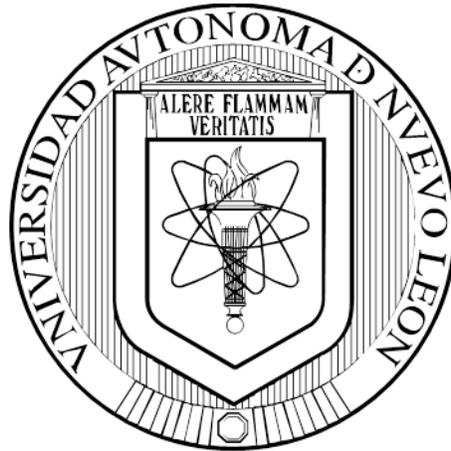


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



TESIS

**OCURRENCIA DE FUMONISINAS TOTALES Y FB1 EN FORRAJES
HENIFICADOS DESTINADOS AL CONSUMO EQUINO**

POR

LUIS CARLOS PEÑA ACOSTA

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER
EL GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIA ANIMAL**

SEPTIEMBRE, 2017

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
FACULTAD DE AGRONOMÍA



TESIS

**OCURRENCIA DE FUMONISINAS TOTALES Y FB1 EN FORRAJES
HENIFICADOS DESTINADOS AL CONSUMO EQUINO**

POR

LUIS CARLOS PEÑA ACOSTA

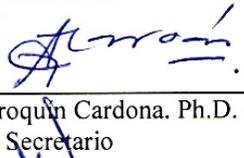
**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER
EL GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIA ANIMAL**

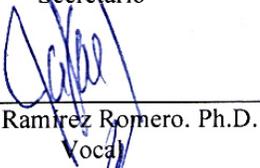
SEPTIEMBRE, 2017

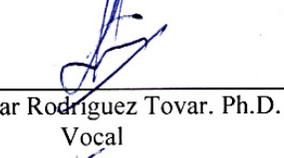
**OCURRENCIA DE FUMONISINAS TOTALES Y FB₁ EN FORRAJES
HENIFICADOS DESTINADOS AL CONSUMO EQUINO**

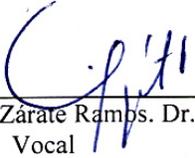
Comité de Tesis:


Gustavo Hernández Vidal. Ph.D.
Presidente


Alicia Marroquín Cardona. Ph.D.
Secretario


Rafael Ramírez Romero. Ph.D.
Vocal


Luis Edgar Rodríguez Tovar. Ph.D.
Vocal


Juan José Zárate Ramos. Dr.
Vocal

**OCURRENCIA DE FUMONISINAS TOTALES Y FB₁ EN FORRAJES
HENIFICADOS DESTINADOS AL CONSUMO EQUINO**

Dirección de Tesis:



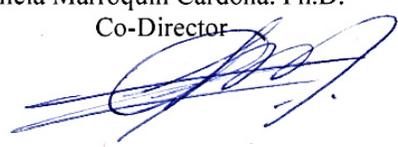
Director

Gustavo Hernández Vidal. Ph.D.



Alicia Marroquín Cardona. Ph.D.

Co-Director



Francisco A. Mora Valdes. MVZ., Cert.

Co-Director Externo

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, quiero agradecer a todas aquellas personas pertenecientes al Laboratorio de Toxicología Veterinaria por haberme brindado su apoyo en todo tipo de circunstancias. A la Dra. Alicia Marroquín por haberme permitido formar parte de su equipo, por los valiosos consejos y por otorgarme siempre ayuda en cualquier aspecto, usted es una inspiración para muchas personas, por su arduo trabajo y por tener un espíritu inquebrantable siempre en busca de la verdad, de lo que es justo y del mejoramiento de la sociedad en la que vivimos a través de la promoción de la ciencia y educación. Le agradezco a mi director de tesis el Dr. Gustavo Hernández Vidal por haberme ayudado en toda situación y por todos los consejos que siempre me brindó, sin su apoyo este trabajo no sería posible. Gracias a Ramón Treviño por haberme ayudado dentro y fuera del laboratorio, gracias por el gran soporte brindado incondicionalmente. Gracias a mis amigos y compañeros de maestría, Valeria, Rubén, Gaby, Lucero, Linda y Rosa por apoyarme y haberme ofrecido su ayuda en todo momento, gracias por dame su confianza y amistad. Les agradezco al Dr. Francisco Mora y al Dr. Juan José Vázquez por su apoyo, consejos y amistad a lo largo de varios años, de igual manera al Dr. Antonio Ruíz por sus consejos. Gracias a todas mis compañeras de laboratorio Claudia, Karen e Iliana por siempre apoyarme, a todo el personal docente y administrativo de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia y la Facultad de Agronomía, por haberme ofrecido siempre el mejor trato y disponibilidad de su tiempo. Gracias a todas las instancias educacionales, gubernamentales, al CONACyT y a los centros ecuestres que me brindaron su apoyo.

De manera especial, quisiera agradecer a Marcia Laura Medina por siempre haberme apoyado moral y académicamente en cualquier circunstancia, gracias por siempre estar a mi lado. Gracias al Dr. José García Mazcorro por la inspiración, consejos y por alentarme en la investigación científica, de igual manera quiero agradecer a todas aquellas personas cuyos trabajos preceden a este, ya que sin su esfuerzo y dedicación el avance científico no sería posible. Finalmente, muchas gracias a mi familia, ustedes son el motor que me ha impulsado a lograr mis objetivos durante toda mi vida.

ÍNDICE

Capítulo	Página
Resumen.....	xv
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1. Mecanismo de acción.....	2
1.2. Alteraciones en sistema nervioso	5
1.3. Fumotoxicosis en equinos	6
1.4. FBs en forraje.....	9
1.5. Medición de FBs	11
1.6. Influencia de factores medioambientales y de almacenamiento sobre el contenido de FBs.....	13
Capítulo 2. Materiales y Métodos	15
2.1. Reactivos químicos y seguridad.....	15
2.2. Lugar de estudio.....	16
2.3. Parámetros de almacenamiento.....	16
2.4. Obtención y preparación de las muestras.....	17
2.4.1. Obtención de muestras	17
2.4.2. Medición de temperatura y humedad.....	18
2.4.3. Procesamiento de la muestra.....	18
2.5. Medición de FBs totales.....	18
2.5.1. Extracción de FBs	19
2.5.2. Recolección de FBs utilizando columnas de inmunofinidad	21
2.6. Medición de FB ₁ en UPLC	22
2.6.1. Condiciones cromatográficas	23
2.6.1. Preparación de muestras.....	23
2.6.2. Derivatización	23
2.6.3. Curva de calibración	24

2.6.4. Fase móvil.....	27
2.7. Análisis estadístico.....	27
Capítulo 3	28
3.1. Condiciones medioambientales y de almacenamiento	28
3.1.1. Variación climática el día de la toma de muestras.....	28
3.1.2. Condiciones de almacenamiento.....	29
3.2. Medición de FBs totales en fluorómetro.....	30
3.3. Medición de FB ₁ en UPLC	31
3.3.1. Columna.....	31
3.3.2. Temperatura	33
3.3.3. Derivatización.....	34
3.3.4. Detección en el forraje	36
3.4. Concentración de FBs totales.....	36
3.4.1. Por centro ecuestre	38
3.4.2. Por zona.....	39
3.4.3. Frecuencia de detección.....	40
3.5. Influencia de factores medioambientales y de almacenamiento sobre el contenido de FBs.....	41
3.5.1. Efecto del almacenamiento	42
Capítulo 4	43
4.1. FBs en el forraje	43
4.2. Resolución cromatográfica	48
4.3. Detección y cuantificación de FBs.....	49
4.4. Estabilidad de FBs	53
4.5. Ocurrencia de FBs.....	56
4.5.1. Durante el cultivo.....	57
4.5.2. En almacenaje	59

Capítulo 5	60
5.1. Legislación.....	62
5.2. Recomendaciones.....	63
Referencias	65
Anexos.....	74

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Comparación de temperaturas de columna en UPLC	32
2. Temperatura y precipitación pluvial en el estado de Nuevo León.....	40

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Estructura química de las principales FBs	2
2. Corte cerebral de equino con ELEM.....	7
3. Reacción del complejo NDA-NaCN con FBs	12
4. Toma de muestras y aparato utilizado.....	17
5. Muestra de forraje	19
6. Extracción de FBs	20
7. Purificación de FBs por medio de CIA	21
8. Sistema ACQUITY UPLC H-Class (Waters Co.)	22
9. Temperatura media por centro ecuestre	28
10. Puntaje en condiciones de almacenamiento	30
11. Distribución de las concentraciones de FBs	31
12. Comparación de columnas	32
13. Cromatograma comparativo de la emisión al descongelar	35
14. Concentración media de FBs totales durante el estudio	37

15. Concentraciones de FBs por centro ecuestre	38
16. Concentración media de FBs por zona	39
17. Frecuencia de FBs totales por encima de la mediana total	40
18. Concentración de FBs totales por tiempo de permanencia en almacenamiento	42

NOMENCLATURA

CIA	Columnas de inmunoafinidad
FBs	Fumonisinias
FB ₁	Fumonisina B ₁
FB ₂	Fumonisina B ₂
FB ₃	Fumonisina B ₃
UPLC	Ultra-high Performance Liquid Chromatography (Cromatografía líquida de ultra desempeño)
FLR	Fluorometría
NDA	2,3-Naftalendicarboxaldehído
NaCN	Cianuro de sodio
ZEA	Zearalenona
DON	Deoxinivalenol
T2	Toxina T2
AFL	Aflatoxina
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Cromatografía líquida de alto desempeño)
GC	Gas Chromatography (Cromatografía de gases)
Na	Sodio
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
SAX	Strong Anion Exchange (Columnas de intercambio iónico)
AC	Anticuerpos

ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay (Immunoensayo ELISA)
LC	Liquid Chromatography (Cromatografía líquida)
OPA	Orto-ftaldehído
HFB ₁	Hidrolyzed FB ₁ (Fumonisina B ₁ hidrolizada)
UFC	Unidades formadoras de colonias
IARC	International Agency for Research on Cancer (Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer)
ONU	Organización de las Naciones Unidas
MDGs	Millenium Development Goals (Metas de desarrollo del milenio)
SDGs	Sustainable Development Goals (Metas de desarrollo sustentable)
CerS	Ceramida Sintasa (4, 2, 1)
ELEM	Leucoencefalomalacia Equina
FDA	Food and Drug Administration (Administración de Alimentos y Medicamentos)
EFSA	European Food Safety Authority (Autoridad Europea de Seguridad alimentaria)
Sa	Esfinganina
So	Esfingosina
Acil-CoA	Acil coenzima A
C	Carbono

ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
GSH	Glutación
SNC	Sistema Nervioso Central
S1P	Esfingosina-1-fosfato
CNP	2,3-nucleotido cíclico 3-fosfohidrolasa
C18	18 carbonos
MIPs	Polímeros molecularmente impresos
DE	Desviación estándar

RESUMEN

Las fumonisinas (FBs) son un grupo de micotoxinas producidas por diversas especies de *Fusarium spp.* Provocan efectos neurológicos adversos en los caballos conocidos como leucoencefalomalacia. El propósito de este estudio fue determinar la ocurrencia de FBs en el forraje henificado utilizado como alimento para equino. Para esto, se tomaron muestras en 6 centros ecuestres de la zona metropolitana de Monterrey, N.L., México. Se abarcaron cuatro periodos estacionales (verano 2016 – primavera 2017). Las FBs totales se analizaron por medio de fluorimetría, utilizando columnas de inmunoafinidad FumoniTest™ para su purificación. Posteriormente, se trató de determinar la concentración de FB₁ por medio de UPLC, utilizando columna en fase reversa y derivatizando con NDA. Las condiciones de almacenaje se evaluaron utilizando un cuestionario, clasificándolas de acuerdo al puntaje obtenido (0 a 37 puntos totales). Los datos obtenidos se analizaron por medio de un estudio de correlación de Pearson, análisis no paramétricos de un solo factor One-way ANOVA y un análisis de frecuencia, utilizando el paquete estadístico SAS® Software University Edition. Se encontró que diferentes pastos se utilizan para la alimentación del equino, siendo los más comunes diversas especies de *Cynodon spp.* Adicionalmente, se encontraron las mayores concentraciones de FBs durante los periodos de verano e invierno en todos los establos, a diferencia de otoño y primavera ($P > X^2$ 0.0002). Esto se puede deber a variaciones climáticas entre estaciones y diversos factores involucrados en la producción de forraje. No se encontró una correlación entre la concentración de FBs y diferentes factores de almacenamiento ($r^2 = -0.054$). La frecuencia de niveles de FBs por encima del límite máximo recomendado (5 µg/g) por la FDA y la EFSA fue de 26.7% en verano, mientras que en otoño solo se detectaron FBs en una muestra y por debajo de este límite. Los resultados de este estudio demuestran la presencia de niveles altos de FBs en el forraje henificado y sugieren que diversos factores afectan la presencia de FBs en el forraje, lo cual puede tener un efecto potencialmente perjudicial en la salud del equino.

Palabras clave: fumonisinas, forraje henificado, alimento para equinos

ABSTRACT

Fumonisin (FBs) are a group of mycotoxins produced by several species of *Fusarium*. These toxins induce neurologic adverse effects in horses known as equine leukoencephalomalacia. The aim of this study was to measure the occurrence of total FBs concentrations in hay forage used as horse feed. For this purpose we sampled hay forage in 6 equine stables from Monterrey metropolitan area, Nuevo León, México. Samples were taken over a year period (summer 2016 – spring 2017). Total FBs were measured according to FumonTest™ Fluorometer fluorometric tests for FBs, followed by detection of FB₁ using reverse phase column in UPLC with NDA derivatization. Storage conditions were assessed using a questionnaire with a score sheet (ranging from 0 to 37 total points) in order to find a correlation between the score and storage conditions. The results were analyzed with a Pearson correlation test, non-parametric One-way ANOVA and a frequency analysis, using statistical software SAS® Software University Edition. Our investigation showed that different types of forages are used in equine feed, being *Cynodon spp.* grass the most commonly used. Additionally, we found the highest FBs concentrations during summer and winter in all stables, unlike autumn and spring ($P > X^2$ 0.0002). This could be due to weather variation between seasons and other factors involved in the forage production. No correlation was found between the degree of FBs concentration and different storage factors ($r^2 = -0.054$). The frequency of FBs levels above the FDA and EFSA permitted level (5 µg/g) was 26.7% in summer, while in autumn none of the samples showed levels above the allowed limit. The results of this study show the presence of high FBs concentrations in hay forage used as horse feed and suggest that there could be other factors affecting the FBs content in forage. This can potentially have a detrimental effect on horse health.

Key words: fumonisins; hay forage; equine feed

CAPÍTULO 1

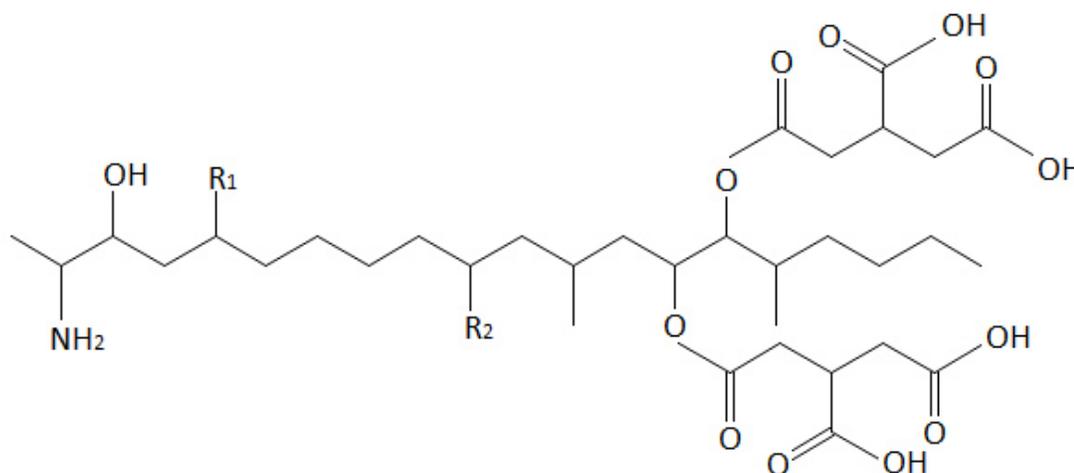
INTRODUCCIÓN

Las micotoxinas son subproductos del metabolismo de hongos, las cuales provocan una variedad de alteraciones patológicas en el organismo animal, causando pérdidas económicas considerables. Las fumonisinas (FBs) son un grupo de metabolitos tóxicos producidos por diversas especies de hongos del género *Fusarium spp.*, generalmente *Fusarium verticillioides* y *proliferatum* (Wang et al. 2016). Dentro de las FBs, las que se producen principalmente son FB₁, FB₂ y FB₃ (Eugenia de la Torre-Hernández et al. 2014), siendo FB₁ la de mayor importancia debido a su patogenicidad y a que es la FB que más comúnmente se encuentra, ya que puede llegar a abarcar hasta el 75% de total de contenido de FBs en los alimentos (Karini & Mehri 2015). Estas micotoxinas pueden formarse en los cultivos, durante la cosecha, procesamiento, almacenamiento, durante la alimentación y se pueden encontrar en una amplia variedad de alimentos incluyendo maíz, arroz, nueces, cacahuates (Smith et al. 2016) y diversos forrajes (Buckley et al. 2007; Skladanka et al. 2011). Las formulaciones alimenticias en los equinos tienen como base la utilización de forraje, abarcando hasta más del 50% de su dieta (Saastamoinen & Hellämäki 2012) y se sabe que puede haber presencia de FBs en los cultivos (Mirocha et al. 1992) y en el forraje henificado debido a un mal almacenamiento (Raymond et al. 2000; Hoffman et al. 2009). Los equinos son la especie más afectada por las FBs, las cuales producen diversas alteraciones patológicas en esta especie. Se han descrito dos síndromes por consumo de FBs (FB₁, FB₂ y FB₃) (Riley et al. 1997), la forma hepatotóxica y la forma neurotóxica (leucoencefalomalacia equina, ELEM) (Voss et al. 2007), siendo esta última la que más daños adversos casusa en los equinos. ELEM se caracteriza por la aparición repentina de signos neurológicos como: incoordinación, paresia, ataxia y ceguera (Ross et al. 1993; Caloni & Cortinovic 2010).

ANTECEDENTES

1.1. Mecanismo de acción

Se sabe que el mecanismo de acción de FB₁ es a través de la inhibición de la enzima ceramida sintasa (CerS) (Eugenia de la Torre-Hernández et al. 2014), debido a su similitud estructural con los sustratos de esta enzima, ya que la estructura química de las FBs al igual que la de diversos esfingolípidos se compone de un esqueleto lineal de carbonos como estructura principal. En el caso de las FBs se compone de 20 carbonos con un grupo amino en C-2 y dos ácidos tricarbóxicos en C-14 y C-15 (Figura 1).



	R ₁	R ₂
Fumonisina B ₁	OH	OH
Fumonisina B ₂	OH	H
Fumonisina B ₃	H	OH

Figura 1. Estructura química de las principales FBs

FB₁ inhibe a las CerS por medio de la interacción con los sitios de unión de la enzima, donde normalmente se unirían la esfingonina (Sa), esfingosina (So) y acil-CoA. Estímulos extracelulares como citoquinas, hormonas y estrés celular (Rayos X y radiación UV) alteran el metabolismo de los esfingolípidos, ya sea degradándolos o impidiendo la formación de ceramida vía *de novo* síntesis (en el caso de FBs), esto resulta en un incremento en la producción de esfingosina 1-fosfato (S1P) a partir de esfingosina (Voss et al. 2007). Los esfingolípidos complejos como la ceramida, son críticos para la estructura de membrana plasmática y como sitio de unión para proteínas extracelulares, también funcionan como precursores de segundos mensajeros, los cuales son mediadores de respuestas celulares como factores de crecimiento, citoquinas y factores de diferenciación (Merrill et al. 2001). Se ha demostrado que la inhibición de la generación *de novo* de la ceramida resulta en una menor respuesta celular a agentes citotóxicos. Esta es una de las razones por la cual es posible que FB₁ promueva la generación de cáncer, al inhibir la producción de ceramidas, las cuales han sido probadas que inducen la muerte celular en células cancerígenas (Ryland et al. 2011).

Los efectos más conocidos de S1P son en los sistemas inmunitario y vascular. En el sistema vascular la activación de los receptores de S1P regulan el tono, permeabilidad, angiogénesis e hiperplasia vascular después de una lesión. En sistema inmunitario el gradiente de S1P es crítico para la movilización de células inmunes de órganos linfoides secundarios hacia el torrente sanguíneo (Hla & Dannenberg 2012). Por otro lado, también se han identificado efectos adversos de la So, ya que se ha demostrado que altas concentraciones de esta inhiben los canales de Ca²⁺ de tipo-L en el miocardio (McDonough et al. 1994), esta inhibición resulta en la disminución del flujo de iones de Ca²⁺ del retículo sarcoplásmico del cardiocito, lo cual provoca una disminución en la contractilidad cardíaca. Esta acción de las FBs probablemente también provoque perturbaciones en la regulación de los esfínteres de arteriolas precapilares, lo que conlleva a una alteración en el flujo sanguíneo de varios tejidos.

