de la marca aqualab.

4.5 Análisis de datos

Las concentraciones de fumonisinas fueron obtenidas mediante el software Ridasoft Win . Net que determina concentración de fumonisinas totales.

5.**Avances de resultados y discusión**

Como se muestras en la figura 1 el coeficiente de correlación obtenido en la curva de calibración fue de 0.9492

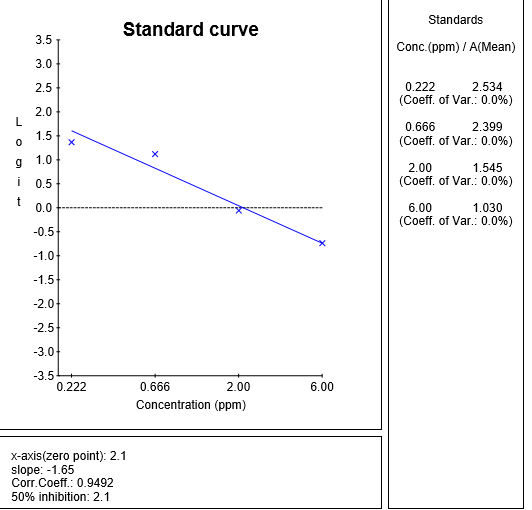
****

Figura 1. Curva de calibración estándar de fumonisinas

Los resultados obtenidos para maíz de consumo humano fueron desde <0.22 hasta 0.459 mg/Kg (tabla 1), y en el caso del maíz forrajero se registraron valores que van desde no calculables hasta 4 mg/kg (tabla 2).

Se encontró mayor concentración de fumonisina en maíz forrajero que en maíz de consumo humano, aun así, en ambos casos los niveles de dichas toxinas se encuentran dentro del nivel máximo permitido por la FDA (2003) los cuales son de 4 mg/kg para muestras de maíz de consumo humano y para maíz de uso forrajero un nivel máximo de 5 mg/kg, dichos valores pueden varias de acuerdo a las condiciones y necesidades de cada país.

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| |  |  | | --- | --- | | Tabla 1. Concentración de fumonisinas en maíz de consumo humano | | | Muestra | Fumonisinas totales  (mg/Kg) | | 1 | <0.22 | | 2 | <0.22 | | 3 | <0.22 | | 4 | 0.318 | | 5 | <0.22 | | 6 | <0.22 | | 7 | <0.22 | | 8 | 0.459 | | 9 | <0.22 | | 10 | <0.22 | | 11 | <0.22 | | 12 | <0.22 | | 13 | <0.22 | | 14 | <0.22 | | 15  16 | <0.22  <0.22 | | |  |  | | --- | --- | | Tabla 2. Concentración de fumonisinas en maíz forrajero | | | Muestra | Fumonisinas totales  (mg/Kg) | | 1 | 0.300 | | 2 | No calculable | | 3 | 0.713 | | 4 | 0.705 | | 5 | 0.375 | | 6 | 0.304 | | 7 | 0.620 | | 8 | No calculable | | 9 | 4.000 | | 10 | 0.640 | | 11 | 0.436 | | 12 | 0.631 | | 13 | 0.549 | | 14 | 0.568 | | 15 | 3.005 | |  |  | |

Los resultados obtenidos en este estudio muestran que las concentraciones de fumonisinas en el maíz tanto forrajero como de consumo humano expendido en la ciudad de Tepic es menor que lo reportado en otras partes del país.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Cuadro 1 Evidencia de la contaminación por fumonisina en maíz en México | | |
| Autor | Localidad | Concentración |
| Dejardins y col (1994) | Nuevo León | 10 a 9000 ppm |
| Robledo y col (2001) | Nayarit | 0.27 a 5.6 ppm |
| Cortez Rocha y cols (2003) | Sonora | 1.5-6.8ppm |
| Reyes- Velázquez y cols (2008) | Jalisco | <0.7ppm |
| Este estudio (maíz de consumo humano) | Nayarit | <0.22 – 0.459 ppm |
| Este estudio (maíz forrajero) | Nayarit | No calculable- 4.00 ppm |

Aunque nuestro resultados arrojen que las muestras se encuentran dentro del rango de niveles permisibles por la FDA ,también demuestran que tanto el maíz de consumo humano como el maíz forrajero contienen la presencia de dichas toxinas lo cual es preocupante ya que en Nayarit el maíz es la base alimenticia de la población, de igual manera estas fumonisinas se pueden acumular en el tejido y músculos de los animales que consumen dicho maíz, generando un riesgo a la población debido a la toxicidad crónica que dichas sustancias generan; es importante destacar que en México no existe regulación alguna sobre estas toxicinas lo que genera un riesgo latente ya que tanto productores como vendedores no están informados sobre las medidas que pueden reducir o eliminar estos metabolitos por lo tanto exponen a la población que consume sus productos .

**6-Conclusion**

Una vez evaluadas las muestras se encontró que en el caso de maíz de consumo humano las concentraciones mínimas de fumonisinas fueron <0.22ppm, en cuanto al maíz forrajero las concentraciones se encontraron en niveles desde no detectables hasta 4ppm. En conclusión, para ambos casos los niveles de fumonisinas presentes se encuentran dentro de los límites establecidos por FDA en su programa de micotoxinas, pero aun así es necesario la implementación de normativas a nivel nacional, y la realización de estudios más detallados de los niveles de estas toxinas en distintas matrices de importancia agroalimentaria.

Referencias

1. Ramos., A, J. (2011). Micotoxinas y Micotoxicosis.Madrid España: AMV EDICIONES.
2. Sánchez, L. T., & Carrillo, L. L. (2010). Fumonisin in take and human health. Salud Publica de México, 34-48.
3. Zain, M. E. (2011). Impact of mycotoxins on humans and animals. Journal of Saudi Chemical Society, 129-114.
4. Martínez Cardoza Y. (2016). Detección de hongos en semillas de maíz. (tesis de licenciatura). Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Coahuila México.
5. Caamaño Caao A. (2013). Prevención da contaminación con fumonisinas no millo. (memorias de doctorado). Universidad de Vigo, España.
6. Franco, A. (2016). Manual de manejo higiénico de los alimentos. México: Amos Instituto Superior en Salud.
7. IARC (2002). Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. In: Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Lyon (France): IARC Press; p. 301–66.
8. Chu FS& Li GY. (1994) Simultaneous occurrence of fumonisin B-1 and other mycotoxins in mouldy corn collected from the Peoples Republic of China in regions with high incidences of esophageal cancer. Appl Environ Microbiol ;60:847–52
9. Guo,et al. (2016) Fusarium species identification and fumonisin production in maize kernels from Shandong Province, China, from 2012 to 2014.China: TAYLOR & FRANCIS LTD, 2-4 PARK SQUARE, MILTON PARK, ABINGDON OR14 4RN, OXON, ENGLAND.
10. Magro, S. L., Campaniello, M., Nardiello, D. & Muscarella, M. (2011), Assessment of Fumonisins B1 and B2 Levels in Commercial Maize-Based Food Products by Liquid Chromatography with Fluorimetric Detection and Postcolumn Chemical Derivatization. Journal of Food Science,,
11. Rodrigues ,et al(2002). Aspectos relacionados à ocorrência e mecanismo de ação de fumonisinas: Ciência Rural Santa Maria.
12. NOM -111-ssa1-1994, bienes y servicios. método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos.
13. Nguyen H. P.,Nguyen Q.T., Brian O.,& Hans P (2015). Aflatoxins, Fumonisins and Zearalenone Contamination of Maize in the Southeastern and Central Highlands Provinces of Vietnam;MDPI Agriculture.