Para entender las diversas patologías que exhiben los animales ante la exposición a FB₁ y su presentación característica en las diferentes especies, hay que tener en cuenta que los tejidos exhiben un patrón de isoformas de CerS específico. Debido a esto, FB₁ tiene una afinidad hacia los tejidos dependiendo de la isoforma de CerS expresada predominantemente en estos, teniendo efectos duales y opuestos en la síntesis de las diferentes especies esfingoides (Loiseau et al. 2015), ya sea inhibiendo o estimulando su producción, dependiendo de la concentración de FB₁ y la isoforma de CerS a la que esta toxina afecta (CerS4, CerS2 y CerS1 principalmente). Esto posiblemente determine su variable especificidad de órganos diana entre especies, ya que FB₁ tiene más afinidad a cierto tipo de CerS y al haber diferente expresión de CerS en los órganos de las especies afectadas, se puede encontrar mayor acumulación de FB₁ en cierto órgano dependiendo de la CerS que tenga mayor expresión en este (Loiseau et al. 2015).

La inhibición de la función de CerS se ha asociado con la inducción de apoptosis en diferentes sistemas celulares que incluyen al riñón, cardiomiocito, células intestinales, esofágicas y epiteliales. Una vez unido el grupo amino en el C-2 de las FBs a las CerS, se inhibe la producción de ceramida por competencia (Voss et al. 2007), así también inhibe su función debido a la presencia de las cadenas laterales de ácidos tricarbóxicos, las cuales le impiden a la CerS utilizar a las FBs como sustrato, quedando inhabilitada funcionalmente. Esta inhibición en la CerS resulta en bloqueo de la síntesis *de novo* de ceramida, lo cual en consecuencia provoca la acumulación de los sustratos para su síntesis, Sa y So (Voss et al. 2007).

En cerdos estos cambios se manifiestan como edema pulmonar (Edema Pulmonar Porcino) y en equinos como edema cerebral, lo cual eventualmente produce necrosis licuefactiva de la materia blanca subcortical del cerebro, conocido como Leucoencefalomalacia Equina (ELEM) (Foreman et al. 2004). De esta manera, se ha hipotetizado que las FBs a nivel de SNC inhibe la adecuada función de los canales de Ca²⁺ en arteriolas cerebrales (McDonough et al. 1994; Michelakis et al. 1994), ya que se ha demostrado que estas arteriolas son más dependientes del Ca²⁺ extracelular y debido a esto son más sensibles al bloqueo de los canales de Ca²⁺ (Michelakis et al. 1994).

1.2. Alteraciones en sistema nervioso

En Sistema Nervioso Central (SNC), FB₁ induce una necrosis licuefactiva de la materia blanca (Voss et al. 2007), así como cambios en líquido cerebro-espinal de manera dosis-dependiente (Foreman et al. 2004). Se ha mostrado que la administración de FB₁ en células gliales modifica su proliferación y diferenciación, sin embargo en estudios realizados por Kwon et al. (2000) se demostró que FB₁ no inhibe el crecimiento y desarrollo celular, ya que no alteró el contenido proteico ni el de ADN, de hecho el tratamiento con FB₁ incrementó la actividad de la enzima 2,3-nucleotido cíclico 3-fosfohidrolasa (CNP) la cual es un componente esencial en los procesos de mielinización en oligodendrocitos, de igual manera incrementó la cantidad de procesos celulares en astrocitos, lo cual sugiere que FB₁ puede ser mitogénica en células como oligodendrocitos y astrocitos.

Se sabe que los cambios en el metabolismo mitocondrial, producción de ROS (especies reactivas de oxígeno) y la alteración de los niveles de Ca²⁺, están implicados en procesos neurodegenerativos. FB₁ induce la producción de ROS a nivel mitocondrial, pero de misma manera estimula la producción de glutatión (GSH) (Domijan & Abramov 2011). Se ha demostrado que FB₁ provoca una acumulación de Ca²⁺ a nivel mitocondrial, así como una inhibición del complejo I de la cadena transportadora de electrones, lo cual produce una despolarización mitocondrial, induciendo así diversos mecanismos de neurotoxicidad (Domijan & Abramov 2011).

Al afectarse la síntesis de ceramida, se provoca una alteración en la concentración y relación de Sa/So, los cuales son importantes componentes de la membrana celular. Estos niveles se ven alterados en suero y tejidos hepático, cardiaco, renal y mínimamente en nervioso (Voss et al. 2007), lo cual concuerda con hallazgos en otros estudios que sugieren que las lesiones neurológicas no son un efecto directo de la alteración de las concentraciones de esfingolípidos en el cerebro (Domijan & Abramov 2011), sino que probablemente se deban a un edema cerebral vasogénico, causado por un aumento en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (Foreman et al. 2004) al verse afectados los canales de Ca²⁺ de las arteriolas cerebrales (Michelakis et al. 1994).

1.3. Fumotoxicosis en equinos

En general, las FBs se absorben poco pero rápidamente por el intestino delgado (Fodor et al. 2008), una vez absorbida, se deposita en diversos órganos como hígado, riñones y en cerebro en los equinos (Voss et al. 2007), la poca cantidad de FB₁ que se absorbe es transportada vía sistema porta al hígado donde ejerce una de sus acciones patógenas, causando una vacuolización severa en hepatocitos, degradación y necrosis, lo que provoca elevación en los niveles de bilirrubina, así como incremento en la fosfatasa alcalina (Ross et al. 1993). La micotoxicosis por FBs puede producir efectos adversos crónicos y agudos, siendo los equinos la especie más afectada (Caloni & Cortinovic 2010), en los cuales se han descrito dos síndromes por consumo de FBs (FB₁, FB₂ y FB₃) (Riley et al. 1997), la forma neurotóxica (leucoencefalomalacia equina, ELEM) y la forma hepatotóxica, pudiéndose presentar de manera simultánea o independiente (Voss et al. 2007). Aunque FB₁ es hepatotóxica en todas las especies (Voss et al. 2007), en los equinos es conocida por provocar necrosis licuefactiva de la materia blanca del cerebro (Figura 2), desarrollando el síndrome neurológico ELEM (Foreman et al. 2004). ELEM se caracteriza por la aparición repentina de signos como: incoordinación, paresia, ataxia, ceguera, depresión e hiperexcitabilidad, así como alteraciones en el comportamiento, como andar en círculos y presión de la cabeza contra los muros (Ross et al. 1993; Caloni & Cortinovic 2010). Este síndrome se cree que es ocasionado por la alteración en los niveles de So, ya que al verse aumentada se sabe que inhibe los canales de Ca²⁺ de tipo-L en el miocardio (McDonough et al. 1994), culminando en una disminución de la contractilidad cardíaca. Esta acción de las FBs probablemente también provoque perturbaciones en la regulación de los esfínteres de arteriolas precapilares en cerebro (Michelakis et al. 1994), lo cual conlleva a una alteración en el flujo sanguíneo, seguido de edema y necrosis. Hay dos tipos principales de edema cerebral adquirido: vasogénico y citotóxico, por lo cual debido a la naturaleza patológica de las FBs se piensa que el edema causado en los equinos es de origen vasogénico. Esto puede explicar por qué los caballos debido a su estatura, su cuello largo y su tendencia a comer del suelo, desarrollan edema cerebral después de una fumotoxicosis (Foreman et al. 2004).

La presentación hepatotóxica ocurre menos frecuente, provocando signología como pérdida del apetito, depresión, edema en la cabeza e ictericia (Caloni & Cortinovic 2010). Esta forma ocurre de manera menos frecuente, tomando usualmente de 5 a 10 días de la aparición de los signos clínicos a la muerte, mostrando como hallazgo principal niveles altos de bilirrubina sérica.

Además de ELEM, hay diversos factores patológicos relacionados con una fumotoxicosis en equinos a los que no se enfocan muchos trabajos investigación y que son de gran importancia en el conocimiento de las patologías relacionadas con FBs, siendo los principales la relación de las FBs con la presentación de cólico y las manifestaciones subclínicas que se pueden relacionar con problemas de aparato locomotor.

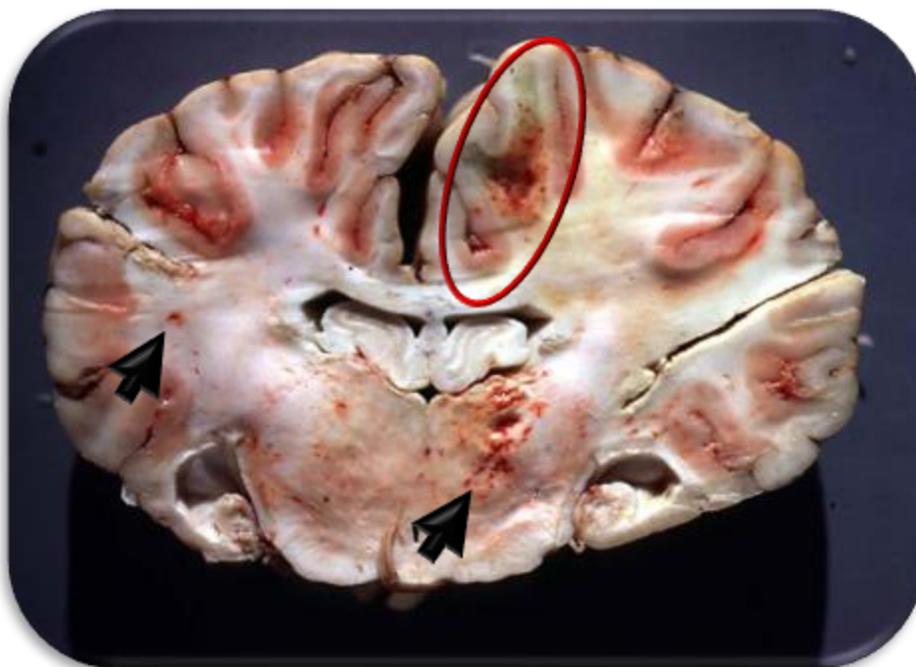


Figura 2. Corte cerebral de equino con ELEM, mostrando una necrosis licuefactiva (círculo) en la materia blanca, con múltiples hemorragias (flechas) localizadas (Imagen obtenida de la base de datos de patología veterinaria de Cornell University ©copyright Cornell College of Veterinary Medicine).

Aunque los cambios neurológicos y en fluido cerebroespinal son dosis dependiente a la exposición de FB₁, también puede haber manifestaciones subclínicas de una fumotoxicosis, apareciendo signos tales como: incapacidad motriz de la lengua, disfagia, deficiencia en la propiocepción de miembros anteriores y ataxia de los miembros posteriores, la cual se manifiesta como la circunducción del miembro exterior cuando el caballo es desplazado en círculos (Foreman et al. 2004; Caloni & Cortinovic 2010). Debido a la ubicación de las neuronas que controlan los movimientos de la lengua en la corteza motora, en las cuales al alimentarse el caballo es el área donde se ejerce una mayor presión, pueden ser las primeras neuronas en las cuales la FB₁ tenga un efecto negativo, por lo cual concordaría con la presentación primaria de signos como parálisis de la lengua, seguido por la degeneración de sectores más cercanos a la corteza parietal, los cuales controlan los movimientos de las extremidades (Foreman et al. 2004).

Por otra parte, la relación entre micotoxicosis y cólico aún no ha sido esclarecida, pero hay que tomarla en cuenta como posibilidad, especialmente cuando una serie de casos de cólico se presentan en un mismo lugar (Caloni & Cortinovic 2010). Sumado a lo anterior, actualmente se desconoce la prevalencia de ELEM, ya que es difícil de diagnosticar y su presentación puede ser confundida con otras patologías del SN. En un estudio realizado por Sequetin Cunha et al. (2016) en el que se analizaron las principales causas de encefalitis y encefalopatías en los equinos, se observó que de los casos asociados a problemas neurológicos el 20% fue positivo a leucoencefalomalacia. En México, solo se encuentra reportado un brote de ELEM en burros del estado de Oaxaca por consumo de maíz contaminado en el año 1997 (Rosiles & Bautista 1998). Esto es de gran importancia, ya que se demuestra la falta de conocimiento sobre la interacción de las FBs con los organismos animales, en este caso la especie más afectada, el equino.

1.4. FBs en forraje

Se ha estimado que el 25% de la producción de cultivos mundiales está contaminado con micotoxinas (Buckley et al. 2007), habiendo una elevada incidencia de FB₁ en estos (Liesener et al. 2010). A pesar de que se sabe poco sobre el impacto que tiene la presencia de FBs en el alimento de los equinos, agencias como la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA, por sus siglas en inglés) sugiere que el nivel total de FBs (FB₁, FB₂ y FB₃) no sobrepase los 5 µg/g en formulas alimenticias para equinos que contengan maíz, así como la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, por sus siglas en inglés) recomienda que en el alimento destinado al consumo equino no se sobrepasen los 5 µg/g (FB₁ + FB₂) (Voss et al. 2007).

Diferentes forrajes producidos en México, incluyen alfalfa (*Medicago sativa*), sorgo forrajero (*Sorghum sudanense* y *S. sudanense* x *S. bicolor*), raigrás (*Lolium multiflorum*), avena forrajera (*Avena sativa*), pasto Bermuda (*Cynodon dactylon*), cebada (*Hordeum vulgare*), trigo (*Triticum aestivum*) y maíz forrajero, entre otros (Améndola et al. 2005). Estos se utilizan normalmente en la dieta animal en diversas presentaciones (fresco, henificado, ensilado, etc.), aunque esto depende en gran medida de la disponibilidad del forraje y la especie animal a la que se le proporciona.

En los equinos, la presentación de estos forrajes que normalmente se utiliza es el henificado, ya que tiene mayor tiempo de anaquel y facilita su almacenamiento cuando se manejan grandes cantidades de forraje (Hoffman et al. 2009). Se ha reportado que este tipo de pastos pueden llegar a albergar diversas poblaciones de hongos, entre las cuales se encuentra *Fusarium spp.*, el cual puede llegar a ser el más predominante en forrajes como *Cynodon spp.* (Taffarel et al. 2013), presentandose principalmente en las etapas previas al almacenaje.

Las formulaciones alimenticias en los equinos cuentan con una amplia gama de ingredientes que se pueden utilizar, siendo el forraje el principal, abarcando hasta más del 50% de su dieta (Saastamoinen & Hellämäki 2012). Esto es de gran relevancia, debido a que la mayoría de los estudios que está enfocado a la detección de FBs, lo hace en matrices como maíz o alimentos que contengan maíz. Estos estudios también se enfocan en diferentes consumidores u otras especies animales diferentes al equino, aun cuando esta especie es la más afectada por esta toxina y el riesgo de exposición por medio del forraje a este xenobiotico es prácticamente desconocido (Gallo et al. 2015).

Por otra parte, se puede encontrar presencia de FBs no solo en los cultivos (Mirocha et al. 1992), si no que debido a un almacenamiento inadecuado, puede haber presencia de estas en pacas de heno (Raymond et al. 2000; Hoffman et al. 2009), en grano almacenado o en ensilado con alto contenido de humedad (Buckley et al. 2007). Por esta razón es importante considerar la presencia de FBs en el forraje henificado, debido a que en la dieta equina esta presentación de forraje suele llegar a ser la más utilizada, y aún que en México se sabe que es una práctica común, hay limitada información científica sobre las tendencias de su utilización. En otros países como Irán se ha detectado presencia de FBs de hasta un 68.2 % de las muestras de trigo, encontrando concentraciones de hasta 155 µg/kg (Chehri et al. 2010). En otros estudios donde se abordó la presencia de FBs en el alimento para equinos solo se encontró presencia de FBs en una muestra, sin embargo, solo se tomó en cuenta el alimento procesado con medidas de calidad HACCP, el cual comúnmente es concentrado que consiste en una mezcla de granos pero no forraje (Martins et al. 2012).

En la situación actual de México, no se cuenta con un adecuado sistema de monitoreo toxicológico que pueda estimar de manera precisa la presencia de FBs en el forraje henificado, invariablemente de la especie que lo consuma. Esto debe ser tomado en cuenta ya que recientemente se ha confirmado la presentación de ELEM por consumo de forraje henificado (Vendruscolo et al. 2016) en otros países, por lo cual es necesaria una adecuada legislación que aborde la contaminación por diversos xenobióticos en el forraje y que sea basada en estudios científicos.

1.5. Medición de FBs

En la actualidad, hay múltiples formas de medir la concentración de FBs en diversas matrices, éstas generalmente incluyen diversos métodos cromatográficos y métodos que involucran la utilización de anticuerpos (AC). Dentro de los métodos que utilizan AC como anclaje de FBs se encuentran ELISA y fluorimetría (FLR), la cual utiliza columnas de inmutaofinidad (CIA) para la purificación de FBs, seguido de la utilización de un agente derivatizante para su posterior lectura en fluorómetro. En cuanto a los métodos cromatográficos, estos generalmente se emplean para la confirmación de la presencia de FBs, dentro de los cuales se encuentran la cromatografía líquida de alto desempeño y ultra desempeño (HPLC y UPLC), cromatografía de gases (GC), cromatografía de capa fina (TLC) y cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS) (Shephard 2008).

Para un análisis del contenido de FBs en el alimento, es necesario realizar una extracción de estas a partir de la matriz en la que se encuentren contenidas, para posteriormente medir su concentración. Existen varios solventes que se utilizan comúnmente para este objetivo, dentro de los cuales se encuentran el acetonitrilo, agua, metanol, ácido acético y las combinaciones de estos en diversas proporciones (Petrarca et al. 2014; Jakšić et al. 2015). Alternativamente se ha mencionado la utilización de otros solventes como EDTA (Kim et al. 2002) en matrices complejas. Estas soluciones se mezclan con el alimento con el objetivo de separar la mayor cantidad de FBs, para lo cual se utilizan diversos equipos como agitadores orbitales, centrifugas o licuadoras, para obtener una homogeneidad de la mezcla (Petrarca et al. 2014; Jakšić et al. 2015).

Los extractos de la matriz contienen diversos componentes a parte del compuesto de interés, por lo cual una vez realizada la extracción es necesaria una purificación de la molécula de interés para poder determinar su concentración en los alimentos. En los métodos originales para el análisis de micotoxinas generalmente se utilizan columnas abiertas empacadas con materiales como gel de sílice o tierra de diatomeas, en las cuales se eluye con diferentes mezclas de solventes (Shephard 2008).

Actualmente se siguen utilizando estos métodos de purificación (Petrarca et al. 2014), así también otros donde se emplean columnas de 18 carbonos (C₁₈) en fase reversa, SAX (Columnas de intercambio iónico) y CIA (Columnas de Inmunofinidad) (Ndube et al. 2011; Ma et al. 2013; Jakšić et al. 2015; Turner et al. 2015), las cuales proveen una purificación adecuada de las FBs.

Las FBs naturalmente carecen de un compuesto fluorescente, por lo cual su detección utilizando métodos fluorométricos requiere un proceso de derivatización, el cual permite añadir una molécula fluorescente a la estructura de las FBs. El método de derivatización desarrollado por Bennett & Richard (1994) ha sido ampliamente utilizado (Ndube et al. 2011; Brown et al. 2014), debido a que en comparación con otros métodos donde se utiliza orto-ftaldehído (OPA) como compuesto derivatizante, la utilización de 2,3-naftalendicarboxaldehído (NDA) en combinación con cianuro de sodio (NaCN) genera un compuesto altamente fluorescente y estable (Figura 3). Otros métodos de detección no involucran una derivatización de las FBs, tales como espectrometría de masas (Han et al. 2010; Ren et al. 2011).

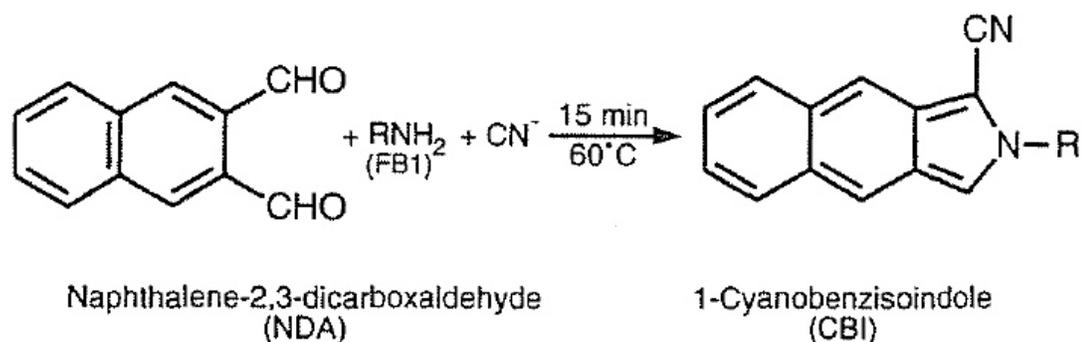


Figura 3. Reacción del complejo NDA-NaCN con el grupo NH₂ primario de las FBs, formando un compuesto derivatizado estable y fluorescente.

(Publicado en: Bennett & Richard 1994 J. of AOAC Vol. 77: 501-507)

1.6. Influencia de factores medioambientales y de almacenamiento sobre el contenido de FBs

Las características de almacenamiento que son influenciadas por factores climatológicos llegan a ser una determinante en la contaminación por FBs en el alimento. Se sabe que puede haber contaminación con hongos y micotoxinas por un inadecuado almacenamiento (Hoffman et al. 2009; Chávez Vásquez 2010), sin embargo se ha visto que la predominancia de contaminación por FBs se da mayoritariamente a nivel de campo antes del almacenaje (Pitt et al. 2013; Cao et al. 2014; Santiago et al. 2015).

En la actualidad, las prácticas de cultivo y almacenamiento en México son diversas, por lo cual es difícil asociar la presencia de FBs a las diversas prácticas en estas actividades. Se han mencionado cuales pueden ser prácticas adecuadas para reducir el riesgo de contaminación por hongos y micotoxinas (Chávez Vásquez 2010; Coblenz et al. 2013), sin embargo, las prácticas en almacenamiento son muy diversas inclusive dentro del mismo territorio geográfico. Sumado a esto, la variabilidad en la manera de producir forraje henificado, puede favorecer la contaminación con FBs de diversas maneras (Cao et al. 2014; Santiago et al. 2015).

JUSTIFICACIÓN

Debido a que el forraje llega a abarcar hasta el 50% en la dieta equina, a que hay pocos estudios acerca de la ocurrencia de FBs en el forraje y a que los equinos son la especie más afectada por esta micotoxina, se decidió estudiar la ocurrencia de FBs en el forraje henificado destinado al consumo equino.

HIPÓTESIS

- El forraje henificado es una fuente de exposición a FBs para los equinos.
- Hay una elevada frecuencia de altas concentraciones de FBs en este alimento.

OBJETIVOS

General

Conocer la concentración de FBs a la que se encuentran expuestos los equinos que consumen forraje henificado.

Específicos

1. Cuantificar FBs totales en forrajes para equinos.
2. Evaluar la relación entre la presencia FBs y las prácticas de manejo en forraje henificado.
3. Cuantificar FB₁ usando cromatografía líquida de ultra desempeño UPLC.

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Reactivos químicos y seguridad

Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico, los solventes fueron grado HPLC o UPLC. Fumonisina B₁ se obtuvo de Romer Labs Inc. (Union, MO, USA). 2,3-naftalendicarboxaldehído (NDA), tetraborato sódico decahidrato (Na₂B₄O₇ • 10H₂O) y el ácido acético (CH₃CO₂H) se obtuvieron de Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA). El cloruro de sodio (NaCl), cloruro de potasio (KCl), fosfato de sodio dibásico anhidro (Na₂HPO₄), fosfato de potasio dibásico anhidro (K₂HPO₄) y el acetonitrilo grado UPLC, se obtuvieron de Fisher Scientific Co. (Waltham, MA, USA). Las columnas de inmunoafinidad FumoniTest™, Tween® 20 y el revelador A y B se obtuvieron de Vicam® (Waters Co., Milford, MA, USA). El metanol grado HPLC se obtuvo de Tedia Co. (Fairfield, OH, USA). El agua grado UPLC se obtuvo en el laboratorio de acuerdo a las especificaciones de fabricante, utilizando un filtro LC-Pak™ Cartridge y un equipo Simplicity (Merck Millipore Co., Billerica, MA, USA). La solución de PBS se preparó disolviendo 8.0 g de cloruro de sodio, 1.2 g de fosfato de sodio dibásico anhidro, 0.2 g de fosfato de potasio dibásico anhidro y 0.2 g de cloruro de potasio en un litro de agua destilada (volumen total), ajustando el pH a 7 utilizando ácido clorhídrico (HCl). El cianuro de sodio (NaCN) fue una donación de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León (Monterrey, Nuevo León, México). Todos los experimentos fueron realizados bajo lineamientos de seguridad de laboratorio nivel 2.

2.2. Lugar de estudio

Las muestras se tomaron de 6 centros ecuestres en la zona metropolitana de Monterrey, donde se abarcó un periodo de 4 trimestres que corresponden a las temporadas de verano, otoño, invierno (2016) y primavera (2017). Estos centros ecuestres alojan a equinos con diversas funciones zootécnicas y la alimentación está a cargo del centro ecuestre. Por protección a la confidencialidad, se omiten la ubicación y nombres de estos centros. Las muestras fueron tomadas a principios de cada estación. Los análisis de contenido de FBs se realizaron en el laboratorio de Toxicología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Nuevo León (General Escobedo, Nuevo León, México).

2.3. Parámetros de almacenamiento

Para evaluar la influencia de las diversas condiciones de almacenamiento en el grado de acumulación de FBs, se elaboró y aplicó una hoja de evaluación (Anexo 1) al lugar donde se almacena el alimento. Esta evaluación constó de 13 preguntas, tomando en cuenta parámetros de almacenamiento de estudios previos sobre la adecuada disposición de las pacas en el lugar de almacenaje (Chávez Vásquez 2010; Coblenz et al. 2013). A cada pregunta se le asignó un valor numérico que va de 0 a 1 para preguntas con respuestas dicotómicas (Sí/No) y de 0 a 4 cuyas respuestas fueron policotómicas (Muy malo/ Malo/ Regular/ Bueno/ Muy bueno), sumando un total de puntos que va de 0 a 37, representando mejores condiciones de almacenamiento entre más elevado resulte en el puntaje. Esta evaluación se sometió al escrutinio de 3 profesionales en el área para cerciorarse de la consistencia y aplicabilidad de las diversas preguntas en el cuestionario.

2.4. Obtención y preparación de las muestras

2.4.1. Obtención de muestras

Las muestras de forraje se obtuvieron mediante la técnica de extracción de núcleos de paca de forraje, de acuerdo al protocolo establecido por Asociación Nacional de Pruebas en Forraje (NFTA) (Putnam 2007). Brevemente, utilizando una sonda de acero (sacabocado dentado de 35 cm largo x 1.90 cm diámetro) acoplada a un taladro KR 750 (Stanley Black & Decker, New Britain, CT, USA) de 720 watts, se realizaron perforaciones en un ángulo de 90° hasta una profundidad de entre 30 a 45 cm en la cara superior e inferior (por donde cruzan las sujeciones de la paca), así también en las caras laterales, realizado no más de 3 perforaciones distribuidas equitativamente por cara (Figura 4). La elección de pacas fue aleatoria, procurando obtener muestras de los flancos de la pila de pacas así como del centro de esta misma. Las muestras tomadas (400 g aproximadamente) se almacenaron en bolsas de papel y posteriormente en bolsas de plástico para su transporte. Si había diversos lotes de pacas las muestras se almacenaron por separado y se identificaron con un código de acuerdo al lote, trimestre y lugar de muestreo. Las muestras se mantuvieron en un ambiente seco, utilizando absorbentes de humedad para evitar su acumulación y no favorecer el crecimiento de microorganismos.



Figura 4. Toma de muestras en los diversos hípicas (izquierda), utilizando un taladro con sacabocado (derecha) para la perforación en ángulo de 90° de las pacas de forraje henificado.

2.4.2. Medición de temperatura y humedad

La temperatura y el porcentaje de humedad de las pacas se midió utilizando una sonda de medición de humedad para alimentos Benetech® GM640 (Shenzhen Jumaoyuan Science and Technology Co., Nanshan District, Shenzhen city, Guangdong province, China) utilizando el modo de medición para pasto. Esta sonda se introdujo en un ángulo de 90° dirigiéndola hacia el centro, realizando una medición por paca. Se realizaron estas mediciones en las pacas muestreadas y de igual manera en todo el lote, abarcando los diferentes lados de este y eligiendo de manera aleatoria.

La medición de temperatura también se realizó en el lugar de almacenamiento del alimento, midiendo la temperatura de superficie utilizando un termómetro infrarrojo BAFX® (BAFX® Products, Franksville, WI, USA). Se realizaron múltiples mediciones en las diferentes paredes del lugar de almacenamiento, techo y suelo, procurando realizar la medición en diversos puntos.

2.4.3. Procesamiento de la muestra

Las muestras obtenidas de las pacas forraje (Figura 5) se distribuyeron uniformemente en bolsas de papel, posteriormente se secaron por 48 hrs a 30 °C en un horno de secado para eliminar humedad. Una vez secas, la muestras se procesaron en un molino hasta alcanzar un tamaño de partícula <1mm (Putnam 2007; Liesener et al. 2010).

2.5. Medición de FBs totales

Esta se realizó de acuerdo a lo descrito en el protocolo de extracción y recolección de FBs para maíz y sorgo del manual FumonitTest™ Fluorometer Vicam® (Waters Co.) (Waters Co., Milford, MA, USA) con ligeras modificaciones, utilizando un fluorómetro VICAM SERIES-4ex (Waters Co.).



Figura 5. Muestra de forraje obtenida durante el estudio antes de ser procesada para la extracción de FBs.

2.5.1. Extracción de FBs

Se mezclaron 100 g de muestra de forraje molido con 250 mL de metanol/agua (80:20 v/v) y 5.0 g de cloruro de sodio. Se licuó a máxima velocidad por 1 min. utilizando una licuadora Waring® laboratory blender (Waring® Commercial Inc, Torrington, CT, USA). La mezcla se filtró en un frasco limpio utilizando filtros acanalados Vicam® de 24 cm (No. Cat. 31240) (Figura 6).



Figura 6. Extracción y filtración de FBs en las muestras una vez procesadas y homogenizadas con el solvente, utilizando filtros acanalados Vicam®.

2.5.2. Recolección de FBs utilizando columnas de inmunoafinidad

Se tomaron 10 mL del extracto obtenido anteriormente y se mezcló con 40 mL de solución Tween[®] 20/PBS (1:1000 v/v). Se filtró en un frasco limpio utilizando filtros de microfibra de 1.0 μ m, 9.0 cm Vicam[®]. Se tomaron 10 mL y se pasaron por columnas de inmunoafinidad FumoniTest[™], la columna se lavó con 10 mL de solución Tween[®] 20/PBS seguido de 10 mL de PBS (Figura 7). Las fumonisinas se eluyeron con 1.0 mL de metanol grado HPLC en una cubeta de vidrio. Se añadió 1.0 mL de revelador para fumonisinas FumoniTest[™] previamente preparado y se colocó en el fluorómetro.



Figura 7. Utilización de CIA FumoniTest[™] Vicam[®] (Waters Co.) para la purificación de FBs de las muestras de forraje.

2.6. Medición de FB₁ en UPLC

Se realizó a partir de las muestras en las que se detectaron altas concentraciones de FBs (>5 µg/g) para poder establecer la concentración de FB₁ en el forraje henificado. La extracción de FBs se realizó mediante el método de FumoniTest™ Fluorometer (Waters Co.) descrito en la sección 1.5.1. Para la recolección de FBs totales se utilizó lo descrito en el protocolo extracción y recolección de FBs para maíz y sorgo del manual FumoniTest™ and FumoniTest WB™ (Vicam® Waters Co. 2004).



Figura 8. Sistema ACQUITY UPLC H-Class (Waters Co.) utilizado para la detección de FBs por medio de fluorescencia.

2.6.1. Condiciones cromatográficas

La separación cromatográfica se realizó por fase reversa en UPLC utilizando una columna analítica Acquity UPLC® BEH C18 (Waters Co.) con tamaño de partícula de 1.7 μm (2.1 x 100 mm) mantenida a 35 °C (Ren et al. 2011) en el sistema ACQUITY UPLC H-Class (Waters Co.) compuesto de un administrador de solventes (Quaternary Solvent Manager H-Class), administrador de muestras (Sample Manager FNT), detector de fluorescencia (ACQUITY UPLC FLR Detector) y un detector UV (ACQUITY UPLC TUV Detector) (Figura 8). Las muestras se mantuvieron a una temperatura de 35 °C. Los valores de excitación y emisión para el detector de fluorescencia se establecieron a longitud de onda de 420 y 500 nm (Brown et al. 2014) respectivamente. El tiempo de corrida se estableció a 4 min, con un volumen de inyección de 3 μL .

2.6.1. Preparación de muestras

Una vez recolectadas las FBs totales de la columna de inmunoafinidad, se evaporó bajo corriente de nitrógeno a 60 °C (Bennett & Richard 1994) y se reconstituyó en 1 mL de agua/acetonitrilo (60:40 v/v), se trasladó el contenido a viales ámbar de 2 mL y se almacenaron a 4 °C para su posterior análisis en UPLC.

2.6.2. Derivatización

Esta se realizó de acuerdo al protocolo establecido por Bennett & Richard (1994) con modificaciones.

2.6.2.1. Estándares de calibración

Los estándares se prepararon utilizando 250 μL del estándar de trabajo, añadiendo de manera secuencial 250 μL de buffer de borato de sodio (0.05 M, pH 9.5), 125 μL de cianuro de sodio (0.13 mg/mL de agua destilada) y 125 μL de NDA (0.25 mg/mL de metanol), esta solución se mezcló en vortex y se calentó por 20 min. a 60 °C en baño maría. Se enfrió a 4 °C por 4 min. (Brown et al. 2014) y se adicionaron 1.75 mL de buffer de fosfato dibásico de potasio (0.05 M, pH 7)/acetonitrilo (40:60 v/v). Después, se tomó 1 mL y se pasó a través de filtros de jeringa de 0.2 μm Acrodisc® (Pall Co., Port Washington,

NY, USA) directamente a viales ámbar de 2 mL. Los viales se almacenaron a -70 °C hasta su utilización.

2.6.2.2. Muestras

Se tomaron 250 µL de la solución preparada en la sección 2.6.1, se añadieron de manera secuencial 250 µL de buffer de borato de sodio (0.05 M, pH 9.5), 125µL de cianuro de sodio (0.13 mg/mL de agua destilada) y 125 µL de NDA (0.25 mg/mL de metanol). Esta solución se mezcló en vortex y se calentó por 20 min. a 60 °C en baño maría. La mezcla se enfrió a 4 °C por 4 min. (Brown et al. 2014) y se adicionaron 1.75 mL de buffer de fosfato dibásico de potasio (0.05 M, pH 7)/acetonitrilo (40:60 v/v) para después tomar 1 mL y pasarlo a través de filtros de jeringa de 0.2 µm Acrodisc® (Pall Co., Port Washington, NY, USA) directamente a viales ámbar de 2 mL. Los viales se almacenaron a -70 °C hasta su utilización 24 horas después.

2.6.3. Curva de calibración

La curva de calibración se preparó a partir de FB₁ obtenida de Romer Labs (Union, MO, USA), a concentración de 50.0 µg/mL, suspendida en acetonitrilo/agua (1:1 v/v). Este estándar se disolvió en agua/acetonitrilo (60:40 v/v) para obtener concentraciones de 0.1, 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5, 15 y 17.5 µg/mL.

Para determinar la ecuación lineal que mejor represente a la curva se realizó un análisis de regresión lineal en el paquete estadístico SAS® Software University Edition (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) los intervalos de confianza ($p < 0.05$) y la determinación de las concentraciones de la muestra se obtuvieron de acuerdo a lo descrito Prichard & Barwick (2003) utilizando las siguientes formulas:

2.6.3.1. Intervalos de confianza

$$S x_0 = \frac{s(r)}{m} \sqrt{\frac{1}{N} + \frac{1}{n} + \frac{(\bar{y}_0 - \bar{y})^2}{m^2 \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}} \quad (1)$$

Donde:

$s(r)$ desviación estándar residual

n número de puntos de calibración pareados

m gradiente calculado que mejor representa la curva

N número de mediciones que se hicieron en la muestra

\bar{y}_0 es la media de los valores de y de N repeticiones de la muestra

\bar{y} es la media de los valores de y de los estándares de calibración

x_i valores del eje x

\bar{x} media de los valores de x_i

Para el cálculo del valor de $s(r)$ se utilizó la siguiente fórmula:

$$s(r) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2}} \quad (2)$$

Donde:

y_i valor observado de y dado un valor de x_i

\hat{y}_i valor de y predicha por la ecuación de calibración lineal dado un valor de x_i

n número de puntos de calibración

2.6.3.2. Concentración de muestra

Una vez obtenida la ecuación lineal que mejor representa la curva ($y = mx + b$) esta se utilizó para determinar las concentraciones de las muestras mediante el despeje de esta:

$$y = mx + c$$

$$y - c = mx$$

$$x = \frac{y - c}{m}$$

(3)

Donde:

y valor observado en el eje y

m gradiente de la línea de mínimos cuadrados

x valor observado en el eje x

c intercepto de la línea de mínimos cuadrados

2.6.4. Fase móvil

La fase móvil se preparó utilizando acetoneitrilo/agua/ácido acético (57:42:1 v/v/v), esta mezcla se filtró con membrana de nailon de 0.2 μm Nylaflo® (Pall Co.) utilizando una bomba de vacío, repitiendo este proceso 2 veces. Posteriormente se degasificó por 10 min. utilizando baño ultrasónico Ultrasonic Cleaning Bath CPXH 3800 (Fisher Scientific Co.). El flujo se mantuvo a 0.3 mL/min. La elución de FBs se obtuvo mediante un flujo isocrático.

2.7. Análisis estadístico

Para determinar la influencia de la temperatura ambiental, temperatura del forraje henificado, humedad y condiciones de almacenamiento en el grado de presencia de FBs en los diferentes forrajes, se realizó un análisis de correlación de Pearson en el paquete estadístico SAS® Software University Edition (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). También se realizó un análisis de frecuencia para establecer el riesgo de exposición a niveles por encima de lo sugerido. Los resultados obtenidos de la concentración de FBs a lo largo de las diferentes estaciones fueron analizados mediante pruebas no paramétricas de un solo factor One-way ANOVA, comparando concentración de FBs x centro ecuestre con una prueba de Kruskal-Wallis utilizando la suma de rangos de Wilcoxon. Adicionalmente, para determinar las estaciones con más frecuencia de aparición de FBs, la concentración de FBs x estación de año se analizó por medio de una prueba de medianas de un solo factor. Estas pruebas se compararon con una prueba de Chi-Cuadrada. La influencia de la temperatura en UPLC sobre la intensidad de emisión se analizó con un análisis de varianza ANOVA. Los resultados se consideraron significativos a $p \leq 0.05$.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS

3.1. Condiciones medioambientales y de almacenamiento

3.1.1. Variación climática el día de la toma de muestras

Durante el periodo de estudio que comprendió un año (verano 2016 a primavera 2017) se tomaron medidas de temperatura ambiental en el lugar de almacenaje (Figura 9) en los días específicos en que se tomaron las muestras.

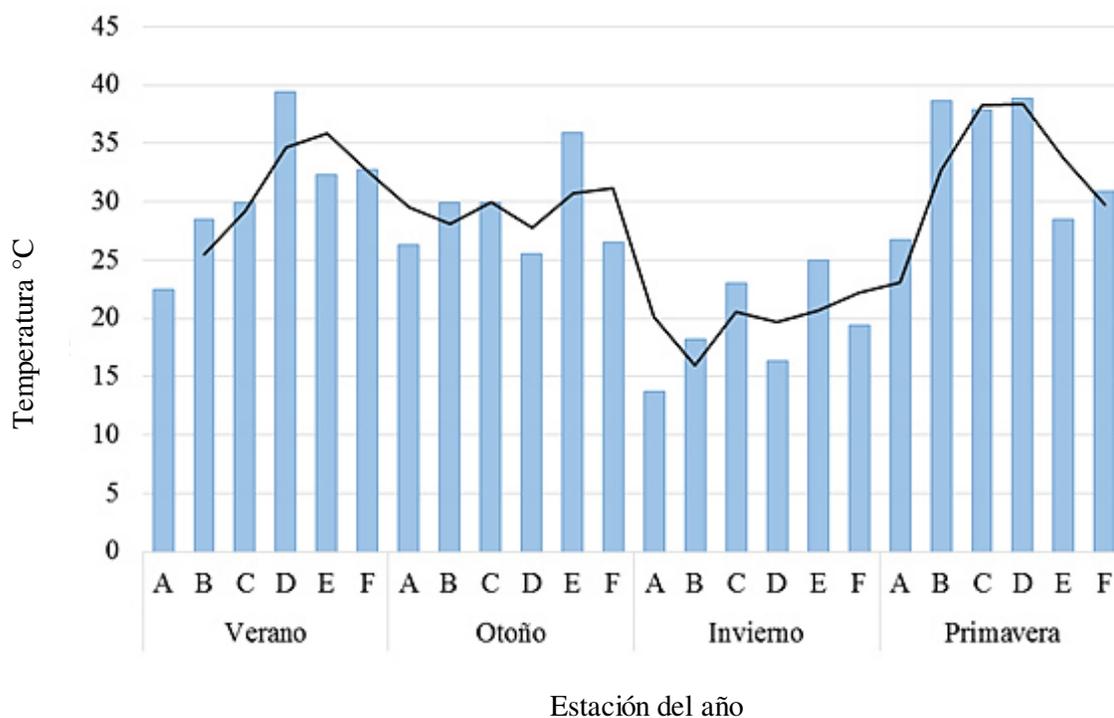


Figura 9. Temperatura media por centro e cuestre (A – F) en cada estación, tomada el día de muestreo.

Se puede observar que hay una gran variabilidad de temperaturas en los diferentes lugares muestreados incluso en la misma temporada del año, sin embargo, se sigue un patrón estacional normal como lo indica la línea de tendencia. Las mayores temperaturas se presentaron en verano (2016) y primavera (2017) con temperaturas promedio de 30.4 y 32.4 °C respectivamente. Por otra parte en otoño (2016) e invierno (2016) se presentaron las temperaturas menores con promedios de 29.6 y 18.9 °C respectivamente. Es importante mencionar que la temperatura obtenida el día de la toma de muestra no refleja la temperatura ambiental directamente, ya que otros factores propios de la infraestructura del lugar de almacenamiento influyen sobre las condiciones medioambientales dentro de este mismo. Aun así, estas temperaturas representan la temperatura ambiental influenciada por la infraestructura del almacén, lo cual es un factor influyente en el contexto de las condiciones de almacenamiento.

3.1.2. Condiciones de almacenamiento

Los resultados obtenidos por las hojas de evaluación (Sección 2.3) muestran que en todos los lugares hubo condiciones de almacenamiento deficientes (Figura 10) sin importar la calidad de los materiales utilizados ni el diseño del lugar. En la mayoría de las ocasiones (93.33%), las muestras se tomaron de pacas chicas (80 x 40 x 40 cm) mientras que el resto (6.67%) se tomaron de pacas grandes (90 x 100 x 210 cm). En la mayoría de los lugares se utilizaban elevaciones para poder separar las pacas del suelo, sin embargo, en ningún lugar se utilizaba un espaciado entre pacas para favorecer el paso de aire y evitar la acumulación de humedad en el centro de la pila de pacas. De igual manera, en pocos lugares se controlaba la ventilación o temperatura del lugar de almacenaje y solo en dos establos se utilizaba suelo de concreto.

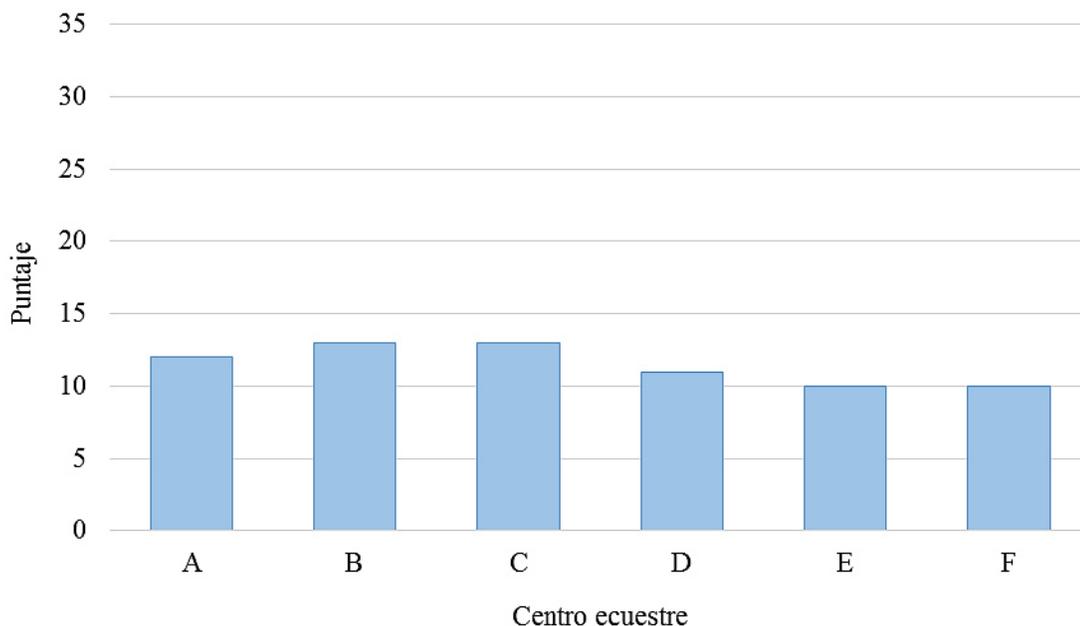


Figura 10. Puntaje obtenido (escala de 0-37) en condiciones de almacenamiento, donde un mayor puntaje representa mejores condiciones de almacenaje del alimento.

3.2. Medición de FBs totales en fluorómetro

Las muestras se procesaron mediante el método establecido en el manual FumoniTest® Vicam® (Waters Co.) recolectando las FBs por CIA. Se contaminaron con FB₁ diversas matrices para analizar la efectividad del método de obtener una recuperación de FBs en el forraje molido, sin embargo, no se obtuvieron recuperaciones de FBs al contaminarse la matriz, debido a esto se contaminó con 5 µg/ml al extracto de la matriz (Kim et al. 2002), recolectando las FBs por CIA, obteniendo de esta manera recuperaciones de ~ 85%. Del análisis en el forraje muestreado en los centros ecuestres, se midió el contenido de FBs totales en 44 muestras a lo largo del estudio (Figura 11), estas presentaron una gran variabilidad en el grado de concentración de FBs totales.

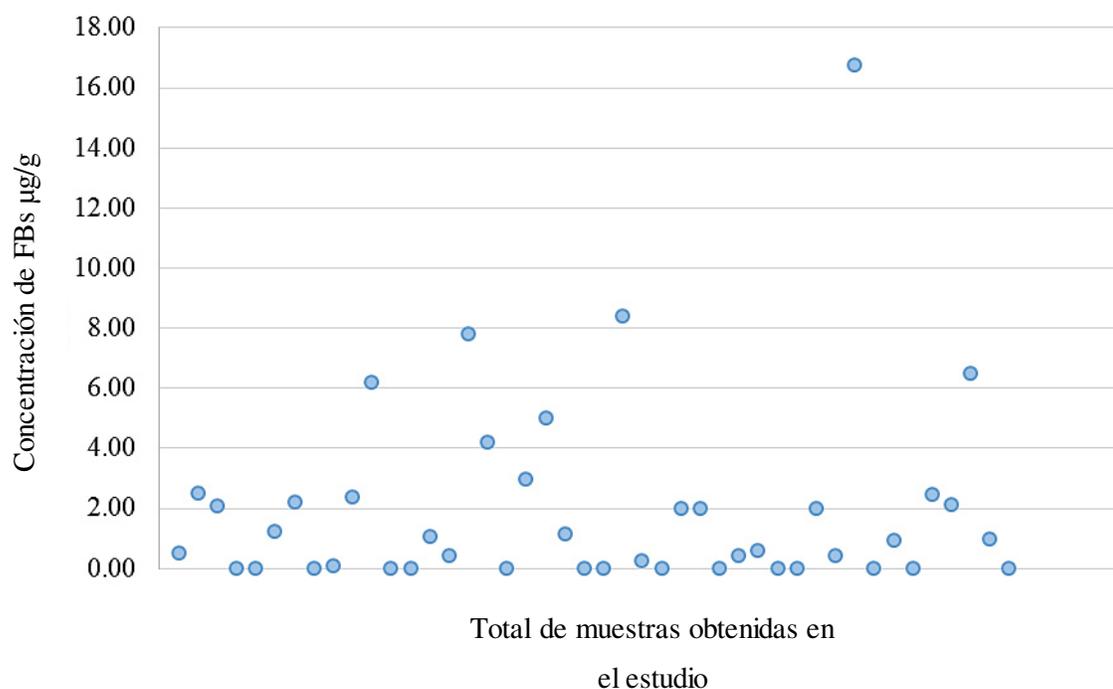


Figura 11. Distribución de las concentraciones de FBs en las muestras obtenidas a lo largo del estudio.

La concentración de FBs más alta encontrada fue de 16.75 µg/g. Esta muestra se obtuvo en el periodo de verano (2016), sin embargo, como se muestra en la figura 11, se puede observar que la mayoría de las muestras presentan concentraciones de ~2 µg/g o menores.

3.3. Medición de FB₁ en UPLC

Para la detección de FB₁, se montó bajo las condiciones de este laboratorio el método de derivatización establecido por Bennett & Richard (1994), realizando ciertas modificaciones para su optimización.

3.3.1. Columna

Inicialmente se utilizó una columna analítica mBondapak™ C18 (Waters Co.) con tamaño de partícula de 10µm (3.9 x 150 mm). El tiempo de corrida se estableció a 8 min. con un volumen de inyección de 10 µL. El pico de FB₁ se observó en el minuto ~4.5.

Posteriormente se decidió utilizar una columna analítica Acquity UPLC® BEH C18 (Waters Co.) con tamaño de partícula de 1.7 μm (2.1 x 100 mm), un tiempo de corrida de 4 min. y un volumen de inyección de 3 μL . Utilizando esta columna, el pico de FB₁ se detectó en el minuto ~2.8. En la figura 12 se muestra la diferencia cromatográfica obtenida con los dos tipos de columna.

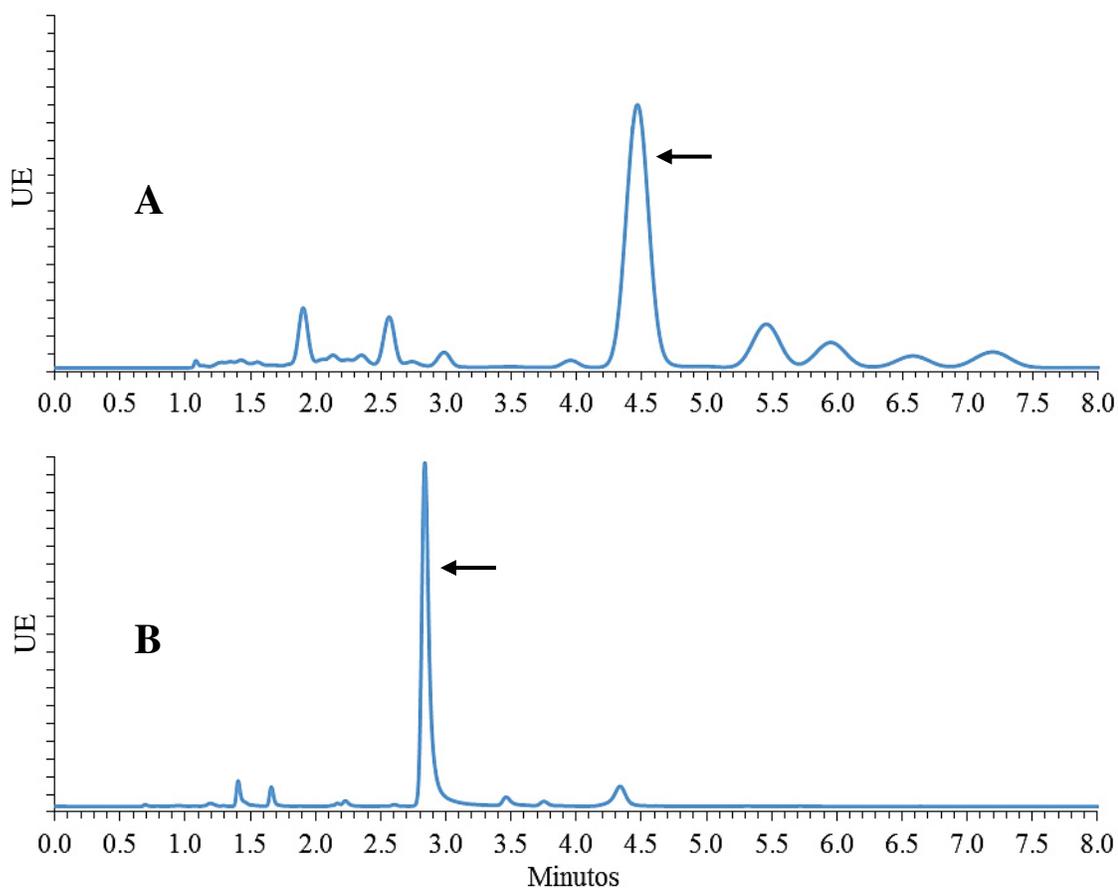


Figura 12. Comparación del tiempo de retención y separación cromatográfica de FB₁ (flecha negra) utilizando diferentes columnas:
(A) Waters mBondapak™ C18, 10 μm
(B) Waters Acquity UPLC® BEH C18, 1.7 μm .

3.3.2. Temperatura

Se probaron diferentes temperaturas tanto en la columna como en el administrador de muestras del UPLC para observar la respuesta de la intensidad de emisión.

3.3.2.1. Columna

Las temperaturas que se probaron fueron de 35 y 40 °C. Se observa una diferencia estadística en la intensidad de emisión a 40 °C comparado con los valores observados a temperatura de 35 °C.

Tabla 1. Comparación de temperaturas de columna en UPLC, utilizando diferentes concentraciones ($\mu\text{g/ml}$) de FB₁.

$\mu\text{g/ml}$	Temperatura	Unidades de Emisión	Valor-P*
0.1	35 °C	11896 \pm 694	<.0001
	40 °C	25128 \pm 1032	
2.5	35 °C	491297 \pm 64360	0.2026
	40 °C	563399 \pm 50889	
5	35 °C	848962 \pm 40396	0.0217
	40 °C	1116190 \pm 120066	
7.5	35 °C	1427800 \pm 113636	0.0712
	40 °C	1735206 \pm 186265	
10	35 °C	1916220 \pm 144562	0.0428
	40 °C	2420288 \pm 260493	
12.5	35 °C	2407796 \pm 140457	0.1124
	40 °C	2936389 \pm 428912	
15	35 °C	2476043 \pm 185906	0.0992
	40 °C	3040050 \pm 417073	
17.5	35 °C	2725781 \pm 98641	0.0145
	40 °C	3596292 \pm 351248	

*Análisis de varianza ANOVA.

Como se puede apreciar en la tabla 1, hay una tendencia de carácter directamente proporcional entre la intensidad de emisión y la temperatura utilizada en la columna, por lo cual, aún que aparentemente la temperatura con mejores valores de emisión fue 40 °C, se decidió utilizar 35° C como temperatura de columna, ya que como se muestra en la tabla 1, a temperaturas más altas se tiende a presentar más variabilidad en la respuesta de emisión del complejo FB₁-NDA-NaCN (Samapundo et al. 2006; Khayoon et al. 2010). De esta manera, se obtiene una buena resolución sin aumentar la variabilidad en la intensidad de emisión.

3.3.2.2. Muestra

Las temperaturas que se evaluaron en el administrador de muestras fueron: temperatura ambiente, 35 y 40 °C, de igual manera se observaron las características de estabilidad de la derivatización.

La relación temperatura-intensidad de emisión, mostró una tendencia de carácter directamente proporcional, de la misma manera que se muestra en la tabla 1. Sin embargo, también se muestra un incremento en la variabilidad de respuesta a medida que se incrementa la temperatura, lo cual es indicativo de una menor estabilidad del complejo FB₁-NDA-NaCN. Debido a esto y al igual que en la temperatura de la columna, se decidió establecer 35 °C como temperatura en el administrador de muestras para optimizar el método de detección.

3.3.3. Derivatización

La temperatura que se decidió utilizar para la reacción de derivatización fue de 60 °C, como se menciona en el método de Bennett & Richard (1994), sin embargo, a diferencia del tiempo de 15 min. establecido por ese método, el tiempo de reacción en baño maría en el que se observaron mejores resultados de emisión fue a 20 min (Brown et al. 2014).

3.3.3.1. Estabilidad de almacenamiento

Como se menciona en la sección (Sección 2.6.2.1) los estándares una vez derivatizados se almacenaron a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, por lo cual se evaluó la estabilidad del complejo $\text{FB}_1\text{-NDA-NaCN}$ bajo estas condiciones. Se observó que al descongelar 10 días después el compuesto derivatizado, este exhibía una intensidad de emisión mayor ($\sim 13\%$), comparada con los valores de emisión inicial, obtenidos inmediatamente después de la derivatización (Figura 13).

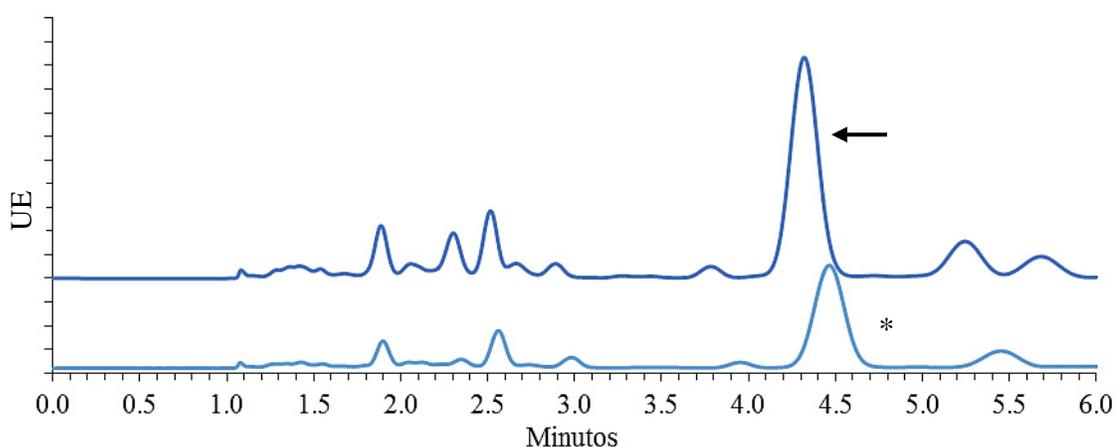


Figura 13. Cromatograma comparativo de la emisión obtenida con el mismo vial antes de congelar (asterisco) y después de 10 días de almacenamiento a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ (flecha).

Una vez que se utilizó el vial con FB_1 derivatizada, se volvió a almacenar a temperatura de $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ para reanalizarlo al día siguiente, con la intención de evaluar la estabilidad del compuesto al volverlo a descongelar, ya que es importante tener disponibilidad de reanalizar un compuesto derivatizado, sobre todo cuando pertenece a una muestra difícil de conseguir o perteneciente a un muestreo periódico. Al descongelar por segunda ocasión, se observó que la intensidad de emisión decreció en un 12% . Este procedimiento de almacenaje a temperatura de $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, para mantener la estabilidad del complejo $\text{FB}_1\text{-NDA-NaCN}$ por periodos consecutivos de hasta 10 días, demuestra que es apropiado para su utilización, sin embargo, no se estableció la cantidad de tiempo que podían permanecer las muestras almacenadas bajo estas condiciones.

3.3.4. Detección en el forraje

Una vez establecidas las condiciones que mejor se desempeñaron para optimizar la estandarización del método, se procedió a analizar el contenido de FB₁ en las muestras donde se encontraron concentraciones de FBs totales superiores a 5 µg/g. Estas se procesaron de acuerdo con lo antes mencionado en la sección 2.6. En todas las muestras analizadas, la concentración de FB₁ se encontró por debajo del límite de detección, inclusive aquellas muestras con concentraciones altas de hasta 16.75 µg/g. Para tratar de determinar si este fue un efecto relacionado con la matriz (forraje molido), muestras en las que no se detectaron FBs por FLR se contaminaron con FB₁ de la misma manera que en lo descrito en la sección 3.2, derivatizando como se menciona en la sección 2.6.2, y así evaluar la recuperación de FB₁. De esta manera se obtuvieron recuperaciones de ~58%, por lo cual, debido a que no hubo detección de FB₁ en las muestras analizadas, se puede argumentar que la discrepancia en la concentración de FB₁ también se puede deber a otros factores no relacionados con el método extracción, purificación o derivatización para UPLC. Posibles explicaciones a esto se discuten más adelante en la sección 4.3 y 4.4.

3.4. Concentración de FBs totales

En todas las muestras de forraje de cada una de las estaciones del periodo de estudio se detectaron concentraciones variables de FBs, al igual que en todos los centros ecuestres, donde dependiendo de la estación muestreada se presentaron niveles detectables de FBs. En la figura 14 se muestran los resultados obtenidos por FLR.

Como lo indica la línea de tendencia, hay cierto patrón estacional en la ocurrencia de FBs en forraje henificado, aumentando y disminuyendo conforme hay cambio de estación y por ende, de factores climáticos. La medición de FBs totales indica que en las muestras de verano (2016) hubo presencia de FBs en concentraciones variables en todos los lugares muestreados. De un total de muestras en verano (15), el 86.66% (13) se encontraron niveles detectables de FBs, siendo la menor de 0.28 µg/g y la mayor de 16.75 µg/g con un promedio de 3.43 µg/g. En otoño (2016) solo en una muestra (11.11%) se encontró presencia de FBs con una concentración de 3 µg/g, con una media de 0.33

$\mu\text{g/g}$, mientras que el 88.88% de las muestras resultó negativo a la presencia de FBs. En invierno (2016) al igual que en verano (2016), hubo presencia de FBs en concentraciones variables en todos los centros ecuestres, habiendo niveles detectables en todas las muestras, siendo el menor de $1.08 \mu\text{g/g}$ y la mayor de $6.5 \mu\text{g/g}$. Finalmente en la última toma de muestras correspondiente al periodo de primavera (2017), se encontraron concentraciones detectables solo en el 50% de las muestras (5), siendo la menor de $0.12 \mu\text{g/g}$ y la mayor de $2.40 \mu\text{g/g}$.

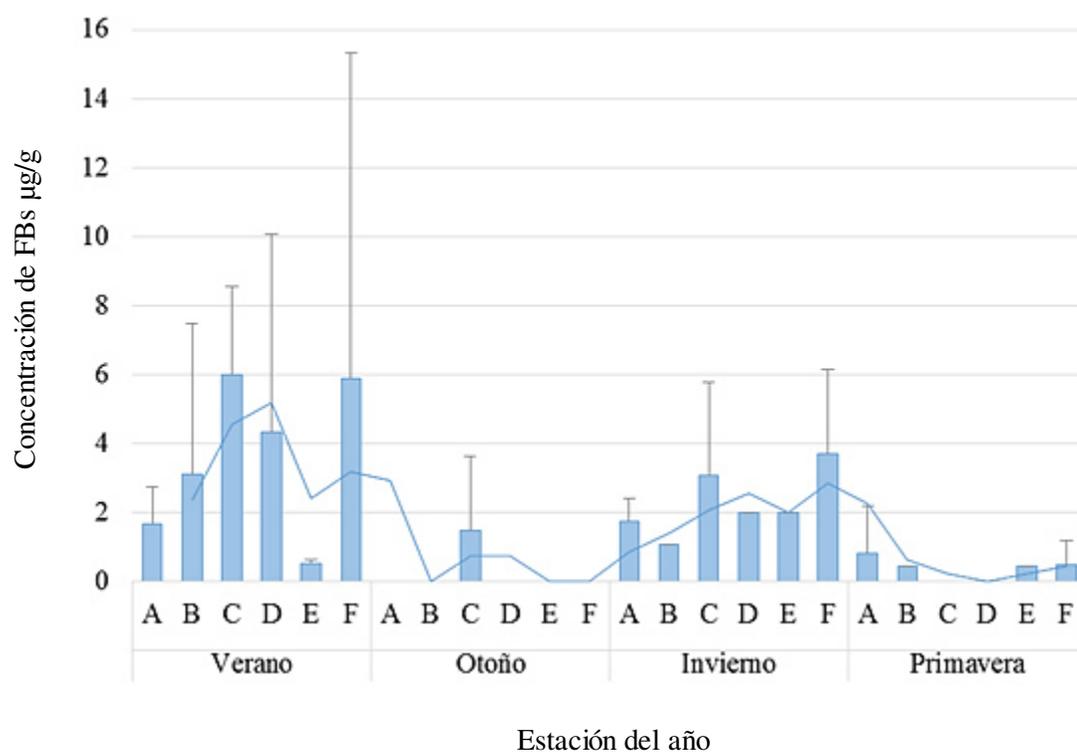


Figura 14. Concentración media ($\mu\text{g/g}$) de FBs totales por centro ecuestre (A – F) en las diferentes estaciones muestreadas, datos obtenidos por FLR. En las líneas verticales en cada barra se representa la DE.

3.4.1. Por centro ecuestre

Aun que pertenecen a la misma zona geográfica, cada centro ecuestre está ubicado en distintas partes de la zona metropolitana de Monterrey, aparte de contar con diferente infraestructura en su almacén así como diversas prácticas de manejo del alimento. Al haber una alta variabilidad entre estos factores, no se encontró una diferencia estadística significativa ($p = 0.8409$) entre las concentraciones de FBs en cada centro ecuestre a lo largo del estudio (Figura 15), indicativo de que las diversas condiciones propias del centro ecuestre, aparentemente no juegan un papel primordial en la acumulación de FBs.

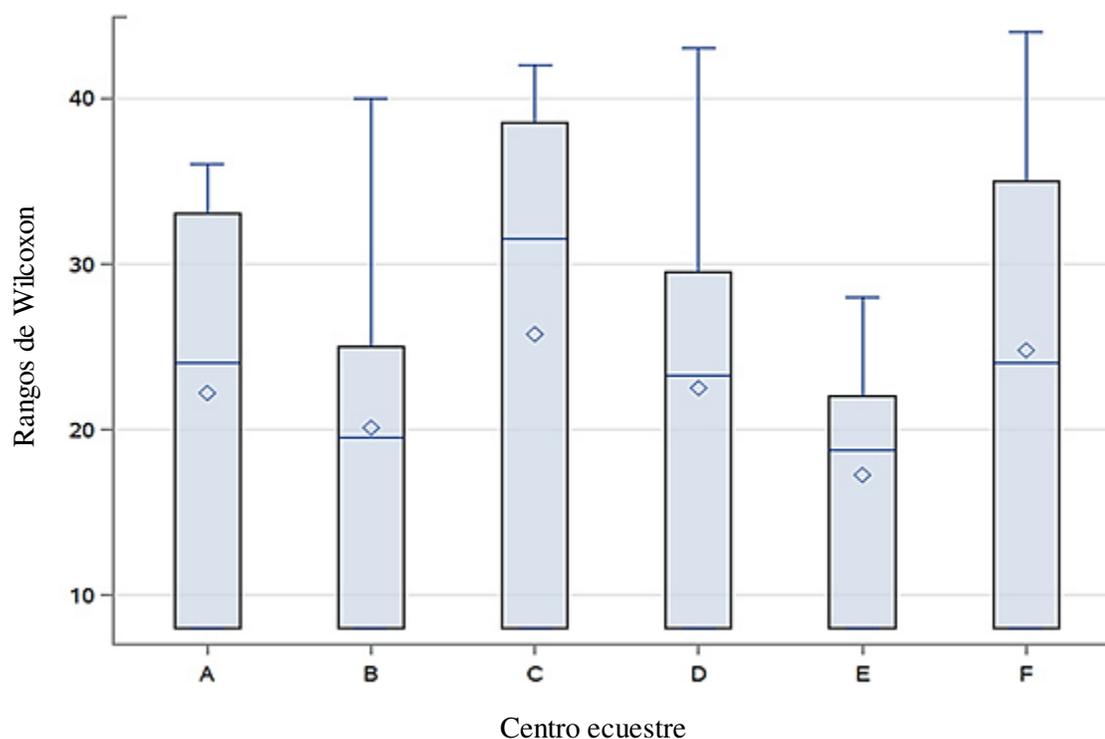


Figura 15. Concentraciones de FBs por centro ecuestre a lo largo del estudio. Prueba de Kruskal-Wallis utilizando la suma de rangos de Wilcoxon y comparado con Chi-Cuadrada ($P > X^2 0.8409$). En las líneas verticales en cada barra se representa la DE.

3.4.2. Por zona

Al agrupar los centros ecuestres por zona, se puede representar más adecuadamente las pequeñas variaciones climatológicas anuales en las diversas porciones de la zona metropolitana de Monterrey. En la figura 16 se muestran las zonas a las que pertenecen los diversos centros ecuestres. Aunque hay una variación en cuanto a la cantidad de lugares muestreados por zona y las concentraciones totales de FBs por centro ecuestre, se puede apreciar que en la zona M hay una tendencia a presentar niveles de concentración de FBs más altos que en la zona L.

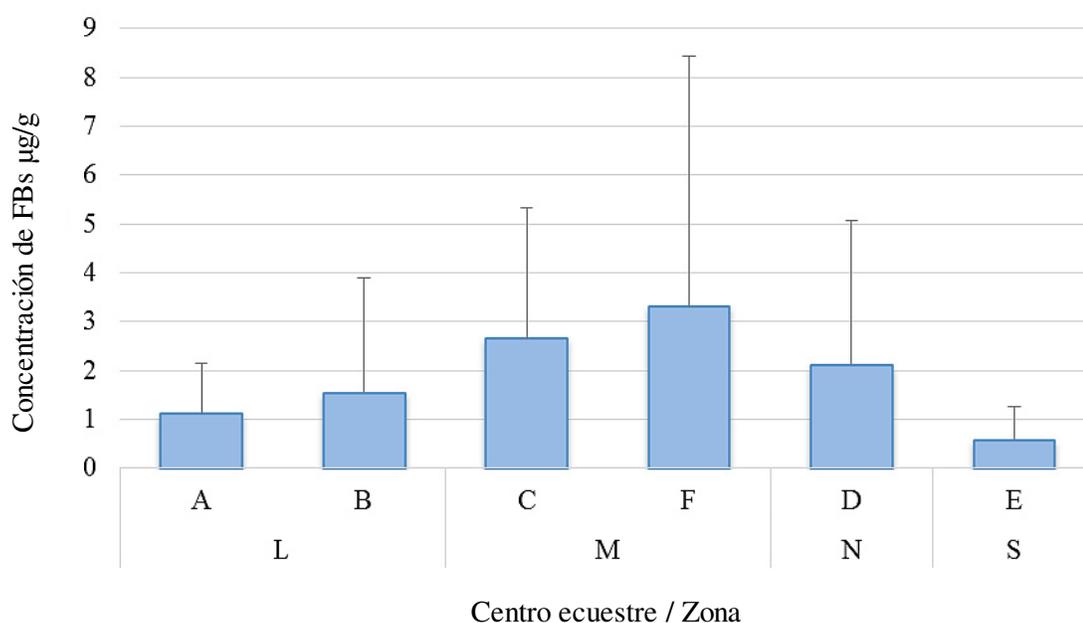


Figura 16. Promedio de la concentración de FBs por centro ecuestre (A-E) agrupado en zonas (L – Centro/sur; M – Oeste; N – Este; S – Sur). Se muestra aparentemente una mayor tendencia de aparición en zona M. En las líneas verticales en cada barra se representa la DE.

3.4.3. Frecuencia de detección

Durante las diversas estaciones del año en las que se realizaron muestreos, se mostró una gran variabilidad en la frecuencia de ocurrencia de diversos niveles de concentración de FBs en el forraje. Los resultados del análisis de medianas de un solo factor (Figura 17) muestran que hay una diferencia significativa en la presencia de concentraciones detectables de FBs, siendo invierno la temporada con mayor presentación de FBs, obteniendo una frecuencia por arriba de la mediana de 11/11 y en donde todas las muestras se encontraron niveles detectables, seguido en frecuencia por verano con un puntaje de 8/14. En las estaciones de otoño y primavera la frecuencia por encima de la mediana de FBs fue estadísticamente menor a las otras estaciones, presentándose solo 1/9 en otoño y 2/10 en primavera.

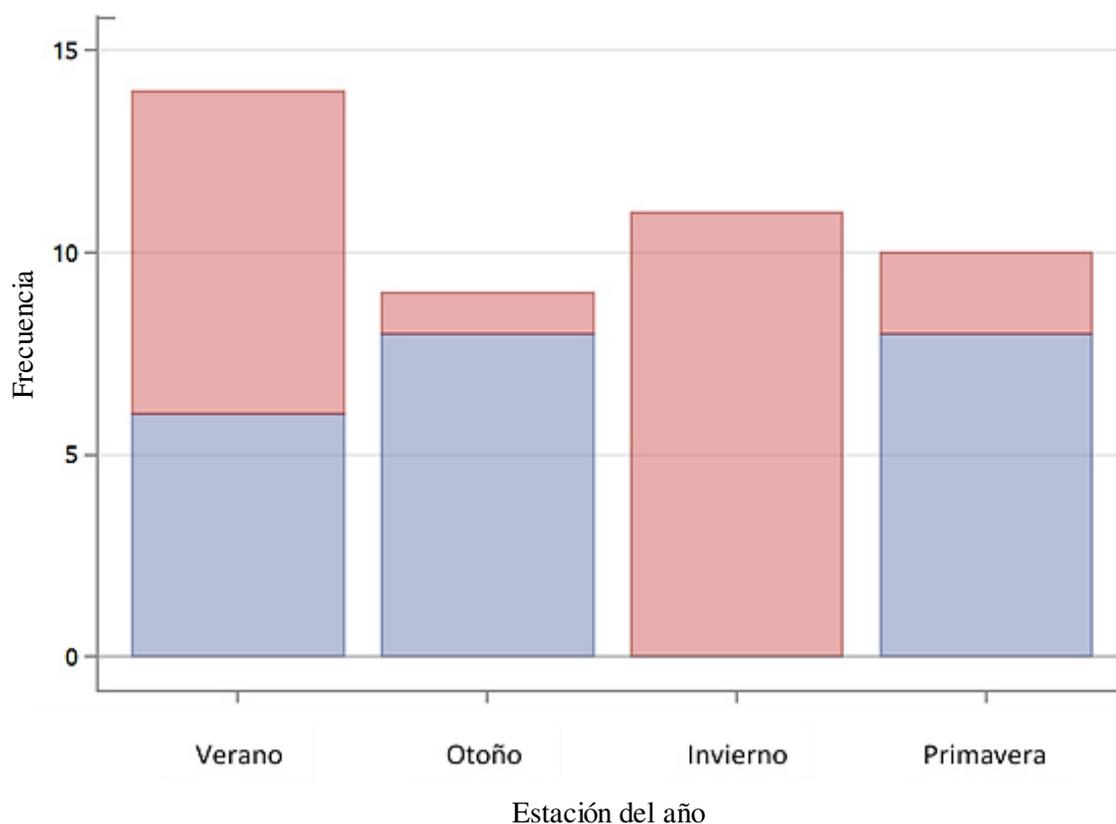


Figura 17. Frecuencia por encima (rojo) y debajo (azul) de la mediana total para FBs totales, agrupada por estaciones de año y representada con la cantidad de muestras por encima de la mediana, comparando con Chi-Cuadrada ($P > X^2$ 0.0002).

3.5. Influencia de factores medioambientales y de almacenamiento sobre el contenido de FBs

Las características climatológicas llegan a ser un factor determinante en la contaminación por FBs en el alimento, debido a esto se evaluó la temperatura y la precipitación pluvial. Se contemplaron los meses anteriores a la fecha de la toma de muestras, debido a que las etapas de cultivo y proceso de henificación son factores de riesgo para la contaminación con FBs.

Tabla 2. Medias de temperatura y precipitación pluvial en el estado de Nuevo León, contemplando un mes anterior al mes de la toma de muestra (datos obtenidos del Sistema Meteorológico Nacional).

Estación	Precipitación (mm)	Temperatura (°C)
Verano	62.5	28.3
Otoño	78.6	25.4
Invierno	24.7	16.7
Primavera	22.2	22.9

Como se muestra en la tabla 2 la mayor temperatura encontrada fue de 28.3 °C que corresponde a la temporada de verano, seguida de otoño, primavera e invierno. En cuanto a la precipitación pluvial, la estación del año con más cantidad de lluvia fue otoño con 78.6 mm, seguida de verano, invierno y primavera. No se encontró una correlación significativa entre la temperatura ambiental, temperatura en pacas y humedad en pacas, con el contenido de FBs en las diversas estaciones, siendo la temperatura ambiental en invierno donde se obtuvo un mayor coeficiente de determinación ($r^2= 0.202$).

3.5.1. Efecto del almacenamiento

De igual manera que con los factores medioambientales, se obtuvieron bajos coeficientes de determinación entre las condiciones de almacenaje y el contenido de FBs totales ($r^2 = -0.054$). En cuanto al tiempo de almacenaje del alimento, este no es un factor determinante en la presencia de FBs como se muestra en la figura 18, pero si es un punto de referencia donde se puede observar una tendencia (línea de tendencia) de carácter inversamente proporcional, entre menos tiempo de permanencia en el almacén más concentración de FBs se encuentra presente. La mayoría de las muestras donde se encontraron niveles por encima de $5 \mu\text{g/g}$ tenían 1 mes o menos en almacenamiento, mientras que a medida que aumenta el tiempo de almacén, se observa que la concentración de FBs tiende a disminuir. Contemplando las etapas del procesamiento del forraje, desde su cultivo hasta su almacenaje, el patrón de presencia y concentración de FBs encontrado, sugiere que la contaminación con estas toxinas se da preferente en etapas anteriores al almacenamiento.

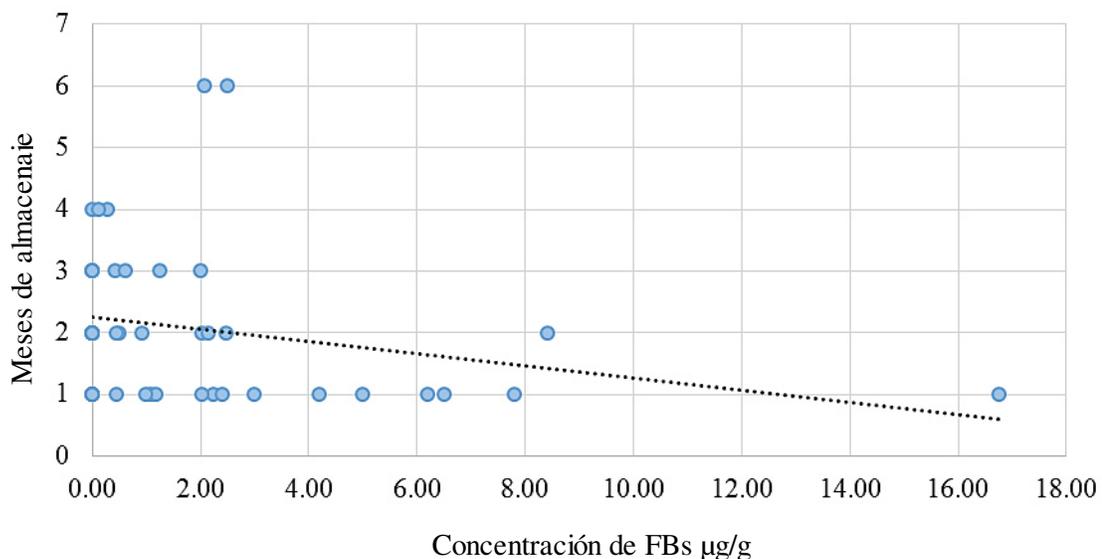


Figura 18. Concentraciones de FBs totales encontradas en todas las muestras, organizadas por tiempo de permanencia en almacenamiento.

CAPÍTULO 4

DISCUSIÓN

En el presente estudio se observó que la ocurrencia de FBs en el forraje henificado tiene una gran variabilidad, con una tendencia a ser influenciada por diversos factores como: tiempo de almacenaje, características propias del medio ambiente local en el que se encuentra almacenado el forraje y estaciones del año con sus características climatológicas. Posiblemente otros factores no medidos en este estudio como: cepa de *Fusarium spp.* afectando el cultivo, plagas, resistencia de la planta ante la presencia de estos factores, variables climatológicas por factores difíciles de predecir (fenómenos climatológicos) y factores antropológicos, también pueden afectar en la ocurrencia y concentraciones de FBs que se presentan en el forraje.

4.1. FBs en el forraje

La frecuencia en ocurrencia de FBs en el forraje henificado encontrada en este estudio fue de 65.9%, lo cual se aproxima a lo encontrado por otros estudios similares realizados en la misma zona (Huerta-Treviño et al. 2016), donde encontró un 54%, así como en otros lugares de Estados Unidos (Yu et al. 1999) donde se llegó a presentar un 52%, sin embargo, difiere con otros estudios en los que encontraron bajas concentraciones de FBs o no se logró determinar la presencia (Mirocha et al. 1992; Buckley et al. 2007; Skladanka et al. 2011). Por otra parte, Vieira Queiroz et al. (2012) en un estudio realizado en muestras de maíz almacenado, encontró la presencia de FBs en todas las muestras analizadas, sin embargo, en este caso la matriz fue diferente. Esto marca una clara variabilidad en la presencia de FBs en diversas matrices, lo cual concuerda con lo encontrado en el presente estudio, donde se muestra una variación en ocurrencia de FBs que se puede presentar a lo largo de las diversas estaciones climáticas anuales y en los

diversos microclimas de la zona metropolitana de Monterrey. En estudios realizados en diversos forrajes enfocados a la cuantificación de FBs, se han encontrado frecuencias variables en la incidencia de FBs. Gallo et al. (2015), en una recopilación de datos provenientes de diversos estudios enfocados a este propósito, menciona que se han encontrado porcentajes de incidencia de FBs en forrajes que van de 1 a 97% (51% en promedio), con un número de muestras de entre 3 y 140 en diversas matrices, predominando aquellas muestras que contienen maíz como ingrediente. Hay que tomar en cuenta que la frecuencia de detección de FBs es multifactorial, por lo que porcentajes bajos de presentación no indican que ese alimento estará libre de otras fusariotixinas y en general de otras micotoxinas.

La Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA) y la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) recomiendan que en el alimento destinado al consumo equino no sobrepase los 5 $\mu\text{g/g}$ (Voss et al. 2007) en contenido de FBs, sin embargo se ha reportado que niveles de hasta 2 $\mu\text{g/g}$ pueden causar ELEM (Rosiles & Bautista 1998). La concentración de FBs en las muestras analizadas fue variable (Figura 11), dependiendo de la estación climática en la que fue cosechado y procesado el forraje. La mayor concentración encontrada corresponde al periodo de verano, encontrado hasta 16.75 $\mu\text{g/g}$ de FBs totales, lo cual representa una concentración no reportada antes en forraje henificado. Mirocha et al. (1992) reporta por primera vez la presencia de FBs en forraje de pastoreo, encontrando concentraciones de hasta 9 $\mu\text{g/g}$. Otras concentraciones encontradas en diferentes tipos de forraje varían entre 0.016 $\mu\text{g/g}$ hasta 26.2 $\mu\text{g/g}$ (Gallo et al. 2015), sin embargo, en gran parte de los estudios disponibles las concentraciones han sido menores, como en lo mencionado por Yu et al. (1999), donde reportaron concentraciones de 0.12 $\mu\text{g/g}$ en forraje henificado. En un brote de ELEM en el estado de Oaxaca, México (Rosiles & Bautista 1998), se reportaron concentraciones de FBs que variaban de 0.16 a 13.3 $\mu\text{g/g}$, lo cual se relaciona más con lo reportado en este estudio, sin embargo las muestras analizadas fueron de maíz. Por otro lado, en estudios precedentes de la misma zona que el presente (Huerta-Treviño et al. 2016), se encontraron niveles de entre 0.09 a 0.29 $\mu\text{g/g}$ en diversos tipos de forraje, incluyendo alfalfa (*Medicago sativa* L.),

sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] y pasto buffel (*Cenchrus ciliaris* L.), aún que este estudio se realizó mediante ELISA.

Tomando en cuenta que la presencia de FBs se debe a una contaminación previa con hongos del género *Fusarium spp.*, es importante contemplar una contaminación simultánea con otro tipo de fusariotoxinas debido a que su presencia puede ser un indicador de la posible contaminación (presente o futura) por FBs, ya que se ha observado que una misma especie de hongo tiene la capacidad de producir diversas micotoxinas (Buckley et al. 2007; Skladanka et al. 2011; Pitt et al. 2013; Nichea et al. 2015). En un estudio realizado por Raymond et al. (2000) se encontraron niveles importantes de ZEA, DON y T2 en muestras de forraje alfalfa-timothy después de un almacenamiento de 11 meses. En otros estudios donde midieron diversas micotoxinas en forraje (Skladanka et al. 2011, 2013), se han enfocado principalmente a fusariotoxinas como las anteriormente mencionadas, así como en otras micotoxinas de interés como aflatoxinas (AFL).

Las micotoxinas son sintetizadas en condiciones de estrés, influenciadas por factores como temperatura, humedad, contenido de materia seca, almacenamiento y competencia con otros microorganismos. La mayoría de estos factores se ve mayormente influenciado por las cambiantes condiciones climatológicas presentadas en diversos años o incluso durante cada estación a lo largo del mismo año, por lo cual se ha tratado de ligar la presencia de FBs y otras micotoxinas a estas variables (Cao et al. 2014; Santiago et al. 2015) para poder de esta manera tratar de comprender el patrón de contaminación. En el presente estudio se observó un patrón estacional en la ocurrencia de FBs, lo que indica que factores medioambientales juegan un papel primordial en la presencia de estas. La temporada con mayor ocurrencia fue verano, seguida por invierno, primavera y otoño, mostrando una fluctuación estacional (Figura 14) invariablemente de otros factores que pudieran influir como tiempo de almacenamiento, infraestructura del lugar de almacenamiento y zona geográfica del lugar muestreado.

En cada una de las estaciones se presentaron diversas condiciones de precipitación pluvial y temperatura (Tabla 2), sin embargo, aún que se encontró una diferencia estadística significativa en la ocurrencia de FBs a lo largo de las diferentes estaciones abarcadas en el presente estudio (Figura 17), no se encontró una asociación directa estadística entre las diversas características climatológicas y la presencia de estas. En otras investigaciones (Skladanka et al. 2013) se observó que bajas temperaturas reducen el riesgo de contaminación por micotoxinas, lo cual contrasta con otros estudios donde se encontraron cantidades más altas de micotoxinas en temporadas más frías (Golinski et al. 2006), sin embargo, en estos estudios no se midieron concentraciones de FBs o simplemente no se encontraron, enfocándose en otras fusariotoxinas como DON y ZEA.

Se ha tratado de asociar la presencia de *Fusarium spp.* y el grado de contaminación por FBs, sin embargo, la presencia del hongo no es indicativo de la presencia de FBs, aun así, en estudios previos se ha reportado que las altas concentraciones de ZEA sugieren que *Fusarium spp.* se encontraba presente antes de la cosecha y fue remplazado por otros hongos como *Aspergillus spp.* (Raymond et al. 2000; Buckley et al. 2007) o *Penicillium spp.* (Taffarel et al. 2013) durante el almacenamiento, ya que el 50 % del forraje muestreado contenía hongos patogénicos, pero en ninguna muestra se encontró la presencia de *Fusarium spp.* De igual manera, se menciona que el clima húmedo en el afloramiento de la planta propicia la infección por *Fusarium spp.* en pastos y granos, haciendo mención importante a que un clima seco es necesario para la cosecha, ya que un lento secado del pasto favorece el desarrollo y presencia de FBs (Pitt et al. 2013), por lo cual se puede argumentar que la contaminación por FBs tiene una mayor probabilidad de presentarse antes del almacenaje del forraje henificado. Esto tiene cierta relación con lo antes expuesto por Rohweder et al. (2011) donde encontraron que a medida que aumenta el tiempo en el almacenamiento la concentración de fusariotoxinas (en este caso DON) decrece, especialmente en el alimento que fue almacenado bajo techo. Este efecto hallazgo puede ser una posible explicación de nuestros hallazgos en el estudio actual. También en el estudio de Rohweder et al. (2011) se menciona que puede haber ausencia de una cepa de hongo en presencia de otra, lo cual se observó al contaminar el trigo con *F. culmorum* el cual clasificaron como alto productor de DON, consiguientemente encontrando altas

cantidades de esta micotoxina en comparación con otras, lo cual sugiere una selectividad de producir cierto tipo de fusariotoxina dependiendo de la cepa de *Fusarium spp.* Esto también es mencionado por otros autores (Skladanka et al. 2011; Eugenia de la Torre-Hernández et al. 2014; Santiago et al. 2015) donde proponen que las diversas cepas de *Fusarium spp.* son factor a considerar en la ocurrencia y acumulación de FBs en el alimento.

Al no encontrar una diferencia significativa en la concentración de FBs por centro ecuestre a lo largo del estudio se puede asumir que las condiciones propias de cada lugar como: prácticas de manejo del alimento e infraestructura del lugar, no juegan un papel muy determinante en las diferentes concentraciones encontradas, lo cual se puede vincular con el hecho no haber encontrado una relación entre las diversas prácticas de manejo (Figura 10) y el contenido de FBs en el alimento, sin embargo, se tiene que considerar lo antes mencionado por otros autores sobre el contenido de fusariotoxinas y el tiempo de almacenaje (Rohweder et al. 2011), por lo cual, se puede argumentar que las características propias del lugar de almacenaje en los diversos centros ecuestres sí pueden influir en el grado de contaminación por FBs. En un esfuerzo por tratar de asociar las concentraciones de FBs con otros factores que determinen su presencia, se agruparon a los centros ecuestres por zonas, lo cual puede representar mejor las pequeñas variaciones climatológicas a lo largo de la zona metropolitana de Monterrey. Se observó una tendencia a presentarse más concentración de FBs en lugares con más altitud (zona M), aún que esta tendencia puede ser multifactorial y haber sido ocasional.

En este estudio se analizaron diversos tipos de forraje henificado, entre los cuales los más predominantes fueron las variedades de pasto Bermuda (*Cynodon spp.*), por lo cual, al tenerse una predisposición a utilizar este tipo de forraje, no se pudo establecer una asociación entre el contenido-presentación de FBs y cierto tipo de pasto en específico, sin embargo, anteriormente se ha hecho referencia a que las diversas especies de pasto no influyen significativamente en el contenido de micotoxinas (Buckley et al. 2007; Skladanka et al. 2011, 2013; Huerta-Treviño et al. 2016).

4.2. Resolución cromatográfica

Al utilizar la columna analítica mBondapak™ C18, el pico de FB₁ se observó al minuto ~4.5, lo cual está en parcial acuerdo con lo mencionado previamente por Brown et al. (2014), quienes observaron que el tiempo de aparición del pico de FB₁ bajo sus condiciones de laboratorio y utilizando el mismo tipo de columna se mostró al minuto ~4.7, aún que en ese estudio se menciona que ese tiempo de retención se observó solo en concentraciones altas de FBs, mientras que en concentraciones bajas el tiempo de retención rondaba el minuto ~5.8. En el presente estudio, el tiempo de retención siguió siendo prácticamente el mismo invariablemente de la concentración de FBs. Al cambiar de columna (ACQUITY UPLC® BEH C18, 1.7 μm, 2.1 x 100 mm) el tiempo de retención fue menor, observándose al minuto ~2.8 (Figura 12). La elección de columna para obtener una óptima separación de los compuestos ha sido previamente evaluada por otros estudios (Han et al. 2010; Ren et al. 2011). En parcial acuerdo con Ren et al. (2011), pudimos observar una disminución en el tiempo de retención así como una separación cromatográfica más adecuada al utilizar una columna con un tamaño de partícula menor, sin embargo, se difiere en cuanto al tiempo de retención de FB₁ donde el autor menciona que fue al minuto ~1.6 mientras que en el presente estudio se observó al minuto ~2.8, aun así, se debe tomar en cuenta que las características cromatográficas fueron diferentes lo que podría explicar la diferencia encontrada en el tiempo de retención.

Un factor importante que considerar teniendo la disponibilidad de poder utilizar un equipo de UPLC, es la temperatura de columna, ya que como se observó en el presente estudio (Tabla 1) la temperatura puede incrementar la resolución cromatográfica, lo cual representa un aporte en el proceso de optimizar la metodología de detección. En el presente estudio se decidió utilizar 35 °C (Ren et al. 2011) como temperatura de columna, ya que al comparar los resultados obtenidos a temperaturas de 35 y 40 °C, se observó que la intensidad de emisión, aún que aparentemente mejor a temperaturas mayores, mostraba un incremento en la variabilidad de la respuesta. A pesar de esto, en otros estudios donde se ha utilizado una temperatura de 40 °C en columna (Han et al. 2010; Muscarella et al. 2011) no se reportó este incremento. De manera similar, la temperatura utilizada en el administrador de muestras mostró un patrón directamente proporcional entre la

temperatura y la intensidad de emisión, por esta razón, se decidió no modificar la temperatura y mantenerla a la misma que la utilizada en columna. Es importante mencionar que la intensidad no se comportó de manera acumulativa, esto es, que al tener tanto la muestra y columna a la misma temperatura, no se observó un incremento mayor en la emisión al tener ambas temperaturas iguales comparadas con lo observado al medir cada variable individualmente.

Debido a que la molécula de FB₁ carece de componente fluorescente, es necesario utilizar métodos de derivatización para su detección por fluorescencia en UPLC. En el presente estudio se decidió utilizar como agente derivatizante la combinación de NDA-NaCN, ya que este compuesto al unirse con el grupo NH₂ terminal de las FBs, forma un complejo estable y altamente fluorescente (Ndube et al. 2011; Robinson et al. 2012). En este estudio se mostró que la estabilidad del complejo FB₁-NDA-NaCN perdura incluso después de periodos de almacenamiento a -70 °C por hasta 10 días. Sumado a esto, también se observó un incremento de ~13 % en la emisión al descongelar las muestras (Figura 12), lo cual concuerda parcialmente con otros estudios (Bennett & Richard 1994) donde después de 24 horas también se observó un incremento en la intensidad de emisión de ~5%, no obstante, no se menciona que este incremento se diera después de un periodo de almacenamiento a -70 °C. Esto representó para el presente estudio una alternativa para el adecuado almacenamiento y estabilidad del complejo FB₁-NDA-NaCN, así como una mejora en el método de detección.

4.3. Detección y cuantificación de FBs

En la actualidad hay diversos métodos por los cuales se puede realizar la detección y cuantificación del contenido de FBs en diversas matrices (Turner et al. 2015), siendo utilizados preferentemente métodos cromatográficos como HPLC, UPLC y GC, estos, acoplados a espectrometría de masas, representan una óptima alternativa para la detección de diversos compuestos químicos debido a la alta capacidad de detectar cantidades y diferencias pequeñas en componentes estructuralmente similares. Por otra parte, la mayoría de las detecciones de micotoxinas se realiza inicialmente por medio de inmunoensayos

como ELISA o pruebas fluorométricas, los cuales son métodos más económicos, sencillos de realizar y con resultados rápidos. Aun así, una desventaja de este tipo de métodos es que carecen de precisión, por lo cual la selección del método de detección y cuantificación dependerá de varios factores, siendo hasta el momento uno de los más importantes la capacidad económica para poder elegir el método que se desea utilizar.

En cuanto a la purificación de las FBs, se han utilizado diferentes técnicas, algunas de las cuales involucran la utilización de CIA (Kim et al. 2002; Duncan et al. 2004; Abramović et al. 2005; Ndube et al. 2011; Kong et al. 2012; Jakšić et al. 2015), aún que también se menciona la utilización de tierra de diatomeas (Petrarca et al. 2014) y columnas SAX (Ndube et al. 2011), actualmente la impresión de polímeros moleculares (MIPs) representa una excelente alternativa, ya que están diseñados específicamente para adaptarse y unirse a la forma de la estructura molecular del compuesto de interés (Turner et al. 2015). Por todos los medios anteriormente mencionados se han obtenido buenas recuperaciones, sin embargo, en el caso de las CIA hay que tomar en cuenta que al tratarse de anticuerpos, su selectividad se puede ver limitada por la retención de diversos compuestos, lo cuales pueden generar una reacción cruzada con los anticuerpos (Brenn-Struckhoff et al. 2007). En el presente estudio la detección de FBs se realizó inicialmente por FLR, purificando previamente con CIA para después analizar estas muestras utilizando UPLC. Al analizar la recuperación de FBs en muestras de forraje henificado donde no se detectó la presencia de la toxina por medio de FLR, y que fueron contaminadas artificialmente, se obtuvieron valores de recuperación de ~85%, lo que difiere con otros estudios (Nichea et al. 2015) donde la recuperación fue de $59.8 \pm 8.1\%$. Esto representa un valor cercano a las recuperaciones encontradas por Yu et al. (1999), sin embargo, las recuperaciones obtenidas en el presente estudio fue mediante la adición de estándares de FBs a los extractos de las muestras, práctica mencionada por otros autores (Kim et al. 2002), ya que al igual que en estudios previos (Scott et al. 1999) al contaminar la matriz directamente no se obtuvo una adecuada recuperación de FBs detectable, probablemente debido a la naturaleza de las interacciones con la matriz.

Una de las principales características de la matriz, es que esta es el resultado del sometimiento de las muestras a varios procesos que tienen como fin el poder extraer por diversos métodos la mayor cantidad del compuesto de interés, en este caso las FBs, por lo cual, sus características estructurales y químicas serán diferentes al interactuar con las FBs antes y después del procesamiento. El resultado final del procesamiento de la muestra es un polvo fino con un tamaño de partícula $<1\text{mm}$, por consiguiente, aún que la composición química inicial pueda llegar a ser la misma, su composición estructural y la homogeneidad de sus componentes es diferente. Debido a esto, la interacción entre los grupos funcionales de la estructura química de las FBs y diversos compuestos de la matriz que antes interactuaban en menor proporción con la toxina, se dará con una mayor facilidad, lo cual se podría relacionar con la no detección de FBs que interactúan con estos componentes de matriz (Scott et al. 1999; Vanhoutte et al. 2016). Al tener este precedente, se puede especular que una posible causa de la no detección de FBs por UPLC en muestras con concentraciones de FBs iguales o mayores a $5\ \mu\text{g/g}$ por FLR, pudo deberse a la interacción de las FBs con diversos componentes de la matriz. Sin embargo, en el presente estudio se lograron detectar concentraciones de hasta $16.75\ \mu\text{g/g}$ y recuperaciones de $\sim 85\%$ por FLR, así también recuperaciones de $\sim 58\%$ por UPLC al contaminar los extractos de la matriz con FBs, por lo cual se argumenta que, aún si los procedimientos de extracción y de purificación de FBs por medio de CIA llegaron a influir en la inadecuada detección por UPLC, estos no representaron un factor determinante. Esto plantea la suposición que debió haber otros factores involucrados en la no detección de FBs por UPLC en las muestras positivas por FLR.

La sobreestimación de concentraciones de FBs por FLR usando CIA puede llegar a ser común (Pestka et al. 1994; Abouzied et al. 1996; Kulisek & Hazebroek 2000; Karbancioglu-Guler & Heperkan 2009). En diversos estudios se mencionan argumentos que tratan de explicar el efecto de la utilización de AC sobre la concentración de FBs. En el trabajo realizado por Kulisek & Hazebroek (2000) en el que se utilizaron muestras contaminadas naturalmente y otras artificialmente contaminadas con FBs, las naturalmente contaminadas mostraron mayor concentración de FB_1 en ELISA que en HPLC, contrariamente de las contaminadas artificialmente que mostraron valores razonablemente

similares por ambos métodos. Los datos de ese estudio sugieren que existen compuestos en las muestras naturalmente contaminadas que generan una mayor detección de FBs por FLR y que están ausentes en material contaminado artificialmente, es probable que estos compuestos sean estructuralmente similares a FB₁. Esto concuerda con lo mencionado por otros estudios (Tejada-Simon et al. 1995; Abouzied et al. 1996) donde de igual manera se menciona que estos compuestos pueden ser detectados por ELISA pero no por LC, debido a que las FBs contienen un grupo amino (NH₂) funcional que puede interactuar o ser modificado con proteínas antes o durante la extracción, con lo cual, imposibilitaría la detección por medios cromatográficos que involucren la derivatización de FBs, ya que la formación del complejo FB-derivatizante utiliza primordialmente este grupo amino funcional para su unión. Se ha argumentado que otra posible explicación a este fenómeno, pueda ser que a nivel de campo se de una producción de precursores o metabolitos de FBs por *Fusarium spp* que generen una reacción cruzada al analizarse por ELISA, lo cual incrementaría la respuesta utilizando este método de cuantificación, particularmente en muestras con más contenido de FBs (Pestka et al. 1994).

Otra causa que pudiera explicar este hallazgo, tiene que ver con el periodo de análisis, ya que para la detección de FBs por UPLC transcurrieron de 3 a 10 meses en almacenamiento, mientras que para la detección de FBs por FLR las muestras se procesaron en un periodo de no más de 72 horas. Esto representa más tiempo de contacto entre las FBs y diversos componentes del alimento, lo cual plantea que pudo haber ocurrido una unión o la posibilidad de que las FBs hayan sido degradadas. Debido a esto, después de 10 meses, se decidió reanalizar por FLR la concentración de la muestra donde se detectó mayor cantidad de FBs (16.75 µg/g) y que fue tomada en la primera etapa del estudio, encontrando una concentración de 2.47 ± 0.82 µg/g, esto es una reducción de la concentración inicial de un 85% durante el almacenamiento.

Otros factores a considerar aparte de la probable interacción con la matriz, la degradación de la toxina durante el almacenaje y la inespecificidad de las CIA, son el tipo de solventes utilizados para la extracción. Kim et al. (2002) comparó la eficacia de diversas mezclas de solventes, incluyendo Na₂EDTA con solventes orgánicos (metanol,

acetonitrilo) y la inclusión de enzimas como α -amilasa y β -glucosidasa, observando que las mejores recuperaciones (50%) se alcanzaron con la utilización de 0.1 M Na₂EDTA. En otros estudios se han utilizado diferentes concentraciones y combinaciones de solventes como metanol, acetonitrilo, ácido acético y agua (Abramović et al. 2005; Ndube et al. 2011; Kong et al. 2012; Petrarca et al. 2014), así como solo agua destilada con solución PBS (Jakšić et al. 2015), lo cual representa una amplia gama de diferentes solventes que se pueden utilizar para la extracción. Los más utilizados generalmente son metanol/agua en proporción variable y mezclados ya sea en licuadora o en agitador orbital. En nuestro estudio, no creemos que los solventes tuvieron un efecto ya que se usaron los mismos para ambos métodos (FLR y UPLC).

4.4. Estabilidad de FBs

Como se menciona en secciones anteriores, las FBs son un compuesto químico que tiene la capacidad de interactuar con otros componentes de matriz por medio de su grupo NH₂ terminal o sus cadenas laterales tricarboxílicas, lo cual puede tener una gran influencia en su estabilidad, detección y cuantificación.

En componentes acuosos, se ha demostrado que las FBs son estables a altas temperaturas. En un estudio realizado por Bryła et al. (2017) se midió la estabilidad de FBs a altas temperaturas y diferentes pH en un medio de masa de maíz, observando que eran aparentemente estables incluso a temperaturas de 250 °C, a esa temperatura la concentración de FB₁ no cambió por más de ~40%, apareciendo a altas temperaturas fumonisina B₁ hidrolizada (HFB₁), lo cual sugiere que primeramente hay una remoción de los ácidos tricarboxílicos laterales y posteriormente una desintegración de HFB₁. Esto también se menciona en otros estudios (Jackson et al. 1996) donde se observó una degradación a 175 °C sin importar el pH, predominando la presencia de productos hidrolizados de FB₁, lo cual sugiere que bajo condiciones de contenido acuoso, la FB₁ sufre una transformación diferente que en sistemas secos. Esto concuerda con lo observado en ensilajes, donde bajos porcentajes de materia seca junto con largos periodos de almacenaje redujeron drásticamente el contenido de FBs hasta en un 90%, pero contrasta con los

resultados obtenidos en un estudio similar (Latorre et al. 2015), donde el tiempo de almacenaje no afectó el contenido de FBs.

Aun así, estas investigaciones no reflejan adecuadamente lo encontrado en el presente estudio, debido a que la matriz no fue un componente acuoso y la temperatura no sobrepasó los 35 °C. La matriz seca tiene características diferentes a la acuosa, por lo cual la interacción con las FBs puede llegar a ser distinta. En un estudio realizado por Broggi et al. (2002), se midió la distribución de FB₁ en las diferentes fracciones de maíz seco molido, encontrando mayor concentración de FB₁ en las fracciones de maíz entero y germen con salvado, las cuales incluyen partes externas de la semilla. Por el contrario, en las fracciones como la harina de maíz y sémola de maíz, se encontraron menores cantidades de FBs de hasta 29 veces de diferencia. Tomando en cuenta que las muestras de ese estudio tenían almacenadas entre 15 días a 8 meses, es difícil deducir si el tiempo de almacenaje jugó un papel determinante en la concentración final de FBs en las diferentes partes del maíz procesado, sin embargo, se sabe que las FBs en presencia de diferentes compuestos como proteínas o azúcares de matriz puede formar compuestos estables (Humpf & Voss 2004), entre los cuales están los compuestos N-acetilados. Estos involucran la interacción de grupo amino (NH₂) terminal de las FBs con otras moléculas, así también con las cadenas laterales de ácidos tricarbónicos (Seefelder et al. 2003), lo cual en el caso de los compuestos N-acetilados impediría la unión del compuesto NDA-NaCN al grupo amino de las FBs, por lo cual no se detectaría en UPLC. En ambos casos, el problema de la detección de estos compuestos formados por la unión con componentes de la matriz radica en la recolección de FBs con CIA (Scott 2012), debido a que el cambio en la composición de la molécula puede generar interferencia en la adecuada unión antígeno-anticuerpo por lo cual no serían atrapadas en la columna. Este tipo de unión se ha observado en diferentes matrices a temperatura ambiente, las cuales incluyen harina de maíz, harina de arroz y fécula de maíz (Scott et al. 1999; Broggi et al. 2002; Scott 2012). En la investigación realizada por Kim et al. (2002) se menciona que las FBs son inestables al ser añadidas a harina de arroz blanco (Tailandés), desapareciendo totalmente después de 10 hrs a temperatura ambiente, lo cual contrasta con lo observado en el mismo estudio pero con otra variedad de harina de arroz blanco (Reino Unido), en la cual se obtuvieron

recuperaciones de entre 90 y 100% iniciales, siendo más estable incluso después de 60 días y donde se detectó que un 10% aprox. aún permanecía. Ellos sugieren que el tamaño de partícula más grande de la harina de arroz blanco de Reino Unido a diferencia del fino polvo de la variedad Thai, tiene un efecto en la estabilidad de las FBs, lo cual concuerda con lo encontrado por Broggi et al. (2002) en harina de maíz, pero difiere de lo encontrado en sémola de maíz, ya que tiene un tamaño de partícula más grande que el de la harina, sin embargo es donde se encontraron las concentraciones más bajas de FBs. Esto se puede deber a que las partes exteriores predispuestas a colonización por hongos y donde se encontró mayor concentración de FBs es separada de las otras fracciones. Esto es algo que se ha observado en otros estudios donde las partes más externas como el salvado y el germen son las fracciones que tienen más concentración de FBs, a diferencia de la sémola y harina con menor concentración (Bullerman & Bianchini 2007). Esto también se puede relacionar con la presencia de poca concentración de FBs en el germen durante la molienda en agua, debido a la naturaleza hidrosoluble de las FBs (Humpf & Voss 2004).

Adicionalmente, se ha demostrado que las FBs pueden interactuar con componentes orgánicos como la glucosa (Poling et al. 2002). En estos estudios se muestra que el grupo NH_2 de las FBs es substituido por el grupo *N*-(1-deoxy-D-fructos-1-yl) y se forma *N*-(1-deoxy-D-fructos-1-yl)-FB₁ como el producto estable inicial de la interacción entre FB₁ y glucosa. En estudios anteriores se plantea la posibilidad de esta reacción en diversas matrices (Scott et al. 1999), lo cual también es mencionado por Bullerman & Bianchini (2007) como una explicación de la poca o nula recuperación de FBs en diversas matrices bajo diferentes condiciones, incluso a temperaturas ambiente de 35 °C. Desde otra perspectiva, las FBs aparte de poder unirse a diversos compuestos de matriz, pueden cursar por un proceso de degradación por microorganismos (Vanhoutte et al. 2016), los cuales pueden remover el grupo NH_2 terminal, así como las cadenas tricarboxílicas laterales, por lo tanto impidiendo la unión a los anticuerpos de la CIA o la unión del complejo NDA-NaCN en el proceso de derivatización, resultando ambas en la no detección de estos compuestos.

4.5. Ocurrencia de FBs

La temperatura y humedad son factores que influyen de manera importante en el grado de contaminación por FBs en alimentos. Las temperaturas y valores de humedad que se observaron a lo largo del estudio fueron variables dependiendo principalmente de factores climatológicos. La contaminación por FBs es más probable durante la cosecha y el secado en el proceso de henificación (Mylona et al. 2012; Vieira Queiroz et al. 2012; Pitt et al. 2013; Taffarel et al. 2013; Cao et al. 2014; Santiago et al. 2015). Estos periodos están altamente influenciados por la temperatura y humedad, por lo cual, para representar más adecuadamente el periodo que influyó en la contaminación con FBs, se tomaron en cuenta la temperatura y precipitación pluvial de los meses anteriores a la fecha en que se realizó la toma de muestras, contemplando que el promedio de tiempo de corte en la zona noreste del país es de 35 días (Santillano Cazares 2003) y añadiendo el tiempo variable de secado del pasto en el proceso de henificación.

Las mayores temperaturas se presentaron durante verano y primavera, siendo de 30.4 y 32.4 °C respectivamente, pero contemplando los meses anteriores que representan procesos de henificación previos al almacenaje, las temperaturas promedio mayores corresponden a los periodos de verano y otoño con 28.3 y 25.4 °C (Tabla 2).

Se observó que el periodo donde se presentó mayor cantidad de FBs corresponde al mismo periodo donde se presentó la mayor temperatura promedio. Como se ha mencionado antes, la producción de estas toxinas está regulada por factores que estresan al hongo como altas temperaturas o desecación, por lo cual se podría pensar que la temperatura en el periodo de verano y meses anteriores favoreció la contaminación con FBs en el forraje. El periodo con las temperaturas más bajas (invierno) fue el segundo periodo con más presentación de FBs, por lo cual la temperatura no fue un factor que favoreciera el desarrollo de micotoxinas, aun así, en este periodo la precipitación pluvial decreció en un ~67% comparado con otoño que fue el periodo con la media de precipitación pluvial más alta, lo cual pudiera afectar el contenido de FBs final. En cuanto al periodo de primavera, la temperatura fue incrementando hasta llegar a 22.9 °C y aún que la precipitación pluvial fue la menor, este periodo se caracteriza por tener cierta estabilidad

en temperatura y porcentaje de humedad, por lo cual no sería extraño que favoreciera el desarrollo fúngico, el cual al ser afectado por el cambio en temperatura y humedad del siguiente periodo (verano) pudiera favorecer la presencia de FBs en el forraje.

4.5.1. Durante el cultivo

Aún que ya es conocida la relevancia que tienen factores climáticos específicos como altas temperaturas durante el afloramiento en la ocurrencia de FBs, la infección por *Fusarium spp.* y contaminación con estas micotoxinas puede verse afectada de diversas maneras, dependiendo del clima local, presión, especies de insectos que afectan a los cultivos, localización geográfica, entre otras. Cao et al. (2014) mencionan en un estudio, que dentro de los factores en donde se encontró una correlación positiva más alta con la ocurrencia de FBs, se encuentran el daño causado a la planta por insectos y la temperatura durante la floración, favoreciendo la contaminación en los días con temperaturas por encima de 30 °C. Esto difiere con los resultados de otro estudio realizado por Santiago et al. (2015), en donde se encontraron las más bajas concentraciones de FBs durante la floración en los años más secos y cálidos. Aun así, lo reportado por nosotros y lo encontrado por Huerta-Treviño et al. (2016), pudiera tener cierta relación con lo antes mencionado, debido a que la temperatura del periodo analizado en su estudio fue menor, comparada con lo observado por nosotros, y de igual manera, la concentración de FBs reportada por ellos fue menor, en comparación con lo que se encontró en el presente estudio.

El retardo en el secado de la cosecha por diversos factores como la lluvia, impide el rápido secado del forraje y favorece la contaminación con FBs, esto también es mencionado por Pitt et al. (2013). En el presente estudio, se encontró un patrón de presentación estacional de FBs (Figura 17), donde esta presencia es mayor en verano, decrece en otoño, aumenta de nuevo en invierno y vuelve a decrecer en primavera. Aunque no se pudo determinar la procedencia de todo el forraje henificado, ya que muchos se compraban a distribuidoras y resultó complicado establecer una trazabilidad de ese alimento, se puede observar que independientemente de la procedencia o lugar de almacenaje, la presentación de FBs está altamente influenciada por la temporada

estacional, lo cual se podría relacionar con lo antes mencionado, donde la contaminación por FBs en el forraje se da principalmente en la etapa de cultivo, siendo el periodo de secado un momento crítico en el desarrollo de FBs (Pitt et al. 2013).

La contaminación por *F. verticillioides* y FBs predomina en regiones más calientes y secas (Santiago et al. 2015), sin embargo no hay una relación directa entre climas secos, temperatura y el grado de contaminación por FBs en diversos medios ambientes. Además de la variación geográfica en la presencia de contaminación y ocurrencia de *F. verticillioides* y FBs, esta también puede variar de gran manera entre diversos años. En lo mencionado por Eugenia de la Torre-Hernández et al. (2014) en un trabajo que habla sobre la contaminación de maíz con *F. verticillioides*, se menciona que la producción de FBs por distintas cepas es muy variable y los rangos pueden abarcar hasta tres órdenes de magnitud, sin importar que las cepas crezcan bajo las mismas condiciones en un sustrato natural como el maíz, por lo cual, es de suponer que las características climáticas generales no pueden explicar satisfactoriamente las diferencias en la contaminación por FBs entre diversos tipos de medio ambiente. Debido a esto se han realizado estudios donde se ha tratado de establecer modelos estadísticos para tratar de predecir el grado de contaminación que se puede presentar bajo diferentes condiciones. La mayoría de estos estudios se ha realizado en Italia (Cao et al. 2014; Santiago et al. 2015), en los cuales generalmente se involucra la generación de modelos de regresión incluyendo diversos factores como climáticos, genéticos (tanto de cepas de hongo como de plantas), infestación por insectos y otros factores relacionados con las características de cultivo en esa área geográfica, dentro de los cuales los patrones meteorológicos a través de las estaciones, insectos, diversidad fúngica y las prácticas culturales han sido identificados como factores determinantes para el contenido final de FBs en granos de maíz. Es de suponer que lo encontrado en el presente estudio pueda seguir alguno de los patrones antes mencionado.

4.5.2. En almacenaje

En este trabajo, se observó una tendencia de carácter inversamente proporcional entre la concentración-presentación de FBs y el tiempo que el forraje henificado permaneció almacenado (Figura 18), lo cual contrasta con los hallazgos encontrados en este mismo estudio, donde las características de almacenaje en los diversos centros hípicas no fueron adecuadas (Chávez Vásquez 2010; Coblenz et al. 2013). A pesar de que es comúnmente conocido que las condiciones de almacenaje no determinan la presencia de FBs en el alimento (Vieira Queiroz et al. 2012; Pitt et al. 2013; Taffarel et al. 2013), al presentarse concentraciones de FBs variables en las diversas estaciones y en los diversos centros hípicas, se puede argumentar que los factores medioambientales determinados por las características del almacenaje pueden llegar a afectar el contenido final de FBs en el alimento. En estudios previos se ha mencionado que la cantidad de micotoxinas puede decrecer durante el periodo de almacenamiento (Rohweder et al. 2011), lo cual también es mencionado por Orsi et al. (2000), donde se estudió la estabilidad de *Fusarium spp.* y FBs en granos de maíz almacenados durante un periodo de 140 días, en este estudio se observó una disminución de UFC junto con una tendencia a la disminución por igual de FBs, aún que los valores de estas últimas presentaron una variabilidad dependiendo del tipo de maíz. En investigaciones mencionadas previamente (Vieira Queiroz et al. 2012; Pitt et al. 2013) se hace referencia a que normalmente bajo condiciones de almacenaje no haya producción de FBs, incluso con un incremento en la cantidad de humedad, esto debido a la competencia con otros microorganismos, lo cual previene cualquier incremento significativo en el contenido de FBs. Por otro lado, hay una discrepancia con lo expuesto en otros trabajos donde se evaluó la relación entre factores ambientales, pérdida de materia seca y la concentración de micotoxinas en trigo y maíz almacenado por 10 días a diferentes temperaturas de hasta 30 °C (Mylona et al. 2012), aquí se menciona que hubo una correlación positiva altamente significativa entre la pérdida de materia seca y la concentración de FBs en maíz almacenado, llegando a detectar concentraciones hasta por arriba de 4 µg/g, de esta manera demostrando que la contaminación por FBs no solo se puede dar a nivel de campo.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIÓN

La ocurrencia de FBs fue variable a lo largo del estudio, por lo cual los equinos en el área metropolitana de Monterrey son susceptibles a consumir este alimento contaminado por lo menos en un periodo anual. Debido a esto es recomendable contemplar ELEM como diagnóstico diferencial en casos de problemas locomotores relacionados a una falla del SNC y que esté asociado a la detección de FBs en el alimento. Por otra parte, ya que hay diferentes factores que pueden afectar la presencia de FBs en el forraje henificado, principalmente factores climáticos o factores influenciados por el clima, es primordial realizar estudios que evalúen cuales pueden llegar a ser los que influyeran en mayor grado en el desarrollo y ocurrencia de las micotoxinas en general, así como a los diversos aspectos que involucra la presencia de FBs en el forraje henificado.

Por una parte, el mejoramiento en los métodos y tecnología para la detección de estos compuestos es primordial para poder evaluar adecuadamente diversos aspectos que envuelve la presencia de FBs en el alimento, como el riesgo de exposición, predisposición de ocurrencia y patrones de presentación. Actualmente, los métodos y tecnología disponibles son una herramienta eficaz y precisa para la detección de FBs, sin embargo, esto depende en gran parte del tipo de sistema en el cual se pretendan detectar, debido a que como se ha mostrado en diversos estudios, la sensibilidad y precisión es altamente variable en métodos que involucran la utilización de anticuerpos, ya que estos dependen ampliamente de la integridad molecular de las FBs para su adecuada interacción, esto es, que las FBs al interactuar con componentes de la matriz pueden formar enlaces con sus grupos funcionales, lo cual como mencionan diversos autores, imposibilitaría su detección al no contar con la estructura específica para la cual los anticuerpos están diseñados. Debido a esto, metodologías de purificación para FBs como SAX, seguido de su detección

por medio de UPLC representan una alternativa adecuada, invariablemente si se está contemplando someter a la toxina a un proceso de derivatización o detectarla por otros métodos. Por otra parte, hay múltiples investigaciones donde se ha utilizado UPLC-MS, la cual representa la opción a elegir para la detección de FBs y diversos compuestos, ya que este método cuenta con una alta sensibilidad y precisión, lo cual lleva a la minimización de errores en la cuantificación de estas toxinas, sin embargo, esta tecnología no está disponible para todas las investigaciones que pretenden detectar y cuantificar componentes específicos en el alimento, debido a su alto costo y a que se requiere personal capacitado para su operación. Por esta razón es imperativo enfocar investigaciones al desarrollo y mejoramiento de metodologías más sensibles para la detección de estos compuestos químicos, contemplando su accesibilidad económica.

Otro aspecto a considerar, es la capacidad de poder revertir la contaminación por estas toxinas. Existe una amplia línea de investigación que enfoca sus estudios en el mejoramiento de la calidad alimentaria por medio de la utilización de diversos métodos para poder revertir esta contaminación, siendo investigados varios compuestos adsorbentes de micotoxinas, así como procesos físicos y químicos que disminuyan su concentración, por lo cual, la investigación de estrategias para revertir la contaminación por FBs es un área en la que se pueden realizar grandes avances científicos para el mejoramiento de la calidad alimentaria.

Por otra parte, la mayoría de los estudios sin importar el área de enfoque, está basado en la suposición de que la ocurrencia y efecto de las FBs es dada generalmente por las formas de FBs que comúnmente se encuentran en algunos alimentos, sin embargo, hay poca investigación científica que aborde el efecto que pueden tener las micotoxinas ligadas, lo cual representa una problemática, ya que al presentarse un enlace con diversos componentes de la matriz es difícil poder detectarlas por cualquier método utilizado comúnmente. Esto es importante, ya que si se considera que a nivel gastrointestinal estos enlaces pueden romperse dejando la forma libre de la toxina, se estaría incurriendo en un error en la cuantificación del total de componentes que pudieran generar efectos adversos en los organismos. Debido a esto y a los aspectos antes mencionados, los esfuerzos en

investigación deben enfocarse en varias áreas que tienen como finalidad mejorar la calidad alimentaria y consecuentemente la salud. Para lograr este objetivo, se requiere inicialmente un mejoramiento en leyes que regulen la ocurrencia de micotoxinas.

5.1. Legislación

La presencia de FBs en el alimento puede ser causada por diversos factores, por lo cual es imperativo mejorar la vigilancia toxicológica no solo de esta toxina, si no de las micotoxinas en general. El no conocer las concentraciones de toxinas a las que los equinos y otros organismos vivos están expuestos, puede repercutir directamente en su salud o directamente en pérdidas económicas por variadas índoles. En el año 2000, la asamblea de las naciones unidas (ONU) estableció las Metas de Desarrollo del Milenio (MDGs), tras analizar las áreas en las que la sociedad humana debe enfocar esfuerzos para tener una mejor calidad de vida, sin embargo tubo una fuerte crítica al no fundamentar con bases científicas el establecimiento de estas áreas a mejorar, ya que no se contemplaron aspectos importantes que aseguraran el mejoramiento de estas mismas. Seguido de este acontecimiento, en el 2002 la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (IARC) incluyó a la FB₁ dentro del grupo 2B (posiblemente carcinogénico para humanos), lo cual representó un avance en la promoción de legislatura adecuada que permitiría desviar recursos y poder de esta manera enfocar esfuerzos en las áreas de investigación antes mencionadas, lo cual se relaciona con el incremento en la generación de conocimiento sobre estas toxinas naturales a lo largo de los siguientes años. En el 2016 la ONU remplace las MDGs por las Metas de Desarrollo Sustentable (SDGs), redefiniendo las áreas donde se deben priorizar esfuerzos que permitan mejorar la calidad de vida. Una de estas 17 metas a alcanzar para el 2030, es poder conseguir una adecuada seguridad alimentaria, esto representa una gran iniciativa que pretende enfocar recursos en el cumplimiento de esta meta, lo que se resume en el incremento de investigación científica en esta área para poder alcanzar esta meta de una manera eficaz y apropiada. A pesar de lo anteriormente mencionado, en México no existe una ley que regule el riesgo de exposición que pueden tener diversos organismos incluyendo a los equinos y al humano, a estos contaminantes naturales en el alimento, lo cual resulta alarmante ya que a pesar de que se tiene evidencia

científica relevante sobre los efectos nocivos del consumo de estas toxinas naturales, no se priorizan esfuerzos para reducir su ocurrencia, por lo cual, basadas en los aspectos que anteriormente se mencionaron, a continuación se presentan algunas recomendaciones en donde se deben enfocar recursos en investigación.

5.2. Recomendaciones

5.2.1. La interferencia de la matriz en la detección de FBs es un factor que debe ser considerado para la adecuada cuantificación de estas toxinas en el alimento, por lo cual mejoras en los métodos de extracción, como la utilización de EDTA para reducir la interferencia de compuestos relacionados con la matriz (Kim et al. 2004) deben ser investigados ampliamente.

5.2.2. Es sabido que las especies de *Fusarium spp.* no crecen por debajo de 0.9 en actividad de agua, por lo cual es recomendable el secado rápido del pasto, solo en las etapas iniciales de este (Pitt et al. 2013), reduciendo el contenido de humedad y evitando así la presentación de concentraciones altas de FBs.

5.2.3. Prestar atención a dos periodos críticos: la floración y el secado, ya que se sabe que altas temperaturas durante la floración favorecen la contaminación por FBs, mientras que durante el secado es recomendable hacerlo a temperaturas altas para disminuir el tiempo de secado inicial. También se ha observado que cosechas tempranas tienen menos riesgo de contaminación por FBs (Cao et al. 2014).

5.2.4. La mejor manera de reducir o prevenir la contaminación por FBs, es la limitación de su biosíntesis durante el cultivo, aún que es mencionado por Santiago et al. (2015) en estudios hechos en maíz, esto mismo se puede aplicar al forraje. Identificando los factores y genes asociados a la resistencia contra la infección por *Fusarium spp.* y FBs ayudaría a entender los mecanismos genéticos que controlan esta resistencia y facilita la selección de características genéticas deseadas para el cultivo de pastos.

5.2.5. En estudios previos se menciona que el amonio reprime la producción de FBs, lo cual se puede considerar para su utilización como fuente de nitrógeno. La relación entre C:N también se debe considerar, ya que si esta es baja se ha observado una inhibición de la producción de FBs (Eugenia de la Torre-Hernández et al. 2014).

El propósito de este tipo de estudios (incluyendo al presente) es incrementar el conocimiento sobre la ocurrencia de diversos xenobióticos nocivos para la salud que se encuentran presentes de manera natural en el alimento, por lo cual esperamos que los datos generados en esta investigación puedan ser utilizados para la promoción y el mejoramiento de las leyes bajo las cuales se rige la producción de forrajes en México, así como para la optimización del sistema de vigilancia toxicológica en alimentos, de una manera adecuada, funcional y que estimule la generación de conocimiento relevante que permita mejorar la salud en general.

REFERENCIAS

- Abouzieid MM, Hart LP, Pestka JJ, Azcona-Olivera JI (1996) Detection of fumonisins in Fusarium cultures, corn, and corn products by polyclonal antibody-based ELISA : relation to fumonisin B1 detection by liquid chromatography. *J Food Prot* 59:645–651.
- Abramović BF, Jakšić SM, Mašić ZS (2005) Liquid Chromatographic determination of fumonisins B 1 and B 2 in corn samples after reusable immunoaffinity column clean-up. *J Serbian Chem Soc* 70:899–910. doi: 10.2298/JSC0506899A
- Améndola R, Castillo E, Martínez P (2005) Perfiles por País del Recurso Pastura/Forraje MÉXICO. In: FAO. <http://www.fao.org/ag/agp/agpc/doc/pasture/forage.htm>.
- Bennett GA, Richard JL (1994) Liquid chromatographic method for analysis of the naphthalene dicarboxaldehyde derivative of fumonisins. *J AOAC Int* 77:501–506.
- Brenn-Struckhova Z, Cichna-Markl M, Böhm C, Razzazi-Fazeli E (2007) Selective sample cleanup by reusable sol-gel immunoaffinity columns for determination of deoxynivalenol in food and feed samples. *Anal Chem* 79:710–717. doi: 10.1021/ac061672w
- Broggi LE, Resnik SL, Pacina M, et al (2002) Distribution of fumonisins in dry-milled corn fractions in Argentina. *Food Addit Contam* 19:465–469. doi: 10.1080/02652030110103484
- Brown KA, Mays T, Romoser A, et al (2014) Modified hydra bioassay to evaluate the toxicity of multiple mycotoxins and predict the detoxification efficacy of a clay-based sorbent. *J Appl Toxicol* 34:40–48. doi: 10.1002/jat.2824
- Bryła M, Waśkiewicz A, Szymczyk K, Jędrzejczak R (2017) Effects of pH and temperature on the stability of fumonisins in Maize products. *Toxins (Basel)* 9:1–16. doi: 10.3390/toxins9030088
- Buckley T, Creighton A, Fogarty U (2007) Analysis of Canadian and Irish forage, oats and commercially available equine concentrate feed for pathogenic fungi and mycotoxins. In: *Ir Vet J*. pp 231–236
- Bullerman LB, Bianchini A (2007) Stability of mycotoxins during food processing. *Int J Food Microbiol* 119:140–146. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.035

- Caloni F, Cortinovis C (2010) Effects of fusariotoxins in the equine species. *Vet J* 186:157–161. doi: 10.1016/j.tvjl.2009.09.020
- Cao A, Santiago R, Ramos AJ, et al (2014) Critical environmental and genotypic factors for *Fusarium verticillioides* infection, fungal growth and fumonisin contamination in maize grown in northwestern Spain. *Int J Food Microbiol* 177:63–71. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.02.004
- Chávez Vásquez MA (2010) Definición de parámetros ideales para el almacenamiento y preservación de pacas de heno bajo condiciones naturales para la disponibilidad de un buen alimento para el ganado.
- Chehri K, Jahromi ST, Reddy KRN, et al (2010) Occurrence of *Fusarium* spp. and fumonisins in stored wheat grains marketed in Iran. *Toxins (Basel)* 2:2816–2823. doi: 10.3390/toxins2122816
- Coblentz WK, Coffey KP, Young AN, Bertram MG (2013) Storage characteristics, nutritive value, energy content, and in vivo digestibility of moist, large rectangular bales of alfalfa-orchardgrass hay treated with a propionic acid-based preservative. *J Dairy Sci* 96:2521–2535. doi: 10.3168/jds.2012-6145
- Domijan A-M, Abramov AY (2011) Fumonisin B1 inhibits mitochondrial respiration and deregulates calcium homeostasis—Implication to mechanism of cell toxicity. *Int J Biochem Cell Biol* 43:897–904. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2011.03.003>
- Duncan K, Kruger S, Zabe N, et al (2004) Improved fluorometric and chromatographic methods for the quantification of fumonisins B1, B2 and B3. *Methods* 815:196–200. doi: 10.1021/jf034934t
- Eugenia 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. *TIP* 17:77–91. doi: 10.1016/S1405-888X(14)70321-3
- Fodor J, Balogh K, Weber M, et al (2008) Absorption, distribution and elimination of fumonisin B(1) metabolites in weaned piglets. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* 25:88–96. doi: 10.1080/02652030701546180
- Foreman JH, Constable PD, Waggoner AL, et al (2004) Neurologic abnormalities and cerebrospinal fluid changes in horses administered fumonisin B1 intravenously. *J Vet Intern Med* 18:223–30. doi: 10.1892/0891-6640(2004)18<223:NAACFC>2.0.CO;2

- Gallo A, Giuberti G, Frisvad JC, et al (2015) Review on mycotoxin issues in ruminants: Occurrence in forages, effects of mycotoxin ingestion on health status and animal performance and practical strategies to counteract their negative effects. *Toxins (Basel)* 7:3057–3111. doi: 10.3390/toxins7083057
- Golinski P, Opitz Von Boberfeld W, Kostecki M, et al (2006) Accumulation of secondary metabolites formed by field fungi in autumn-saved herbage. *J Agron Crop Sci* 192:344–351. doi: 10.1111/j.1439-037X.2006.00221.x
- Han Z, Ren Y, Liu X, et al (2010) A reliable isotope dilution method for simultaneous determination of fumonisins B1, B2 and B3 in traditional Chinese medicines by ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Sep Sci* 33:2723–2733. doi: 10.1002/jssc.201000423
- Hla T, Dannenberg AJ (2012) Sphingolipid signaling in metabolic disorders. *Cell Metab* 16:420–434. doi: 10.1016/j.cmet.2012.06.017
- Hoffman CJ, Costa LR, Freeman LM (2009) Survey of Feeding Practices, Supplement Use, and Knowledge of Equine Nutrition among a Subpopulation of Horse Owners in New England. *J Equine Vet Sci* 29:719–726. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jevs.2009.08.005>
- Huerta-Treviño A, Dávila-Aviña JE, Sánchez E, et al (2016) Occurrence of mycotoxins in alfalfa (*Medicago sativa* L.), sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench], and grass (*Cenchrus ciliaris* L.) retailed in the state of Nuevo León, México.
- Humpf HU, Voss KA (2004) Effects of thermal food processing on the chemical structure and toxicity of fumonisin mycotoxins. *Mol Nutr Food Res* 48:255–269. doi: 10.1002/mnfr.200400033
- Jackson LS, Hlywka JJ, Senthil KR, et al (1996) Effects of Time, Temperature, and pH on the Stability of Fumonisin B 1 in an Aqueous Model System. *J Agric Food Chem* 44:906–912. doi: 10.1021/jf950364o
- Jakšić S, Živkov-Baloš M, Mihaljev Ž, et al (2015) Extraction without Organic Solvents in the Determination of Fumonisins B1, B2, and B3 in Maize by HPLC–FLD and ELISA Tests. *Food Anal Methods* 8:1446–1455. doi: 10.1007/s12161-014-0030-5

- Karbancioglu-Guler F, Heperkan D (2009) Comparison of enzyme linked immunoassay and high performance liquid chromatography for determination of fumonisin in dried figs. *Matica Srp Libr Proc Nat Sci* 37–43.
- Karimi G, Mehri S (2015) Current Insights into Mycotoxins. In: Gopalakrishnakone P, Balali-Mood M, Llewellyn L, Singh BR (eds) *Biological Toxins and Bioterrorism*. Springer Netherlands, pp 61–77
- Khayoon WS, Saad B, Salleh B, et al (2010) A reversed phase high performance liquid chromatography method for the determination of fumonisins B1 and B2 in food and feed using monolithic column and positive confirmation by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Anal Chim Acta* 679:91–97. doi: 10.1016/j.aca.2010.09.008
- Kim E-K, Maragos CM, Kendra DF (2004) Liquid Chromatographic Determination of Fumonisin B1, B2, and B3 in Corn Silage. *J Agric Food Chem* 52:196–200.
- Kim EK, Scott PM, Lau BPY, Lewis DA (2002) Extraction of fumonisins B1 and B2 from white rice flour and their stability in white rice flour, cornstarch, cornmeal, and glucose. *J Agric Food Chem* 50:3614–3620. doi: 10.1021/jf020058s
- Kong W, Xie T, Li J, et al (2012) Analysis of fumonisins B1 and B2 in spices and aromatic and medicinal herbs by HPLC-FLD with on-line post-column derivatization and positive confirmation by LC-MS/MS. *Analyst* 137:3166–3174. doi: 10.1039/c2an35164a
- Kulisek ES, Hazebroek JP (2000) Comparison of extraction buffers for the detection of fumonisin B1 in corn by immunoassay and high-performance liquid chromatography. *J Agric Food Chem* 48:65–69. doi: 10.1021/jf990696j
- Kwon O-S, Slikker Jr W, Davies DL (2000) Biochemical and morphological effects of fumonisin B1 on primary cultures of rat cerebrum. *Neurotoxicol Teratol* 22:565–572. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0892-0362\(00\)00082-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0892-0362(00)00082-9)
- Latorre A, Dagnac T, Fernández Lorenzo B, Llompart M (2015) Occurrence and stability of masked fumonisins in corn silage samples. *Food Chem* 189:38–44. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.10.156
- Liesener K, Curtui V, Dietrich R, et al (2010) Mycotoxins in horse feed. *Mycotoxin Res* 26:23–30. doi: 10.1007/s12550-009-0037-8

- Loiseau N, Polizzi A, Dupuy A, et al (2015) New insights into the organ-specific adverse effects of fumonisin B1: comparison between lung and liver. *Arch Toxicol* 89:1619–1629. doi: 10.1007/s00204-014-1323-6
- Ma L, Xu W, He X, et al (2013) Determination of fumonisins B1 and B2 in Chinese rice wine by HPLC using AQC precolumn derivatisation. *J Sci Food Agric* 93:1128–1133. doi: 10.1002/jsfa.5862
- Martins HML, Almeida IFM, Camacho CRL, et al (2012) Occurrence of fumonisins in feed for swine and horses. *Rev Iberoam Micol* 29:175–177. doi: 10.1016/j.riam.2011.07.005
- McDonough PM, Yasui K, Betto R, et al (1994) Control of cardiac Ca²⁺ levels. Inhibitory actions of sphingosine on Ca²⁺ transients and L-type Ca²⁺ channel conductance. *Circ Res* 75:981–989.
- Merrill AH, Sullards MC, Wang E, et al (2001) Sphingolipid metabolism: roles in signal transduction and disruption by fumonisins. *Environ Health Perspect* 109:283–289.
- Michelakis E, Tewari K, Simard JM (1994) Calcium channels in smooth muscle cells from cerebral precapillary arterioles activate at more negative potentials than those from basilar artery %U <http://dx.doi.org/10.1007/BF00388311>. *Pflügers Arch* 426:459–461. doi: 10.1007/bf00388311
- Mirocha CJ, Mackintosh CG, Mirza UA, et al (1992) Occurrence of fumonisin in forage grass in new zealand. *Appl Env Microbiol* 58:3196–3198.
- Muscarella M, Magro S Lo, Nardiello D, et al (2011) Determination of fumonisins B(1) and B(2) in maize food products by a new analytical method based on high-performance liquid chromatography and fluorimetric detection with post-column derivatization. *Methods Mol Biol* 739:187–194. doi: 10.1007/978-1-61779-102-4_16
- Mylona K, Sulyok M, Magan N (2012) Relationship between environmental factors, dry matter loss and mycotoxin levels in stored wheat and maize infected with *Fusarium* species. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* 29:1118–1128. doi: 10.1080/19440049.2012.672340

- Ndube N, van der Westhuizen L, Green IR, Shephard GS (2011) HPLC determination of fumonisin mycotoxins in maize: A comparative study of naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde and o-phthalaldehyde derivatization reagents for fluorescence and diode array detection. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci* 879:2239–2243. doi: 10.1016/j.jchromb.2011.06.007
- Nichea MJ, Palacios SA, Chiacchiera SM, et al (2015) Presence of multiple mycotoxins and other fungal metabolites in native grasses from a wetland ecosystem in Argentina intended for grazing cattle. *Toxins (Basel)* 7:3309–3329. doi: 10.3390/toxins7083309
- Orsi RB, Correia B, Possi CR, et al (2000) Mycoflora and occurrence of fumonisins in freshly harvested and stored hybrid maize. *J Stored Prod Res* 36:75–87. doi: 10.1016/S0022-474X(99)00029-6
- Pestka JJ, Azcona-Olivera JI, Plattner RD, et al (1994) Comparative assessment of fumonisin in grain-based foods by ELISA, GC-MS and HPLC. *J Food Prot* 57:169–172.
- Petrarca MH, Rodrigues MI, Rossi EA, De Sylos CM (2014) Optimisation of a sample preparation method for the determination of fumonisin B1 in rice. *Food Chem* 158:270–277. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.02.126
- Pitt JI, Taniwaki MH, Cole MB (2013) Mycotoxin production in major crops as influenced by growing, harvesting, storage and processing, with emphasis on the achievement of Food Safety Objectives. *Food Control* 32:205–215. doi: 10.1016/j.foodcont.2012.11.023
- Poling SM, Plattner RD, Weisleder D (2002) N - (1-Deoxy- D -fructos-1-yl) fumonisin B 1 , the initial reaction product of fumonisin B 1 and D -Glucose. *Agric food chem* 50:1318–1324.
- Prichard L, Barwick V (2003) Preparation of Calibration Curves A Guide to Best Practice Contact Point : Prepared by: Lgc 1–27.
- Putnam D (2007) Recommended Principles for Proper Hay Sampling. In: NFTA. http://www.foragetesting.org/index.php?page=exam_info2.

- Raymond SL, Heiskanen M, Smith TK, et al (2000) An investigation of the concentrations of selected *Fusarium* mycotoxins and the degree of mold contamination of field-dried hay. *J Equine Vet Sci* 20:616–621. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0737-0806\(00\)80403-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0737-0806(00)80403-7)
- Ren Y, Zhang Y, Han S, et al (2011) Simultaneous determination of fumonisins B1, B2 and B3 contaminants in maize by ultra high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Anal Chim Acta* 692:138–145. doi: 10.1016/j.aca.2011.03.005
- Riley RT, Showker JL, Owens DL, Ross PF (1997) Disruption of sphingolipid metabolism and induction of equine leukoencephalomalacia by *Fusarium proliferatum* culture material containing fumonisin B2 or B3. *Environ Toxicol Pharmacol* 3:221–228. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S1382-6689\(97\)00015-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1382-6689(97)00015-X)
- Robinson A, Johnson NM, Strey A, et al (2012) Calcium montmorillonite clay reduces urinary biomarkers of fumonisin B1 exposure in rats and humans. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* 76:211–220. doi: 10.1007/s11103-011-9767-z.Plastid
- Rohweder D, Valenta H, Sondermann S, et al (2011) Effect of different storage conditions on the mycotoxin contamination of *Fusarium culmorum*-infected and non-infected wheat straw. *Mycotoxin Res* 27:145–153. doi: 10.1007/s12550-011-0087-6
- Rosiles MR, Bautista J (1998) An Outbreak of Equine Leukoencephalomalacia at Oaxaca, Mexico, Associated with Fumonisin B1. 302:299–302.
- Ross PF, Ledet AE, Owens DL, et al (1993) Experimental equine leukoencephalomalacia, toxic hepatitis, and encephalopathy caused by corn naturally contaminated with fumonisins. *J Vet Diagn Invest* 5:69–74.
- Ryland LK, Fox TE, Liu X, et al (2011) Dysregulation of sphingolipid metabolism in cancer. *Cancer Biol Ther* 11:138–149.
- Saastamoinen MT, Hellämäki M (2012) Forage analyses as a base of feeding of horses. In: Saastamoinen M, Fradinho MJ, Santos AS, Miraglia N (eds) *Forages and grazing in horse nutrition*. Wageningen Academic Publishers, Wageningen %@ 978-90-8686-755-4, pp 305–314

- Samapundo S, De Meulenaer B, De Muer N, et al (2006) Influence of experimental parameters on the fluorescence response and recovery of the high-performance liquid chromatography analysis of fumonisin B1. *J Chromatogr A* 1109:312–316. doi: 10.1016/j.chroma.2006.02.003
- Santiago R, Cao A, Butrón A (2015) Genetic Factors Involved in Fumonisin Accumulation in Maize Kernels and Their Implications in Maize Agronomic Management and Breeding. In: Battilani P (ed) *Toxins* (Basel). pp 3267–3296
- Santillano Cazares J (2003) Respuesta del pasto Bermuda a la frecuencia y altura de cortes. Universidad Autónoma de Nuevo León
- Scott PM (2012) Recent research on fumonisins: a review. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* 29:242–8. doi: 10.1080/19440049.2010.546000
- Scott PM, Lawrence GA, Lombaert GA (1999) Studies on extraction of fumonisins from rice, corn-based foods and beans. *Mycotoxin Res* 15:50–60. doi: 10.1007/BF02945215
- Seefelder W, Knecht A, Humpf H-U (2003) Bound fumonisin B1: analysis of fumonisin-B1 glyco and amino acid conjugates by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *J Agric Food Chem* 51:5567–5573. doi: 10.1021/jf0344338
- Sequetin Cunha EM, do Carmo Custódio de Souza Hunold Lara M, Monteforte Cassaro Villalobos E, et al (2016) Causes of Encephalitis and Encephalopathy in Brazilian Equids. *J Equine Vet Sci* 38:8–13. doi: 10.1016/j.jevs.2016.01.002
- Shephard GS (2008) Determination of mycotoxins in human foods. *Chem Soc Rev* 37:2468–2477. doi: 10.1039/b713084h
- Skladanka J, Adam V, Dolezal P, et al (2013) How do grass species, season and ensiling influence mycotoxin content in forage? *Int J Environ Res Public Health* 10:6084–6095. doi: 10.3390/ijerph10116084
- Skladanka J, Nedelnik J, Adam V, et al (2011) Forage as a primary source of mycotoxins in animal diets. *Int J Env Res Public Heal* 8:37–50. doi: 10.3390/ijerph8010037
- Smith MC, Madec S, Coton E, Hymery N (2016) Natural Co-Occurrence of Mycotoxins in Foods and Feeds and Their in vitro Combined Toxicological Effects. *Toxins*

- (Basel). doi: 10.3390/toxins8040094
- Taffarel LE, Mesquita EE, Castagnara DD, et al (2013) Dehydration curve, fungi and mycotoxins in tifton 85 hay dehydrated in the field and in shed. *Rev Bras Zootec* 42:395–403. doi: 10.1590/S1516-35982013000600003
- Tejada-Simon MV, Pestka JJ, Marovatsanga LT (1995) Comparative detection of fumonisin by HPLC, ELISA and immunocytochemical localization in *Fusarium* cultures. *J Food Prot* 58:666–672.
- Turner NW, Bramhmbhatt H, Szabo-Vezse M, et al (2015) Analytical methods for determination of mycotoxins: An update (2009-2014). *Anal Chim Acta* 901:12–33. doi: 10.1016/j.aca.2015.10.013
- Vanhoutte I, Audenaert K, De Gelder L (2016) Biodegradation of mycotoxins: Tales from known and unexplored worlds. *Front Microbiol* 7:1–20. doi: 10.3389/fmicb.2016.00561
- Vendruscolo CP, Frias NC, de Carvalho CB, et al (2016) Leukoencephalomalacia Outbreak in Horses due to Consumption of Contaminated Hay. *J Vet Intern Med* 30:1879–1881. doi: 10.1111/jvim.14588
- Vicam® (Waters Co.) FumoniTest™ Fluorometer Instruction Manual.
- Vicam® (Waters Co.) (2004) FumoniTest™ and FumoniTest WB™ Instruction Manual.
- Vieira Queiroz VA, De Oliveira Alves GL, Pereira Da Conceição RR, et al (2012) Occurrence of fumonisins and zearalenone in maize stored in family farm in Minas Gerais, Brazil. *Food Control* 28:83–86. doi: 10.1016/j.foodcont.2012.04.039
- Voss KA, Smith GW, Haschek WM (2007) Fumonisin: Toxicokinetics, mechanism of action and toxicity. *Anim Feed Sci Technol* 137:299–325. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2007.06.007>
- Wang X, Wu Q, Wan D, et al (2016) Fumonisin: oxidative stress-mediated toxicity and metabolism in vivo and in vitro. *Arch Toxicol* 90:81–101. doi: 10.1007/s00204-015-1604-8
- Yu W, Yu F-Y, Undersander DJ, Chu FS (1999) Immunoassays of Selected Mycotoxins in Hay, Silage and Mixed Feed. *Food Agric Immunol* 11:307–319. doi: 10.1080/095401099999690

ANEXOS

Anexo 1. Hoja de evaluación para los lugares de almacenaje.

Clave del lugar muestreado: _____ Fecha de muestreo: _____

1. Cantidad aproximada de Pacas/Forraje (P/F) almacenados y medias (muestrales) de temperatura y % humedad

#	\bar{X} °C P/F	\bar{X} % Humedad P/F	\bar{X} °C Ambiental
---	------------------	-------------------------	------------------------

2. Tipo de forraje

--

3. Procedencia del forraje

Comprado	Cultivo propio	Región:
----------	----------------	---------

4. Disposición del forraje

Paca chica	Paca grande	Rollos	Granel
------------	-------------	--------	--------

5. Separación entre pacas (>5cm)

SI	NO
----	----

6. Separación entre las P/F y muros (>2.5 m)

Muy malo	Malo	Regular	Bueno	Muy bueno
----------	------	---------	-------	-----------

7. Separación de las pacas y suelo (20cm)

SI	NO
----	----

8. Apilamiento de pacas en columnas

SI	NO
----	----

9. Tiempo de almacenamiento de las pacas (actuales)

2 meses	3 meses	4 meses	5 meses	6 meses o más
---------	---------	---------	---------	---------------

10. Pacas visiblemente contaminadas por hongos

SI (% del lote):	NO
------------------	----

11. Condiciones del lugar de almacenamiento

- Ventilación del lugar de almacenamiento (espacios que permitan el flujo de aire)

Muy malo	Malo	Regular	Bueno	Muy bueno
----------	------	---------	-------	-----------

- Protección contra lluvia

Muy malo	Malo	Regular	Bueno	Muy bueno
----------	------	---------	-------	-----------

- Adecuado drenaje

Muy malo	Malo	Regular	Bueno	Muy bueno
----------	------	---------	-------	-----------

- Regulación de temperatura del lugar de almacenamiento (utilización de termostatos)

Muy malo	Malo	Regular	Bueno	Muy bueno
----------	------	---------	-------	-----------

- Regulación de humedad en el lugar de almacenamiento (utilización de medidor de humedad)

Muy malo	Malo	Regular	Bueno	Muy bueno
----------	------	---------	-------	-----------

- Adecuado control contra fauna (medidas aplicadas para evitar el contacto con el alimento)

Muy malo	Malo	Regular	Bueno	Muy bueno
----------	------	---------	-------	-----------

- Tipo de suelo del lugar de almacenamiento:

Tierra	Concreto	Otro:
--------	----------	-------

Anotaciones:

Nombre y firma de la persona que realizó el muestreo:
