

00381

29



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**MUTAGÉNESIS POR AFLATOXINA B1  
PRESENTE EN MAÍZ Y TORTILLAS, Y  
LA NIXTAMALIZACIÓN COMO  
POSIBLE CONTROL**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE**

**DOCTOR EN CIENCIAS  
(BIOLOGÍA)  
P R E S E N T A**

**MARÍA DE GUADALUPE MOCTEZUMA ZÁRATE**

**2001**

**DIRECTORA DE TESIS: DRA. MAGDA CARVAJAL MORENO**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

DEDICATORIA

*Quiero dedicar muy especialmente esta tesis a mis padres, pues gracias a ellos, cada día de mi vida es especial y me da razón de vivir.*

Quisiera encontrar las palabras apropiadas para expresar mis sentimientos de amor y gratitud hacia ustedes. Sin ustedes no sería quien soy, pues su amor, apoyo, consejos, sabiduría y ejemplos de conducta han sido lo más importante en mi vida, y hoy tienen para mí más significado de todo lo que he aprendido

Dr. J. Jesús Moctezuma Mar

Profr. a. Señorina Zárate Castro

Que es un ejemplo maravilloso de lo que todos los hombres deberían ser.

Que es un ángel reflejado en la ternura de su ser.

*Gracias porque me han dado mucho más de lo que yo pueda merecer.*

## DEDICATORIA



A mis hermanos: *Martín, Ma. de los Ángeles y Laura*  
Por sus enseñanzas, consejos y todos “esos momentos” compartidos.

A mis tíos *Teresa Mar y Alfonso Vinaja*

Con gran cariño.



## AGRADECIMIENTOS

*Agradezco a las siguientes instituciones y personas su apoyo y colaboración para el buen desarrollo y culminación del presente trabajo.*

**Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí** por las facilidades administrativas y económicas otorgadas, a través de la Beca SUPERA (PROMEP).

**Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México**, por las facilidades brindadas de equipo, material e instalaciones para desarrollar el trabajo de investigación.

**Laboratorio de Toxicología Genética del Instituto de Investigación Biomédica, UNAM**, por equipo, asesoría técnica e instalaciones para realizar parte de mi trabajo experimental.

**División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias, UNAM.**

**Dr. Roberto Leyva Ramos** por su amistad, confianza y apoyo para obtener la Beca SUPERA y así poder realizar mis estudios de Doctorado.

**Dr. Jorge Fernando Toro Vázquez** por su apoyo para culminar mis estudios de Doctorado.

**Dra. Magda Carvajal Moreno**, por su apoyo como Directora de Tesis en las fases de planificación, desarrollo y culminación del presente trabajo. También por sus consejos y amistad.

**Dr. Javier Espinosa Aguirre**, por su participación en mi Comité Tutorial y como sinodal en mi Examen Doctoral, por su asesoría y la revisión de la tesis.

**Dra Ma. Eugenia Gonsebatt Bonaparte**, por su participación en mi Comité Tutorial y como sinodal de mis exámenes Predoctoral y Doctoral, asesoría, revisión de la tesis, por su disponibilidad y apoyo incondicional.

**M. en C. Francisco Rojo Callejas** por su apoyo en el análisis químico para la detección y cuantificación de la aflatoxina B1 por HPLC.

**Dr. Teófilo Herrera Suárez** por su amistad, disponibilidad, revisión del manuscrito de la tesis y por participar como sinodal en mi examen Predoctoral y Doctoral.

**Dr. Rubén López Martínez** por su amistad, revisión de la tesis y por participar como sinodal de mi examen Doctoral.

**Dra. Cristina Pérez Amador** por revisión del manuscrito y participar como sinodal de mi examen Doctoral.

**Dra. Patricia Guevara Fefer** por revisión del manuscrito y participación como sinodal de mis exámenes Predoctoral y Doctoral.

**C.D. Israel Pérez López y QFB. Víctor Dorado González** por su orientación y apoyo en la realización de la prueba de Ames.

**Dr. Joaquín Cifuentes** por su apoyo en los trámites para la obtención de grado.

**Biólogo Rafael Serrano** por su amistad y buena disposición de apoyo en todo momento.

**Sra. Marina Melgarejo** por todo el apoyo otorgado.

**Dra. Patricia Lappe** por su amistad y haber participado como sinodal en mi examen Predoctoral.

**Dra. Genoveva García**, por su amistad y apoyo incondicional.

**Dra. Patricia Ramos Morales** por su participación como sinodal en mi examen Predoctoral.

A mis compañeros de estudio: **Dra. Ma. Teresa Alvarez, Dr. Isaac Luna, Dr. Roberto Montes, Dr. Sergio Ayvar** y **M. en C. Víctor Hugo Valenzuela** por su amistad y las vivencias compartidas.

**Dra. Evangelina Pérez, Dr. Miguel Ulloa, M. en C. Elvira Aguirre, M. en C. Rebeca Martínez, Biólogo Samuel Aguirre, Sra. Leticia Barragán y Sr. Bruno Acosta<sup>®</sup>** por su amistad y por permitirme compartir su lugar de trabajo en el Laboratorio de Micología.

**Sr. Rafael Gómez** por su amistad y apoyo que me brindó con las citas bibliográficas.

**M. en C. Silvia Olvera, M. en C. Luis Pinzón, Dra. Josefina Barajas, Sra. Ma. Pilar Montiel, Sra. Angélica Salazar, Lic. José Luis Díaz, Sra. Hortencia Reza y Sr. Severiano García**, por su apoyo y afecto logrando hacer muy llevadera las etapas de intenso trabajo durante mi formación académica.

**D.G. Carlos Villarreal Ortiz** por el apoyo en la realización de diapositivas para el examen Predoctoral.

**Sr. José Reyna** por su colaboración en la toma de diapositivas para el examen.

**Bióloga Carmen Loyola Blanco** por su colaboración en el trabajo fotográfico de la parte experimental.

**A mis alumnos y exalumnos** de la materia de Micología de la Carrera de Quimicofarmacobiólogo de la Facultad de Ciencias Químicas de la UASLP, por sus enseñanzas, energía y entusiasmo ilimitados.

**Lic. Mario Macías Guerra** por su apoyo en la corrección de estilo del presente trabajo.

**Ing. Adriana Martínez Monternach** y a **su equipo de trabajo**, por el apoyo brindado en la edición de esta tesis.

*Asimismo deseo aprovechar esta ocasión para dar las GRACIAS a todos mis amigos, sobre todo a:*

A **JESÚS KRISTO** por manifestarse y darme tanto amor y sabiduría, a través de cada una de las personas que cruzaron por mi camino, las vivencias y experiencias de estos últimos años; porque pude dar y recibir afecto, sonrisas, alegría y amor; por todos los momentos desagradables y las cicatrices que llevo, pues gracias a ellos puedo valorar y disfrutar aún más el logro de esta meta. *Mil gracias*, por tu infinito *Amor y Fortaleza* que me has dado, sin ti, no hubiera podido llegar hasta el día de Hoy.

**M. en C. Blanca Ortiz Saldivar** por creer en mí y darme su constante motivación para continuar con mi formación profesional y por que siempre me ha estimulado para sacar y dar lo mejor de mí.

**Dr. Ismael Acosta Rodríguez** por su amistad, apoyo y por tomar la vida con tan buen humor.

A mi primo **M. en C. Alfonso Ruedas Jr.** por su buena disposición de apoyo en técnicas de computación y a mis tíos: **Lic. Alfonso Ruedas y Profa. Marcela Zárate** por sus consejos, disponibilidad y el apoyo siempre brindado.

**A mi prima Dra. Nadya Nava Zárate** por su colaboración para la impresión de esta tesis.

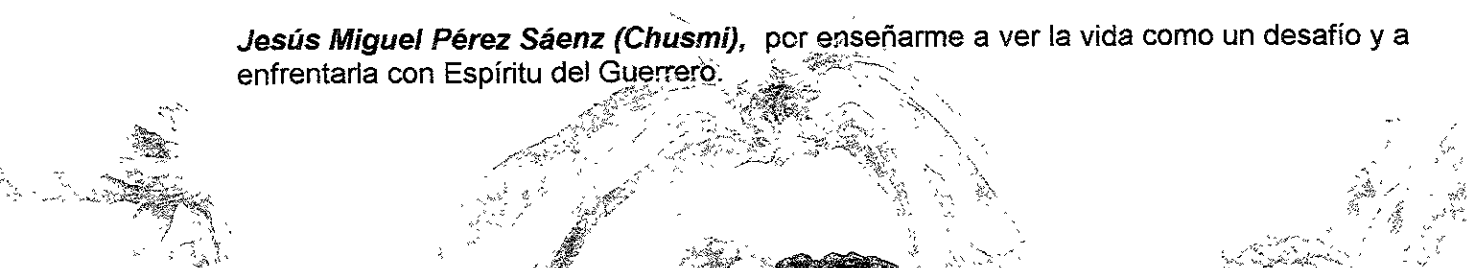
**Sra. Lydia Trejo de los Santos** por el apoyo proporcionado durante mi estancia en la ciudad de México y por su gran ejemplo de entusiasmo y amor a la vida.

**Dra. Margarita Villegas, Bióloga Lupita Vidal, Q.F.B. Margarita Isabel Rodríguez D., Q.F.B. Rosa María Requena M.en C. Socorro Leyva R.** por su amistad de tantos años.

**M. en C. Rafael Romero Martínez (Rafa), Bióloga Elva Bazán, M. en C. Rocío Castañón, Bióloga Claudia Ríos (Clau), Dra. Patricia Manzano, Dr. Luis Javier Méndez Tovar, Dra. Francisca Hernández** y **M. en C. Rafael Mondragón** por su amistad y apoyo de todos estos años y por habarme iniciado en el camino de la ciencia y la investigación.

**Lic. Tirso Alvarado y Hugo Velasco** por su amistad y apoyo moral en las etapas más difíciles de mis estudios de Doctorado.

**Jesús Miguel Pérez Sáenz (Chusmi)**, por enseñarme a ver la vida como un desafío y a enfrentarla con Espíritu del Guerrero.



## Una Reflexión

### *La sabiduría y yo*

En el silencio de la noche, la Sabiduría penetró en mi recámara y se quedó en pie a la vera de mi lecho. Me miró con la expresión de una madre cariñosa, enjugó mis lágrimas y me dijo:

-He escuchado los gemidos de tu alma y he venido a consolarte, Ábreme tu corazón, que yo lo llenaré de luz. Pregúntame, que yo te mostraré el camino de la Verdad.

Atendí a su indicación y le pregunté:

-¿Quién soy yo?, Sabiduría, y cómo llegué a este lugar de horrores? ¿Qué son estas inmensas esperanzas, estas montañas de libros y estas extrañas figuras? ¿Qué son estos pensamientos que vienen y van como bandadas de palomas? ¿Qué son estas palabras que articulamos con deseo y escribimos con alegría? ¿Qué son estas tristes y gozosas conclusiones que abrazan mi alma y envuelven mi corazón? ¿De quién son estos ojos que me miran y taladran hasta los senos más recónditos de mi alma y, sin embargo, no se ocupan de mi pena? ¿Qué son estas voces que lamentan el paso efímero de mis días y cantan las alabanzas de mi niñez? ¿Quién es este joven que juega con mis deseos y se burla de mis sentimientos, olvidándose de las acciones de ayer, contentándose exclusivamente con lo pequeño de hoy y armándose contra el lento acercarse del mañana?

¿Qué es este mundo horrible y a qué tierra desconocida me lleva?

¿Cuál es esta tierra que abre anchurosamente sus fauces para tragar nuestros cuerpos y prepara un albergue imperecedero para los avaros? ¿Quién es este hombre que se da por contento con los favores de la Fortuna y está suspirando por un beso de los labios de la Vida, mientras que la Muerte le abofetea el rostro? ¿Quién es este Hombre que compra un momento de placer con un año de arrepentimiento y se entrega al sueño cuando le rondan las pesadillas? ¿Quién es este Hombre que nada en las olas de la Ignorancia, hacia el vórtice de las Tinieblas?

Dimelo, Sabiduría, ¿qué son todas estas cosas?



Y la Sabiduría abrió sus labios y habló:

Tú, Hombre, eres capaz de ver el mundo con los ojos de Dios y captar los secretos del más allá a través del pensamiento humano. Éste es el fruto de la ignorancia

Sal al campo y contempla cómo las abejas rondan las hermosas flores y el águila se abalanza sobre su presa. Entra en la casa de tu vecino y ve al pequeñuelo fascinado por las llamaradas del hogar, mientras la madre trájina en sus tareas domésticas. Sé como la abeja y no desperdicies los días de tu primavera mirando lo que hace el águila. Sé como el niño a quien encanta el fuego de la chimenea y deja que la madre se dedique a sus quehaceres. Todo lo que ves, fue y sigue siendo tuyo

Los numerosos libros, figuras extrañas y bellos pensamientos que te rodean son fantasmas de espíritus que te han precedido. Las palabras pronunciadas por tus labios son los eslabones que te vinculan con tus semejantes. Las conclusiones tristes y alegres son las semillas del pasado arrojadas en el surco de tu alma, para ser cosechadas en el futuro.

El joven que juega con tus deseos es el que va a abrir la puerta de tu corazón para que entre la luz. La tierra que abre sus voraces fauces para tragar al hombre y, con él, sus obras, es la redentora de nuestras almas, que liberará de la esclavitud a nuestros cuerpos.

El mundo que se mueve contigo es tu propio corazón, que es el mundo mismo. Y el Hombre a quien consideras tan pequeño e ignorante, es el mensajero de Dios que ha venido a aprender la alegría de la vida a través del dolor y de la ignorancia.

Así habló la Sabiduría y poniéndose una mano en la frente, me dijo:

Sigue adelante. No te detengas. Avanzar es caminar hacia la perfección. Sigue adelante, sin temor a los abrojos ni a las piedras cortantes del camino de la Vida.

*Gibrán Jafar Gibran*

## CONTENIDO

Páginas

Dedicatoria.....	i
Agradecimientos.....	iii
Una Reflexión.....	vi
Contenido.....	viii
Lista de Tablas.....	xi
Lista de Figuras.....	xiii
Resumen.....	xiv
Abstract.....	xv
<b>I. ANTECEDENTES Y GENERALIDADES.....</b>	<b>1</b>
<b>1. Las aflatoxinas.....</b>	<b>1</b>
1.1 Definición y características biológicas de los hongos productores.....	1
1.2 Estructura química y propiedades fisicoquímicas.....	4
1.3 Biosíntesis.....	6
1.4 Condiciones de producción.....	9
1.5 Destoxificación.....	10
<b>2. Efectos tóxicos de las aflatoxinas.....</b>	<b>12</b>
<b>3. Metabolismo de las aflatoxinas.....</b>	<b>15</b>
<b>4. Mutagenicidad y efecto cancerígeno de la AFB1.....</b>	<b>19</b>
4.1 Mutagénesis.....	19
4.2 Carcinogénesis.....	20
4.2.1 Activación de proto-oncogenes.....	23
<b>5. Métodos de análisis de aflatoxinas.....</b>	<b>25</b>
<b>6. El maíz.....</b>	<b>27</b>
6.1 Clasificación taxonómica.....	27
6.2 Razas y variedades botánicas.....	27
6.3 Composición química y valor nutritivo.....	29

<b>7. Anatomía y fisiología del aparato digestivo humano.....</b>	<b>31</b>
7.1 Digestión de carbohidratos.....	32
7.2 Digestión en la boca.....	32
7.3 Digestión en el estómago.....	34
7.4 Digestión en el intestino delgado.....	36
7.5 Digestión en el intestino grueso.....	39
<b>II. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>40</b>
<b>III. OBJETIVOS.....</b>	<b>41</b>
1. General.....	41
2. Específicos.....	41
<b>IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>42</b>
1. Procesamiento al maíz naturalmente contaminado con AFB1.....	42
2. Procesamiento al maíz artificialmente contaminado con AFB1.....	44
3. Modelo de digestión <i>in vitro</i> .....	45
3.1 Con maíz naturalmente contaminado con AFB1.....	45
3.2 Con maíz artificialmente contaminado con AFB1.....	46
3.3 Controles utilizados para el Modelo de Digestión <i>in vitro</i> .....	49
4. Análisis químico.....	51
4.1 Método de extracción de AFB1.....	51
4.2 Cuantificación de la AFB1 por HPLC.....	52
4.2.1 Equipo y material.....	52
4.2.2 Condiciones de HPLC.....	52
4.2.3 Derivatización.....	52
4.2.4 Cuantificación de la AFB1 con espectrofotómetro.....	52
4.2.5 Curva de calibración de la AFB1.....	53

5. Prueba de Ames para medir la actividad biológica o mutación.....	54
5.1 Preparación de los medios de cultivo y reactivos.....	54
5.2 Ensayos de mutagenicidad en placa.....	56
5.3 Límites de detección para la AFB1.....	57
<b>V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>58</b>
1. Procesamiento al maíz naturalmente contaminado con AFB1 y Modelo de Digestión <i>in vitro</i> .....	58
2. Procesamiento al maíz artificialmente contaminado con AFB1 y Modelo de Digestión <i>in vitro</i> .....	61
3. Controles utilizados para el Modelo de Digestión <i>in vitro</i> .....	64
3.1 Soluciones enzimáticas con AFB1.....	64
3.2 Soluciones enzimáticas sin AFB1.....	67
3.3 Estándar de AFB1 con compuestos químicos (sales, ácido y base) y sin enzimas.....	68
3.4 Estándar de AFB1 con los compuestos químicos para nixtamalizar y acidificar.....	69
4. Análisis químico de la AFB1.....	70
4.1 Curva de calibración y concentración de AFB1.....	70
5. Límites de detección de mutagenicidad para la AFB1.....	72
<b>VI. CONCLUSIONES.....</b>	<b>75</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA CITADA.....</b>	<b>76</b>

## LISTA DE TABLAS

Páginas

1. Propiedades fisicoquímicas de algunas aflatoxinas y sus metabolitos (OPS, 1983).....	7
2. Composición promedio de la materia seca del grano entero de maíz (Reyes, 1990).....	30
3. Concentración de AFB1 y promedio de colonias revertantes en el maíz naturalmente contaminado y tortillas con y sin soluciones enzimáticas.....	59
4. Muestras de tortilla hechas de masa contaminada con 32 µg de AFB1 tratada con el Modelo de Digestión <i>in vitro</i> (licuadas con metanol al 60% en 40 % de PBS), determinación del pH, concentración de AFB1 por HPLC y promedio de colonias revertantes.....	61
5. Muestras de tortilla hechas de masa contaminada con 32 µg de AFB1 tratada con el Modelo de Digestión <i>in vitro</i> (licuadas con metanol al 60% en 40% de agua destilada), determinación del pH, concentración de AFB1 por HPLC y promedio de colonias revertantes.....	63
6. Determinación del pH, concentración (ng) de AFB1 y promedio de colonias revertantes en 150 µL de estándar de AFB1 sometidos a la acción de la saliva y soluciones enzimáticas.....	66
7. Efecto mutagénico de las soluciones enzimáticas sin AFB1.....	67
8. Determinación de pH, concentración de AFB1 y promedio de colonias revertantes en 150 µL de AFB1 sometidos a la acción de los compuestos químicos (sales, ácido y base) donde se disolvieron las enzimas.....	68
9. Determinación del pH, concentración de AFB1 y promedio de colonias revertantes en 150 µL de AFB1 sometidos a la acción de los agentes químicos (solución reguladora y Ca(OH) <sub>2</sub> ).....	69
10. Áreas del cromatograma y valores de la ecuación de la recta de regresión utilizados para graficar la curva de calibración de la AFB1.....	71

11. Límite de detección de mutagenicidad de AFB1 en Prueba de Ames con la cepa <i>Salmonella typhimurium</i> TA-98 (100 µL) con concentraciones frecuentes en tortillas.....	73
12. Prueba de Ames con la cepa <i>Salmonella typhimurium</i> TA-98 (100 µL) para conocer el límite mínimo de detección de mutagenicidad de la AFB1.....	74

## LISTA DE FIGURAS

	Páginas
1. Ciclo de vida de los hongos del género <i>Aspergillus</i> (Diener & Davis, 1987).....	2
2. Fórmulas estructurales de las principales aflatoxinas (Steyn <i>et al.</i> , 1980).....	5
3. Biosíntesis de las aflatoxinas (Trail <i>et al.</i> , 1995).....	8
4. Vías metabólicas de la AFB1 (Massey <i>et al.</i> , 1985).....	16
5. Diagrama de un grano de maíz (Reyes, 1990).....	30
6. Anatomía del aparato digestivo (Yokochi <i>et al.</i> , 1991).....	31
7. Glándulas salivales (Yokochi <i>et al.</i> , 1991).....	33
8. Digestión en el estómago (Netter, 1990).....	37
9. Proceso de manufactura de tortillas a partir de 2000 g de maíz naturalmente contaminado con AFB1, de la bodega rural Las Yescas, Valle Hermoso, Tamaulipas.....	43
10. Procesamiento de tortillas contaminadas con AFB1.....	44
11. Modelo de digestión <i>in vitro</i> aplicado a las tortillas de maíz naturalmente contaminado con AFB1.....	46
12. Modelo de digestión <i>in vitro</i> y procesamiento de las tortillas hechas de masa de maíz artificialmente contaminadas con AFB1, para análisis químico (HPLC) y biológico (Prueba de Ames).....	48
13. Prueba de Ames con controles y Modelo de Digestión <i>in vitro</i> .....	65
14. Curva de calibración de la AFB1.....	71

## RESUMEN

El maíz es el alimento básico de la población mexicana, siendo la tortilla el producto que se consume en mayor proporción y que es susceptible de contaminación por aflatoxinas (B1, B2, G1 y G2) las cuales son metabolitos secundarios muy tóxicos producidos por *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* y *A. nomius*. La aflatoxina B1 (AFB1) es la más importante por sus efectos mutágenos, teratógenos y carcinógenos, siendo el hígado el órgano más afectado.

La nixtamalización es un tratamiento térmico-alcalino que produce cambios físicos y químicos en el grano, y algunos autores la han reportado como un método eficaz para reducir la concentración de AFB1 en el maíz contaminado, y otros sugieren que parte de la AFB1 se elimina por lavado en agua alcalinizada y otra parte se modifica químicamente por la acción del álcali, al abrir el anillo de lactona evitando que presente fluorescencia y que se puede detectar la AFB1, sin embargo a un pH ácido se cierra el anillo y se reconstituye la molécula original.

El propósito del presente estudio fue evaluar si la nixtamalización disminuye la concentración de AFB1 y su toxicidad, determinando su efecto mutágeno (mediante la prueba de Ames) en un Modelo de Digestión 'in vitro' con saliva, pepsina y pancreatina aplicadas a las tortillas. También se investigó el límite mínimo de AFB1 necesario para producir una mutación y éste fue de 10 nanogramos.

Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron una reducción significativa en la concentración inicial de AFB1 en el maíz por el proceso de nixtamalización. Sin embargo, estos resultados no indican que este proceso sea un método eficaz para reducir las cantidades de AFB1, pues la acción del álcali sólo abre el anillo de lactona y enmascara su fluorescencia, también porque se forma una sal de calcio al llevarse a cabo la reacción entre la cal y la AFB1, que ya no se extrae durante el análisis químico, ni se determina por fluorescencia, sin embargo, al acidificar la sal de cal se destruye y nuevamente la aflatoxina aparece en los análisis.

Cuando se sometió a las tortillas a la digestión 'in vitro' de saliva y las enzimas pepsina y pancreatina en solución se detectó mayor concentración de AFB1 bajo la acción de la saliva y la solución de pancreatina, además de la mezcla de las tres: saliva + solución de pepsina + solución de pancreatina.

Se determinó que el pH de cada solución enzimática está directamente relacionado con la actividad química y biológica de la AFB1, pues a pH 7.0, 7.5 y 5.0 se tuvieron los mayores índices de dichas actividades y a pH 1.2 y 1.8 disminuyó parcialmente la concentración de AFB1 y no hubo efecto mutágeno.

Por otro lado, al estudiar el efecto mutágeno de la saliva y las soluciones enzimáticas sin AFB1 no se encontró reversión a ningún rango de pH analizado. Se obtuvieron los mismos resultados cuando se analizaron los compuestos químicos donde se disolvieron las enzimas, pero sin ellas y con AFB1. Estos resultados sugieren que existe un efecto aditivo entre las soluciones enzimáticas con su respectivo pH sobre la mutagenicidad de la AFB1.

Por lo anterior, podemos concluir que en la boca y en el duodeno la AFB1 recupera su actividad química y biológica, aunque en la boca por la acción de la saliva (pH 7.0) se tiene una mayor actividad biológica que en el duodeno (pH 5 – 7.5), ya que se tuvieron el doble de colonias revertantes con la acción de la saliva que con la saliva + solución de pepsina + solución de pancreatina.

Con estos resultados es importante seleccionar el maíz menos contaminado por AFB1 para el consumo humano, pues los niveles químicos y biológicos de ésta, después de la nixtamalización y al someterse a la digestión se recuperan en la boca por la acción de la saliva y en el duodeno por acción de la pancreatina, pudiendo ocasionar daños en la salud.



## ABSTRACT

Maize is the staple food of the Mexican population, and it is highly susceptible to contamination by aflatoxins (B1, B2, G1 and G2). Aflatoxins are produced by the fungi *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* and *A. nomius*, they are very toxic secondary metabolites, where aflatoxin B1 (AFB1), is the most important one for its pathogenic effects, such as mutagenicity, teratogenicity and carcinogenicity mainly for the liver.

Lime is used in the thermo-alkaline treatment applied to maize, and alters the properties of the grain. Several studies have stated that aflatoxins are not dangerous because they are inactivated by lime treatment, that they are diminished with the washing and that alkali produces a chemical modification by opening the lactone ring of the AFB1. When the lactone ring of AFB1 opens, the fluorescence is lost and the toxin can not be detected. However with an acid pH, the lactone ring closes and the original molecule is restored.

Our results showed that lime treatment decreased both the AFB<sub>1</sub> initial concentration and its toxicity. We applied a Digestion Model *in vitro* to study the mutagenicity of tortillas, with saliva, pepsin and pancreatin, samples were analyzed by Ames test with T98 *Salmonella typhimurium* and the AFB1 concentration by HPLC.

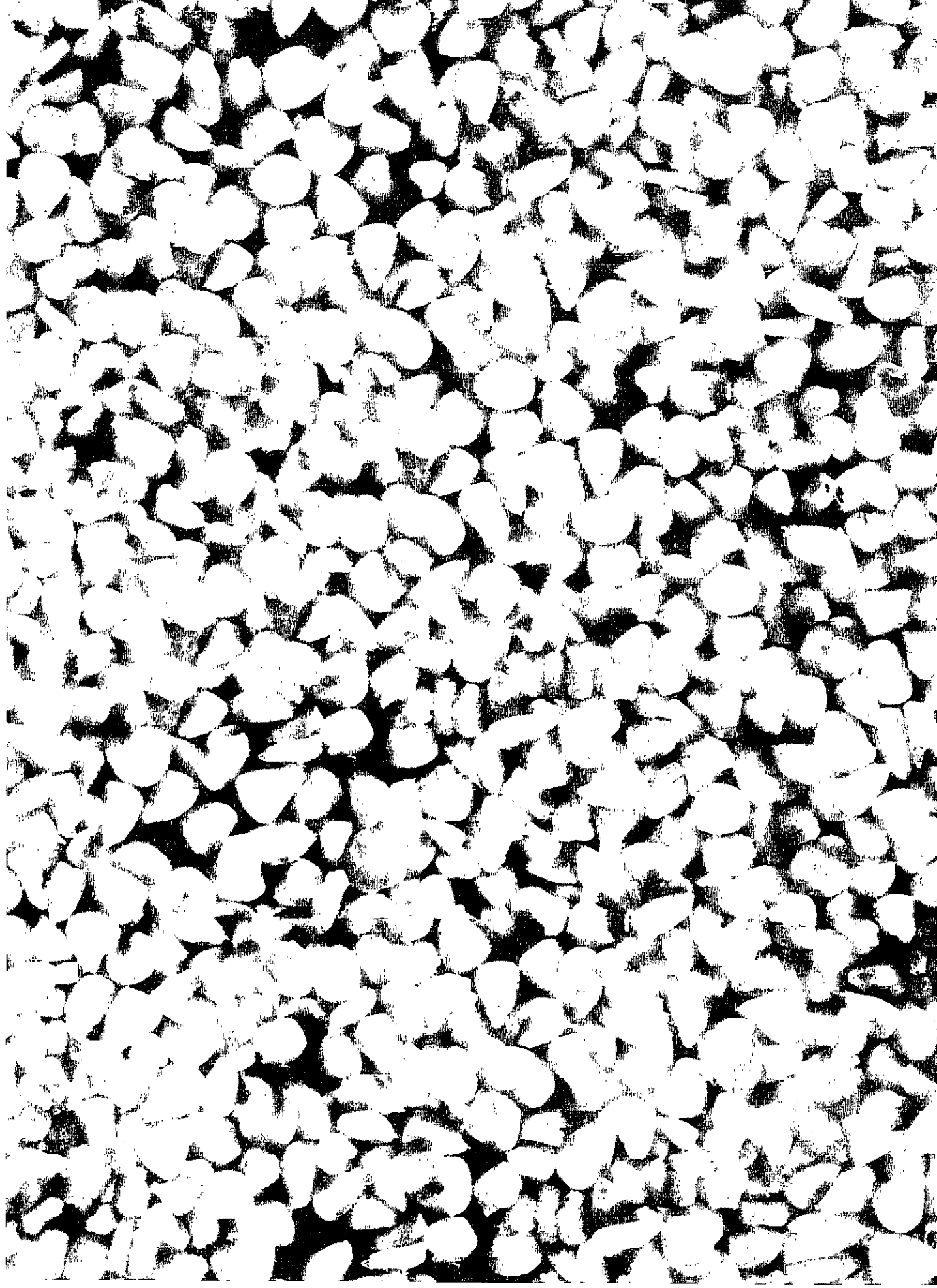
Lime treatment decreased of the initial concentration of AFB<sub>1</sub> in maize tortilla but the AFB<sub>1</sub> is mainly disguised and it is recovered with the acids of the digestion. Lime treatment opens the lactone ring of the AFB<sub>1</sub>, camouflages its fluorescence, and forms a salt of calcium, from the AFB<sub>1</sub> attached to lime, and this mycotoxin cannot be purified with the chemical procedure. However, in contact with acid pH, the lime salt is destroyed and the AFB<sub>1</sub> fluorescence is restored and newly detected.

When the tortillas were digested "*in vitro*" by saliva, gastric and pancreatic juices, done with solutions of pepsin and pancreatin, we found a higher concentration of AFB<sub>1</sub>, with the action of both saliva and pancreatin, and similar results were obtained with saliva + pepsin + pancreatin.

The pH of the enzymatic solutions, is very important for the chemical and the biological activities of AFB<sub>1</sub>, because with a pH of 7.0, 7.5 and 5.0, we obtained the highest values of both activities, while with a pH of 1.2 and 1.8 the AFB<sub>1</sub> concentration was reduced and we did not observed a mutagenic effect.

Some of the analyzed controls were saliva, enzymatic solutions made with pepsin and pancreatin, solvents, salts, acids and alkalis alone and without AFB<sub>1</sub>. There was no mutagenic effect with them at all the analyzed pH concentrations. This results suggest an added effect of the enzymatic solutions and the neutral pH on the mutagenic effect of AFB<sub>1</sub>.

We conclude that the enzymatic activities of the saliva (pH 7.0) and pancreatin (pH 7.5), are very important in the recovery of the fluorescence and mutagenic activities of AFB<sub>1</sub>. With saliva, pancreatin and the 3 enzymes together, there were more revertant colonies due to AFB<sub>1</sub>, in Ames test, than in the controls. Pepsin (pH 1.2) inhibited the mutagenic effect of AFB<sub>1</sub>.



# *Antecedentes y Generalidades*

## I. ANTECEDENTES Y GENERALIDADES

### 1. Las aflatoxinas.

#### 1.1 Definición y características biológicas de los hongos productores.

La palabra aflatoxina viene de: a = *Aspergillus*, fla = *flavus* y toxina = veneno.

Son metabolitos secundarios altamente tóxicos (Cotty *et al.*, 1994) producidos por los hongos *Aspergillus flavus* Link (Hartley *et al.*, 1963; Zenteno, 1971), *A. parasiticus* Speare (Boller & Schroeder, 1973; Ehrlich & Ciegler, 1985), *Aspergillus nomius* Kurtzman (Kurtzman *et al.*, 1987; Moss, 1996), y recientemente se ha reportado a *A. pseudotomarii* (Ito *et al.*, 2001). Las características micromorfológicas más sobresalientes de este género son cabezuelas globosas o columnares, de colores verde-amarillento pálido o verde oliva. Fiálides uniseriadas o biseriadas frecuentemente en la misma cepa o aun en la misma cabezuela. Las especies de este grupo no presentan estado sexual (no se reproducen por meiosis), siendo común la presencia de esclerocios de color café rojizos, café púrpura o negros cuando están maduros, de forma globosa, subglobosa o elongada verticalmente (Raper & Fennell, 1965).

Las dos especies que producen mayor cantidad de aflatoxinas son *A. flavus* Link, que produce principalmente aflatoxinas B1 (AFB1) y B2 (AFB2), tienen mayor actividad proteolítica, se ha aislado principalmente del maíz, aunque también es dominante en algodón y nueces (Moreno & Gil, 1991) y *A. parasiticus* Speare, produce las aflatoxinas B1, B2, G1, G2, presentan una mayor actividad lipolítica (El Gendy & Marth, 1980), y se han aislado con más frecuencia de cacahuete (Krogh, 1987). Una diferencia importante entre estas dos especies es la producción por parte de algunas cepas de *A. flavus* Link de ácido ciclopiazónico (Diener & Davis, 1987).

Estos hongos producen contaminación de las semillas a nivel de campo y crecen en forma de saprófitos en los desechos de las cosechas que se encuentran en los suelos de cultivo. Una fuente más de contaminación primaria suelen ser los esclerocios que se forman en los granos dañados y sanos de maíz (Figura 1).

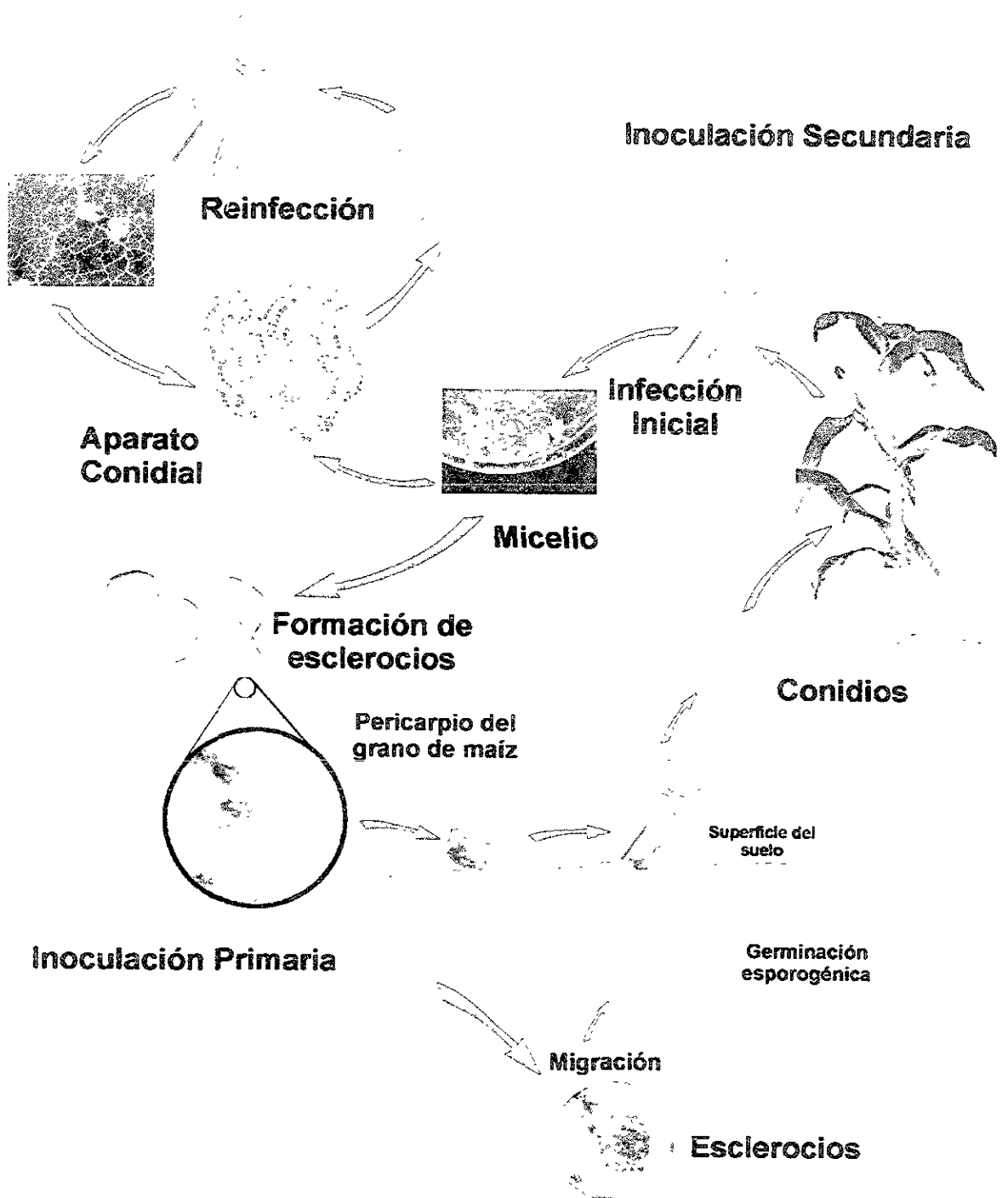


Figura 1. Ciclo de vida de los hongos del género *Aspergillus*.  
(Diener and Davis, 1987).

Los granos de maíz son invadidos por hongos durante su formación en la planta (Anderson *et al.*, 1975) así como en post-cosecha, en su transporte y almacenamiento (Singh & Sinha, 1983; Guzmán de Peña *et al.*, 1985; Tsuruta, 1987). Estos hongos causan diferentes daños a las semillas y granos, reducen su viabilidad, afectan su calidad nutricional y sanitaria. Los cereales como: maíz, sorgo, avena, trigo, arroz, cebada, centeno y mijo (Davis *et al.*, 1985; De Miguel, 1987; Kelly, 1987; Sánchez-Regueiro *et al.*, 1984; Tsuruta *et al.*, 1985; Ochoa *et al.*, 1989 ) y oleaginosas como: cacahuete (Diener & Davis, 1977; Fan & Chu, 1984; Wilson & Stansell, 1983; Ávila-Castro, 1991), nueces de todo tipo, pistache, piñón, semilla de algodón y de girasol (Marsh & Simpson, 1984; Ram *et al.*, 1986; Park & Rua, 1991), constituyen un excelente medio de cultivo para el desarrollo del moho. Durante las sequías, las plantas son más susceptibles a las invasiones de insectos que llevan esporas, comenzando así el desarrollo del hongo (Hill *et al.*, 1983; Barry *et al.*, 1986; Lillehoj *et al.*, 1984; McMillian *et al.*, 1985 b y 1987).

Las aflatoxinas pueden permanecer mucho tiempo después de que los hongos que las produjeron mueran. Por consiguiente, los granos pueden tener niveles de aflatoxinas potencialmente peligrosos, aunque no tengan una apariencia mohosa. Las aflatoxinas también han sido encontradas en especias, chiles, condimentos, productos lácteos: leche, crema, yogurt (Van Egmond *et al.*, 1977 ; Wild *et al.*, 1987; Coulter *et al.*, 1984), huevo, productos cárnicos (Pestka, 1986), salami, jamón curado, pasteles refrigerados o congelados, pastas de trigo para sopas (Rodríguez, 1988), vinos y cerveza (Bullerman, 1981; Taguchi *et al.*, 1995; Trinder, 1988 ), dulces (Bravo *et al.*, 1985), alimentos balanceados para animales (Dhavan & Choudary, 1995) y en tortillas (Rosiles, 1979; Price & Jorgensen, 1985 ; Torreblanca *et al.*, 1987; Carvajal & Irvin, 1988; Carvajal *et al.*, 2000; Akano & Atanda, 1990).

## 1.2 Estructura química y propiedades fisicoquímicas.

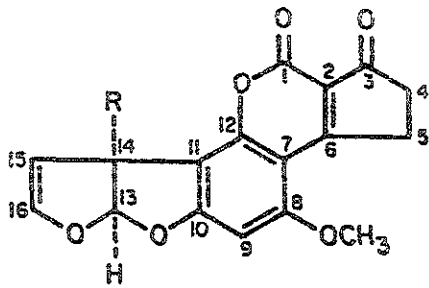
Las aflatoxinas corresponden químicamente a bisdihidrofurano cumarinas. Se conocen diferentes tipos: aflatoxina B1 (AFB1), B2 (AFB2), G1 (AFG1), G2 (AFG2), M1 (AFM1), M2 (AFM2), P1 (AFP1), Q1 (AFQ1), D (AFD), entre otras, todas derivan de la AFB1; así las AFB2 y AFG2 son dihidroderivados del compuesto parenteral, las aflatoxinas M1 y M2 son metabolitos hidroxilados de B1 y B2, respectivamente. En maíz sólo se presentan como contaminantes los tipos B1, B2, denominadas así debido a su fluorescencia azul (del inglés 'Blue' = azul) en cromatografía de placa fina (CPF); los subíndices de las letras B, indican la movilidad que tienen por sus diferentes pesos moleculares y que dan diferentes coeficientes de retención (Rf) en CPF (Sargeant *et al.*, 1983; Jones, 1977).

La AFB1 es la más tóxica con DL<sub>50</sub> baja, junto con la M1 (Allcroft *et al.*, 1966); la AFB2 es 10 veces menos mutagénica que la AFB1.

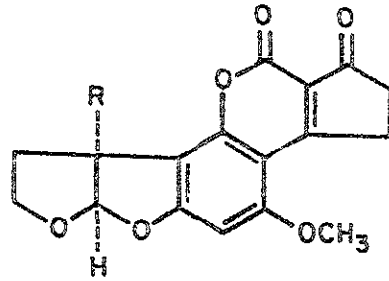
En la Figura 2 se aprecia la estructura química de las aflatoxinas, las cuales tienen un núcleo de cumarina unido a un bifurano y a un anillo de ciclopentanona (Steyn *et al.*, 1980).

En la Tabla 1 se presentan las principales propiedades fisicoquímicas de algunas aflatoxinas y metabolitos naturales. Son moléculas de bajo peso molecular, variando de 298 (AFP1) a 330 (AFG2 y AFM2), resistentes a las altas temperaturas desde 237°C (AFG2) a 320°C (AFP1), inodoras, insaboras e incoloras. Actúan en cantidades traza de millonésimas de gramo (microgramos por kilo = µg / kg o partes por billón = ppb, tomando el billón en el sentido estadounidense como mil millones).

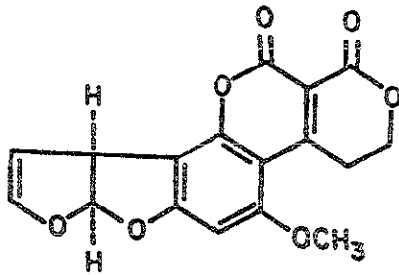
Son ligeramente solubles en agua y solubles en solventes orgánicos polares como metanol, etanol, cloroformo, acetona, tolueno, cloruro de metileno, benceno, etc. Las soluciones de cloroformo y benceno las mantienen estables por años en lugar frío y oscuro. Son sensibles a la luz, especialmente cuando están en solución. Se descomponen muy fácilmente al contacto con el aire, oxígeno, soluciones de álcalis y ácidos débiles.



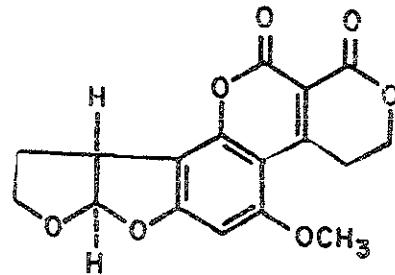
1 R = H: AFLATOXINA B<sub>1</sub>  
 2 R = OH: AFLATOXINA M<sub>1</sub>



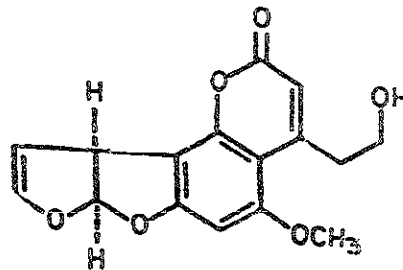
3 R = H: AFLATOXINA B<sub>2</sub>  
 4 R = OH: AFLATOXINA M<sub>2</sub>



5 AFLATOXINA G<sub>1</sub>



6 AFLATOXINA G<sub>2</sub>



7 PARASITICOL

Figura 2. Fórmulas estructurales de las principales aflatoxinas (Steyn *et al.*, 1980).



Son fluorescentes, ópticamente activas y absorben la luz ultravioleta, los picos máximos de absorción se presentan a 265 nm y 362 nm. La fluorescencia es emitida a 425 nm. Las rotaciones ópticas varían de -504 a -558 en cloroformo. En el infrarrojo absorben a 1760, 1684, 1632, 1598 y 1562 en  $\text{cm}^{-1}$  (OPS, 1983) (Tabla 1).

La presencia de un anillo de lactona en la molécula de las aflatoxinas las hace susceptibles a la hidrólisis alcalina. Esta característica es importante y todo proceso de elaboración alimentaria que incluya un tratamiento alcalino puede reducir la contaminación de los productos, si bien la presencia de proteínas, el pH y la duración del tratamiento pueden modificar los resultados. Sin embargo, si el tratamiento alcalino es leve, la acidificación invertirá la reacción, reconstituyendo la aflatoxina original (De longh *et al.*, 1962).

La molécula de aflatoxina se rompe con hipoclorito de sodio, por lo que éste se recomienda para descontaminar material de laboratorio (Stoloff & Trager, 1965).

### 1.3 Biosíntesis.

La producción de aflatoxinas por *Aspergillus* alcanza su tasa máxima de producción en el quinto día, que es cuando el hongo llega a la fase estacionaria de crecimiento. Y su producción disminuye notablemente del sexto al octavo día (Steyn, 1980). Giralt *et al.*, (1989), han observado que después de 24 horas en que *Aspergillus* alcanza las condiciones óptimas de temperatura (27-30 °C) y humedad (85% de humedad relativa) para producir aflatoxinas, su tasa de producción va en aumento hasta los doce días, que es cuando obtiene su máxima producción, enseguida esta tasa disminuye progresivamente.

Los patrones de formación de AF y de lípidos son muy similares, dado que ambos provienen de un precursor común (acetato) (Shih & Martin, 1974; Dutton *et al.*, 1985). Cuando se incorpora glucosa marcada con  $\text{C}^{14}$  en posición uno en condiciones anaeróbicas, se desencadena el catabolismo de la glucosa vía Embdem Meyerhoff y se favorece la producción de AF.

Tabla 1: Propiedades fisicoquímicas de algunas aflotoxinas y sus metabolitos (OPS, 1983)

Aflatoxina	Fórmula molecular	Masa molecular	Temperatura de fusión ( ° C )	Absorción ultravioleta		Emisión de fluorescencia	Referencias
B1 a	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	312	265 ** -270 *	12 400	21 800	425	Asao et al., 1965
B2 a	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	314	280 ** -309 *	12 100	24 000	425	Chang et al., 1963
G1 a	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	328	244 * -250	9 600	17 700	450	Asao et al., 1965
G2 a	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	330***	229* -240 ***	8 200	17 100	450	Hartley et al., 1963
1	17 12 7	326	299	14 150	21 250 (357 nm)	425	
2	17 14 7	330	293	12 100 (264 nm)	22 900 (357 nm)	435	
1 b	16 10 6	298	< 320	11 200 (267 nm)	15 400 (362 nm)		
1	17 12 7	328		14 900 (362 nm)			
				11 450 (267nm)	17 500 (366 nm)		
Aflatoxicol	17 14 6	314	230-234 ***	10 800 (261 nm)	14 100 (325 nm)	425	Detroy & Hesselaine, 1970

\* = Townsend, 1967; \*\* = Stubblefield et al., 1967; \*\*\* = Butler, 1974; a = coeficiente de absorción molar de las aflatoxinas B1, B2, G1, G2 se obtuvo de Rodricks et al., 1970 y el correspondiente a las aflatoxinas M1 y M2 de Stubblefield et al., 1972; b = La P indica los productos fenólicos de la O-demetilación de la AFB1.

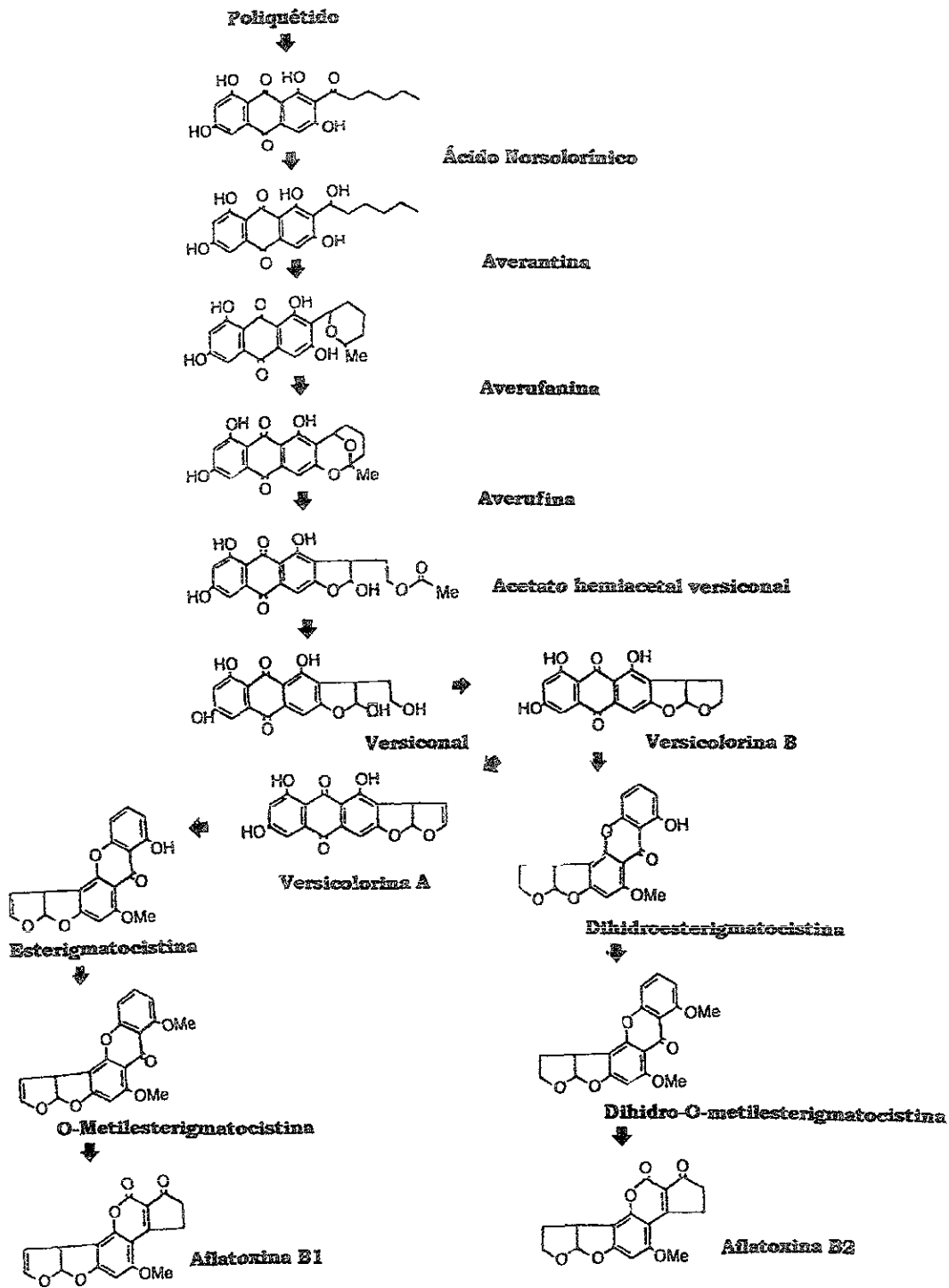


Figura 3. Biosíntesis de las aflatoxinas (Trail et al., 1995).

Los metabolitos o precursores de la biosíntesis de la AFB<sub>1</sub>, tienen una estructura base de C<sub>20</sub> poli-β -quétido. Estos metabolitos precursores pertenecen a diferentes grupos de compuestos químicos, así tenemos a las xantonas (esterigmatocistina, O-metil estigmatocistina, aspertoxina), poli-hidroxi-antraquinonas (averufina, O-dimetilnidurufina, ácidos solorínico y norsolorínico, averantina, 1-O-dimetilaverantina, averitrina y acetato de versiconal), aflatoxinas y parasiticol (Steyn, 1980; Trail *et al.*). Figura 3.

#### 1. 4 Condiciones de producción.

Las aflatoxinas aparecen cuando una cepa productora de toxina de *A. flavus* o *A. parasiticus* crece en un sustrato y en un área geográfica donde las condiciones ambientales favorecen su desarrollo. *A. parasiticus* crece preferentemente en áreas tropicales y semitropicales; todas las cepas que han sido aisladas son productoras de aflatoxinas (Cotty *et al.*, 1994; Moss, 1996), *A. flavus* es capaz de desarrollarse en un amplio intervalo de temperaturas en sustratos con alto contenido de carbohidratos, sin embargo, muchas cepas no son productoras de aflatoxinas, por lo que la sola presencia del hongo no indica la existencia de toxinas (Heathcote & Hibbert, 1978 ).

Inicialmente la producción de aflatoxinas fue considerada como un problema de almacenamiento inadecuado. Sin embargo, investigaciones realizadas indicaron también la existencia de aflatoxinas en granos de maíz antes de la cosecha (Villarreal-Lozano, 1990).

Entre los principales factores para la producción de aflatoxinas se encuentran: el hongo productor, el sustrato, las humedades del ambiente y del sustrato, la temperatura, la microbiota asociada, el oxígeno en la atmósfera del almacén y el periodo de almacenamiento (Wilson & Jay, 1975; Christensen & Sauer, 1982; Christensen & Meronuck, 1986; Moreno, 1988).

La humedad del ambiente y del grano o producto derivado de éste es uno de los factores más importantes en la producción de las micotoxinas. La humedad relativa mínima del medio ambiente que permite el desarrollo de *A. flavus*, *A. parasiticus*, y la

producción de aflatoxinas, es de 85% que representa un contenido de humedad en los granos de maíz entre 16.5 -18% (Roy & Chourasia, 1989).

Estos hongos crecen a temperaturas de 8 a 55 °C, siendo de 36 a 38 °C las óptimas para su desarrollo y para la producción de aflatoxinas son de 25 a 35 °C; iniciándose de 11 a 14 °C (Diener & Davis, 1970). Aparentemente la producción de aflatoxinas no ocurre a temperaturas menores de 10 °C, ni a mayores de 45 °C.

Las especies de *Aspergillus*, productoras de aflatoxinas requieren estar prácticamente como cultivo puro para producir aflatoxinas (Christensen & Meronuck, 1986), ya que al convivir con otras especies que crecen bajo las mismas condiciones de humedad y temperatura, como *A. chevalieri*, *A. candidus* y *A. niger*, compite con ellas y se interfiere la producción de aflatoxinas (Boller & Schroeder, 1973 y 1974). Estos fenómenos han llevado a los investigadores a realizar trabajos en el área de control biológico, utilizando algunos microorganismos (hongos y bacterias), como competidores de las especies de hongos productoras de aflatoxinas (Cole *et al.*, 1989).

### 1.5 Destoxificación.

Para resolver los problemas ocasionados por las aflatoxinas hay que evitar el desarrollo del hongo en los alimentos e inhibir su crecimiento. Hay que secar los productos almacenados y mantener la humedad relativa a niveles inferiores a los requeridos por el hongo.

En los Estados Unidos, la *Food and Drug Administration* (FDA) ha establecido valores máximos permisibles de 20 ppb de aflatoxinas por kg de alimento para consumo humano; en productos destinados para consumo de animales los límites permisibles son de 20-300 ppb (CAST, 1989), para ganado lechero no más de 20 ppb y en leche entera y desgrasada no más de 0.5 ppb (Bullerman, 1986).

Para evitar la contaminación de los granos en campo, la alternativa es el desarrollo de variedades resistentes o tolerantes al ataque del hongo (Davis *et al.*, 1985; Guzmán de Peña *et al.*, 1985; Gorman & Kang, 1991; Gardner *et al.*, 1987). Para evitar que el hongo se establezca, son necesarias todas las prácticas de cultivo que fortalezcan a las plantas como son: fechas de siembra que eviten tanto las infestaciones por insectos como la sequía, el combate de insectos, manejo adecuado

de densidades de siembra y fertilización, cosechar oportunamente, cuando el maíz tenga un contenido de humedad entre el 20 y el 30% y secado rápido, dejando el grano abajo del 16% de humedad para evitar la producción de aflatoxinas.

El uso de los fungistáticos o fungicidas, en el caso de granos almacenados y de alimentos balanceados, se ha orientado prácticamente al tratamiento con ácido propiónico y mezclas con otros ácidos orgánicos o sus sales (Sauer & Burroughs, 1974). El uso de estos inhibidores en granos, está restringido a maíz para la alimentación de ganado, el grano debe tener un alto contenido de humedad, alrededor del 20 al 30 %. Esas sustancias le imparten un sabor y olor desagradable al grano, por lo que no se usan para la alimentación humana. Por otra parte, esos ácidos matan el embrión, impidiendo su uso en la industria semillera y maltera. Otros fungicidas, aún cuando son efectivos contra los hongos toxigénos, solamente se pueden usar en semillas agrícolas por su toxicidad a los animales y al hombre (Moreno & Ramírez, 1985).

Entre los principales métodos químicos de destoxificación (Dvórák, 1990) se encuentran los tratamientos con amoníaco (Norred, 1982; Park *et al.*, 1988; Mahalingam *et al.*, 1990), bisulfito de sodio (Hagler *et al.*, 1982 y 1983), hidróxido de calcio (Park *et al.*, 1981), hidróxido de sodio (Moerck *et al.*, 1980), formaldehído (Codifer *et al.*, 1976; Heimbecher *et al.*, 1988) y tratamientos con algunos oxidantes tales como el hipoclorito de sodio, permanganato de potasio, peróxido de hidrógeno y borato de sodio (Applebaum & Marth, 1982), urea (González, 1987). Se ha reportado que materiales absorbentes, clasificados como carbón activado, alúminas, gel de sílice y aluminosilicatos, son capaces de unirse en solución, a las aflatoxinas (Ademoyero & Dalvi, 1983; Diener *et al.*, 1985; Phillips *et al.*, 1988; Piva *et al.*, 1995; Kubena *et al.*, 1990 a y b; Kubena *et al.*, 1991).

Se ha intentado destoxificar a los alimentos mediante el uso de radiación ultravioleta, pero no es muy efectiva por su poco poder de penetración, además deterioran el valor nutritivo del alimento (Ahmed & Elmer, 1985; Aibara & Yamagishi, 1970; Shanta *et al.*, 1986; Mitchell, 1988). El ozono inhibe la producción de las aflatoxinas y mantiene las propiedades organolépticas y el poder nutritivo de los alimentos (González *et al.*, 1990).

La nixtamalización del maíz es un proceso térmico alcalino, que desprende la cascarilla y suaviza el grano con una pérdida parcial de ciertos componentes y de fibra cruda. Por otro lado, también hay cambios fisicoquímicos, en la calidad proteínica del maíz; otros cambios de menor importancia nutricional, pero de significancia para la elaboración de la tortilla, son el desprendimiento del pericarpio así como el cambio de la textura y consistencia de grano. Esto resulta como consecuencia del efecto conjunto de temperatura-hidróxido de calcio que actúa provocando una gelatinización parcial del almidón. Así, se lleva a cabo una absorción significativa de agua y suavidad del endospermo que permite manejar con facilidad el grano para obtener el nixtamal (Machorro y Valdivia, 1984). La nixtamalización reduce el nivel de contaminación original de aflatoxina en el grano, pero no la elimina (Argumedo *et al.*, 1985; Arriola *et al.*, 1988; Rosiles, 1979; Torreblanca *et al.*, 1987; Torres *et al.*, 1987; Ulloa-Sosa & Schroeder, 1969) sólo abre el anillo de lactona de la aflatoxina y se pierde la fluorescencia que se pueda detectar, y hay reportes que al mezclarse al ácido clorhídrico del estómago la aflatoxina cierra su anillo y se activa nuevamente, lo cual fue reportado por Price y Jorgensen (1985) cuando acidificaron muestras nixtamalizadas para simular el efecto de los ácidos en el estómago de los mamíferos monogástricos (con un solo estómago).

## 2. Efectos tóxicos de las aflatoxinas.

Las aflatoxinas se encuentran entre los más potentes cancerígenos biológicos conocidos para animales y el hombre (Olsen *et al.*, 1988; Wei & Hsieh, 1980; Chu, 1991). Producen efectos agudos y/o crónicos (Campbell & Salamat, 1971) como teratogénesis, mutagénesis e inmunodepresión (Hesseltine, 1967; Bilgrami & Sinha, 1992; Llewelyn *et al.*, 1977; Carvajal & Irvin, 1988). El órgano más afectado es el hígado (OPS, 1983). Además alteran la absorción y metabolismo de lípidos, carbohidratos, proteínas, vitaminas y los minerales y ejercen su toxicidad en el transporte electrónico de la cadena respiratoria y en las membranas celulares y subcelulares (Patterson, 1977).

Las aflatoxinas ingeridas con los alimentos se absorben por la mucosa intestinal, pasando al torrente circulatorio hasta el hígado, riñones, canalículos biliares y sistema

nervioso donde se localiza. El resultado va desde una intoxicación severa, hasta daños de cronicidad.

Se tienen datos directos de los efectos de las aflatoxinas en el hombre (Harrison *et al.*, 1993; Carvajal & Irvin, 1988; Groopman *et al.*, 1992; Chang *et al.*, 1994; Eaton & Gallagher, 1994). Se ha comprobado que en los países donde se acostumbra consumir alimentos enmohecidos y se ha registrado la presencia de aflatoxinas, la incidencia de cáncer del hígado es muy alta. Esto sucede, por ejemplo, en algunas regiones de Africa, de la India y del Sureste de Asia, entre otros (Harcharan *et al.* 1978; Krishnamachari *et al.*, 1975).

Las aflatoxinas tienen un papel etiológico en la cirrosis hepática y en el carcinoma primario del hígado, y se ha observado que son de las principales causas de cirrosis en niños de la India (Amla *et al.*, 1971), quienes presentaron lesiones en el hígado al consumir harina de cacahuete contaminada con aflatoxinas. Estudios realizados en Kenya y otros países africanos, así como en Tailandia, han mostrado una correlación positiva entre la ingestión de aflatoxinas y el desarrollo de cáncer en el hígado (Aguilar *et al.*, 1994; Wogan, 1992; Olson *et al.*, 1983), así como cáncer de colon (Deger, 1976; Harrison *et al.*, 1993). Otras patologías por la ingestión crónica de bajas cantidades de aflatoxinas son el hígado lleno de grasa que formará después cirrosis, diversos tipos de cáncer, Síndrome de Reye (Stora *et al.*, 1983; Reye *et al.*, 1963) Kwashiorkor (Apeageyi *et al.*, 1982; Robens & Richard, 1992; Chevel, 1989) e interferencias en el mecanismo inmunitario como en la motilidad, fagocitosis, reconocimiento del antígeno, producción de anticuerpos, complemento e interferón (Giambrone, 1978; Pier, 1979) y por consiguiente, reducción de defensas contra los microorganismos (Wei & Hsieh, 1980; Rausuddin *et al.*, 1990). Se ha estudiado su mecanismo de acción en las células embrionarias de pulmón humano y se ha encontrado que inhiben la síntesis del ADN en la mitosis, lo que causa vacuolización y un incremento en la formación de células gigantes (Pier *et al.*, 1977; Pier & McLoughlin, 1985).



También hay evidencias de que las partículas aéreas de grano y el polvo pueden contaminadas con aflatoxinas, y al ser inhaladas pueden ocasionar cáncer pulmonar. afecta la salud de los trabajadores que están expuestos al manejo de granos contaminados con estas toxinas (Dvorácková, 1976 y Dvorácková *et al.*, 1981).

Entre los animales más susceptibles a las aflatoxinas están la trucha arco iris, los patos, rata blanca, los cerdos, cerdas preñadas, terneras, el ganado bovino y los borregos quienes son sensibles en orden decreciente (Heathcote & Hibbert, 1978). Los efectos tóxicos en los animales varían con las dosis, tiempo de exposición, especie, raza y estado nutricional. Entre algunos de estos efectos se encuentran: la baja ganancia de peso, desarrollo lento, debido a que se ven disminuidos los niveles plasmáticos de las enzimas de síntesis de ácidos grasos y lípidos, así como la tasa de excreción de lipasa pancreática y la velocidad del transporte lipídico, lo que ocasiona la acumulación de grasa en el hígado y la aparición de un síndrome de mala absorción (Doerr, 1974; Wei, 1968), problemas en la reproducción, diarreas, vómitos, hemorragias internas espontáneas, coagulopatías generalizadas y aumento en el tiempo de sangrado, esto debido a que las aflatoxinas interfieren con los mecanismos de coagulación al afectar a la protrombina. Además, aumenta la fragilidad capilar y disminuye la resistencia de los tejidos protectores que circundan a los vasos por el aumento en la actividad de las enzimas lisosómicas que son las que degradan los componentes intra y extracelulares de este tejido (Tung, 1971), desórdenes respiratorios, reducción en la producción de leche y huevos, incremento de la susceptibilidad a las infecciones por bacterias (Doerr, 1978), virus y otros agentes causales de enfermedades y muerte. Dos de los factores que colocan a las aflatoxinas como sustancias muy peligrosas, es el ser acumulativas y pasar del tracto digestivo a la leche y a los tejidos de los animales que las consumen, con el consiguiente riesgo de llegar al consumo humano.

Los efectos de las aflatoxinas en aves varían de acuerdo a la cantidad ingerida, la especie, edad y variedad de las parvadas. Algunos de los signos patológicos que pueden presentarse son: aturdimientos, sordera, falta de color en plumaje, diarrea, caminado incierto, disminución de la producción, alteraciones en la incubación de


huevos y aumento de la mortalidad. También puede observarse una alteración en la digestión de las proteínas y la absorción de los aminoácidos, así como un retraso en el crecimiento al disminuir la síntesis de ADN, ARN y proteínas en los ribosomas (Smith, 1982).

En el ganado vacuno hay hepatitis tóxica, colongitis, esteatosis y cirrosis, así como lesiones en las células del riñón. Algunos de los efectos reportados en bovinos y cerdos son los abortos ( Campos-Nieto *et al.*, 1980), aunque también ha sido reportado en un bisonte en cautiverio (Campos-Nieto *et al.*, 1977).

También se ha encontrado relación entre la aflatoxicosis y un síndrome de infertilidad en cerdos que se caracteriza por fracasos en la inseminación y alta mortalidad entre los lechones lactantes (Howart, 1976).

Efectos posteriores de la aflatoxicosis son las lesiones renales, su aparición tardía, sugiere que los causantes son los derivados de las aflatoxinas y no las aflatoxinas en sí. Se produce necrosis de los túbulos proximales, separación de epitelio, exudación granular y congestión de los vasos sanguíneos intersticiales (Austwick, 1983; Madhavan, 1967).

Algunos de los efectos en las plantas son: el enanismo, inhibición de la producción de clorofila y de la germinación (Crisan, 1973). También puede haber alteraciones a nivel de cromosomas (fragmentación), inhibición de mitosis y aumento en la frecuencia de anafases anormales (Lilly, 1965). Otros efectos de las aflatoxinas sobre granos a nivel estructura celular son: inhibición de la formación de grana en cloroplastos y reducción del número de ribosomas (Wyllie & Morehouse, 1978).



### 3. **Metabolismo de las aflatoxinas.**

La AFB1 se absorbe principalmente en el duodeno (Kumagai, 1989) y en el hígado se realizan las transformaciones metabólicas (OPS-OMS, 1983; Irvin, 1987) por el sistema microsomal de oxidasas de función mixta, que es una organización compleja de enzimas de las células hepáticas NADPH dependientes, unida al citocromo P450 (Yoshizawa *et al.*, 1982; Wheeler *et al.*, 1987; Shayiq & Avadhani, 1989; Kumagai, 1989).

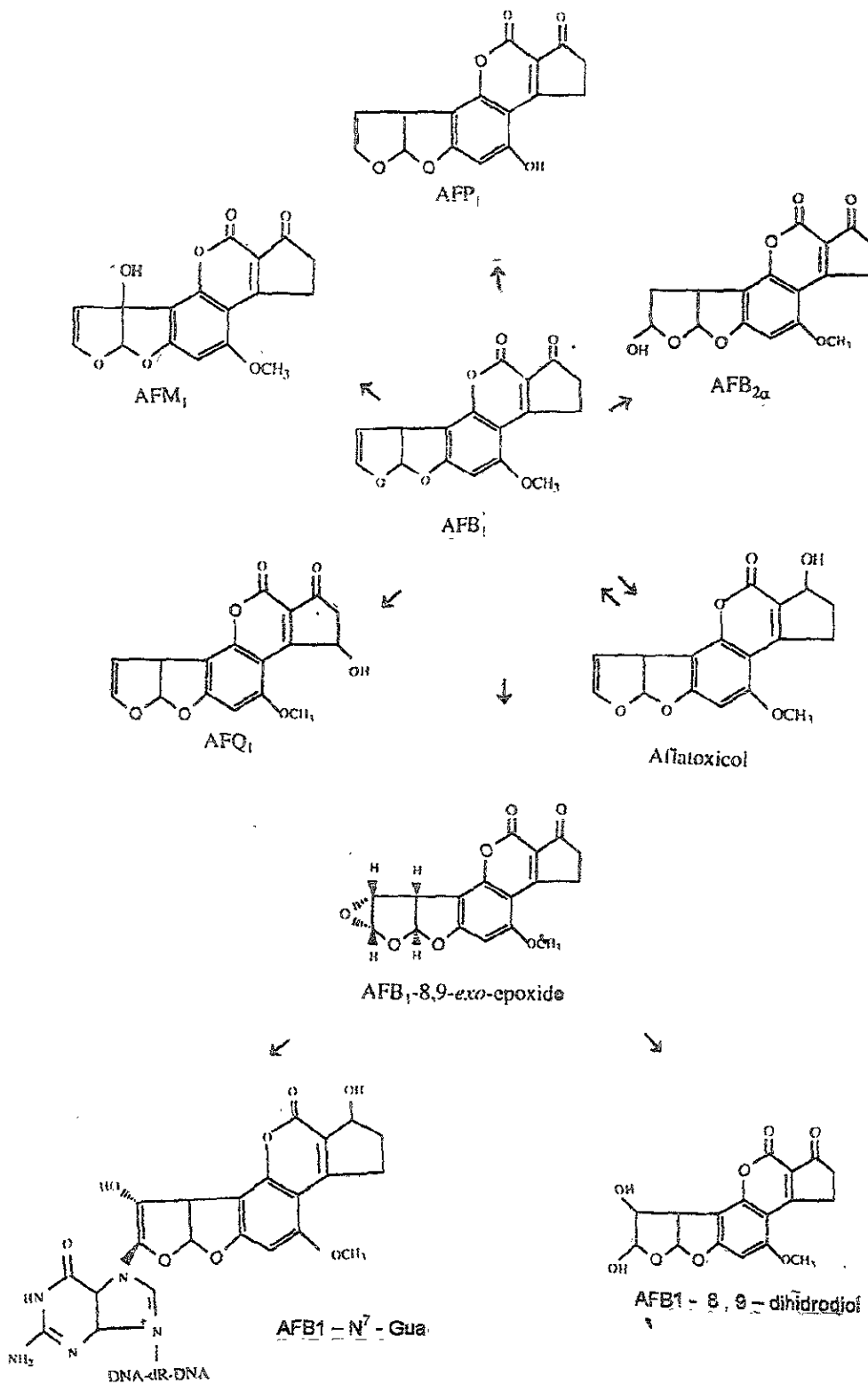


Figura 4. Vías metabólicas de la AFB<sub>1</sub> (Massey *et al.*, 1985).

El metabolismo de la AFB1 involucra cuatro tipos de reacciones: alquilación, epoxidación y cetorreducción (Figura 4). La reducción de la AFB1 a aflatoxicol es catalizada por una reductasa dependiente de NADPH, las otras reacciones son catalizadas principalmente por una superfamilia de mono-oxigenasas no específicas, dependientes del citocromo P450, aunque pueden participar otros sistemas de activación, como los mecanismos dependientes de hidroperóxidos de lípidos, que son reacciones que pueden ser catalizadas por la prostaglandina H sintetasa microsomal y por lipo-oxigenasas citosólicas (Massey *et al.*, 1995).

Las prostaglandinas H sintetasas son importantes en el metabolismo xenobiótico, pues catalizan la oxidación del ácido araquidónico a radicales peroxilipídicos, los cuales son agentes epoxidantes (Eling *et al.*, 1990). Con base en que la activación de la AFB1 se lleva a cabo por epoxidación, es factible que la AFB1 también pueda activarse por estas enzimas. Esta activación puede ser muy importante en la citotoxicidad química, carcinogenicidad y teratogenicidad, especialmente en tejidos extrahepáticos, porque la actividad de estas enzimas es mayor en riñón, pulmón y tejidos embrionarios; mientras que la actividad total del P450 en esos órganos es menor que en el hígado. La cinética de activación de la AFB1 sugiere que es catalizada por la lipoxigenasas, que ocurre a bajas concentraciones de sustrato, esto es importante debido a que el hombre siempre está expuesto a bajas concentraciones de aflatoxinas en su dieta (Yoshimoto *et al.*, 1986; Mitchell *et al.*, 1985; Datta *et al.*, 1993)

Con una sola excepción, todas las biotransformaciones primarias de la aflatoxina B1 involucran su conversión a metabolitos hidroxilados, pero sólo uno de sus derivados, la aflatoxina M1, tiene una toxicidad oral apreciable (Holzapfel *et al.*, 1966). Incluso este metabolito se puede destoxificar mediante conjugación con ácido taurocólico y glucurónico antes de la excreción en bilis u orina (Bassir & Osiyemi, 1967). A este respecto, dos metabolitos: aflatoxina P1 (AFP1) (Dalezios *et al.*, 1971; Büchi *et al.*, 1973) y aflatoxina Q1 (AFQ1) (Masri *et al.*, 1974 a,b) son similares dado que tienen también este tipo de destoxificación (Dalezios & Wogan, 1972).

Otros metabolitos que participan en la toxicidad de la AFB1 son el aflatoxicol que es un reservorio de la AFB1 debido a que su formación es reversible (Campbell & Hayes, 1976) y el 8,9-dihidrodiol, el cual participa en la toxicidad aguda de la AFB1 (Hayes *et al.*, 1993).

La conversión en el hígado de la AFB1 a aflatoxicol (Patterson & Roberts, 1971) y a aflatoxicol H1 por vía de la AFQ1 (Salhab & Hsieh, 1975) es atípica, porque a diferencia de otras biotransformaciones catalizadas por enzimas microsómicas hepáticas, interviene una deshidrogenasa citoplásmica dependiente de NADH. Además, la formación de aflatoxicol puede ser inhibida por hormonas sexuales 17-cetosteroides (Patterson & Roberts, 1972 a).

Cuando cualquiera de las toxinas parentales se incubaba con microsomas de hígado de muchas especies animales, incluido el hombre, se forma un metabolito que al parecer sólo tiene una existencia efímera, es sumamente reactivo y es capaz de unirse covalentemente al ADN e inducir mutaciones en un sistema bacteriano experimental *in vitro* (Garner *et al.*, 1971, 1972; Ames *et al.*, 1973 b). Aunque no se ha aislado el metabolito de la AFB1, se ha recuperado el producto intermedio 2,3-dihidrodiol AFB1, después de una hidrólisis ácida de un aducto formado a partir de un metabolito microsómico generado en presencia de ADN o ARN (Swenson *et al.*, 1974) y, posterior a una inoculación intraperitoneal *in vivo* de la AFB1 (Swenson *et al.*, 1977). Se cree que ésta es la evidencia indirecta de la formación del 8,9 epóxido de AFB1 (también llamado antiguamente 2,3-epóxido) que es la forma activada por oxígeno y entonces ya puede interactuar con el ADN, se acepta que el epóxido de AFB1 es el mutágeno bacteriano y el responsable de la carcinogenesis.

Estas biotransformaciones se desarrollan en algunas especies animales mejor que en otras (Patterson, 1977), y se han hecho ensayos para correlacionar el metabolismo hepático de las aflatoxinas con la toxicidad. En el primero de esos ensayos (Patterson, 1973) se propuso que la rápida formación *in vitro* del intermediario llamado hemiacetal aflatoxínico estaba correlacionada con la susceptibilidad a la intoxicación aguda.



#### 4. Mutagenicidad y efecto cancerígeno de la AFB1.

##### 4.1 Mutagénesis.

La AFB1 causa aberraciones cromosómicas y rupturas de ADN en células vegetales y animales (Ong, 1975) así como mutaciones de genes en sistemas bacterianos experimentales (prueba de Ames) cuando se activan por preparaciones microsómicas de hígado de rata o humano (Wong & Hsieh, 1976).

De las acciones tóxicas asociadas a la exposición por AFB1 las más importantes son la mutagenicidad y carcinogenicidad, las cuales han sido asociadas a una activación metabólica de la molécula. La AFB1 por sí misma, no es mutágena ni se une covalentemente a macromoléculas como el ADN en ausencia de un sistema de bioactivación o sea su oxidación para formar el epóxido (Massey *et al.*, 1995). La activación de la AFB1 a la forma epóxica (8-9 epóxido de AFB1) es necesaria para que la AFB1 manifieste sus efectos mutágenos y cancerígenos. Así, la AFB1 es biotransformada a un exo o endo epóxido, siendo únicamente el exo-epóxido el que reacciona con el ADN (Lyer *et al.*, 1994).

La AFB1 se une a proteínas como albúmina, ovalbúmina y al ADN, formando conjugados o aductos, los cuales se pueden detectar en la sangre, orina y tejidos del organismo que las ingirió. Los aductos en tejidos son la medida de exposición crónica a las aflatoxinas y reflejan el bombardeo que ha sufrido el ADN en años de exposición. En fluidos corporales el aducto AFB1- N7-Guanina se elimina en un 70 %, lo cual indica una medida de reparación del ADN frente a las aflatoxinas que se forman; los aductos de AFB1- N7-Guanina se pueden eliminar por orina o permanecer en los tejidos tumorales (Croy *et al.*, 1978; Bennett *et al.*, 1981; Garner, 1985; Harrison *et al.*, 1991), pero otros que son los FAPY (aductos de AFB1 unidos a pirimidinas) se acumulan con el tiempo y llegan a producir mutaciones, que pueden iniciar el proceso canceroso, pues son activadores del proto-oncogén H-ras (Lin *et al.*, 1977).

La mutagenicidad y la carcinogenicidad de la AFB1 resulta de la activación de AFB1 a AFB1-8,9-epóxido. Este compuesto no ha sido aislado de sistemas biológicos debido a su reactividad, pero el principal aducto de ADN formado *in vivo* e *in vitro* en presencia de un sistema de activación es el 8,9-dihidro-8-(N<sup>7</sup>-guanil)-9 hidroxil AFB1

(AFB1-N<sup>7</sup>-Gua) (Essigmann *et al.*, 1982; Gurtoo & Dave, 1975; Campbell & Hayes, 1976; Harrison & Garner, 1991; Ball *et al.*, 1990).

Se ha reportado que la presencia de un aducto AFB1-ADN por cada 1000000 de nucleótidos, induce el desarrollo de tumores en ratas alimentadas con AFB1. Y a medida que una persona envejece, su ADN acumula más agentes cancerígenos capaces de producir una mutación e iniciar un cáncer (Harrison *et al.*, 1993).

Con respecto a las alteraciones genéticas en la carcinogénesis por AFB1, se ha descrito que la citosina es un posible blanco para la AFB1, ya que Yu *et al.* (1991), encontraron inhibición de la síntesis de ARN dirigida por la polidesoxicitosina, así como inhibición en la formación de las uniones covalente de las bases. Sin embargo, el N<sup>7</sup> de la guanina parece ser el único sitio de formación de aductos AFB1-ADN en hígado humano, y además la guanina es el sitio preferencial de mutación cuando la AFB1 se metaboliza por la enzima CYP1A2 (Crespi *et al.*, 1991). La formación de aductos de AFB1-Guanina depende de las bases que flanquean a la guanina, por ejemplo, hay baja eficiencia de unión cuando la guanina está flanqueada por secuencias ricas en Adenina (A) - Timina (T), mientras que si está flanqueada por otra guanina aumenta la eficiencia de unión. El aducto de AFB1-Guanina formado, es muy inestable por lo cual puede desprenderse del ADN dando como resultado un sitio apurínico o bien el anillo de imidazol se abre y forma el compuesto 8,9-dihidro-8-(N5-formil-2,5,6-triamino-4-oxo-N5-pirimidil)-9-hidroxi aflatoxina B1 (Lin *et al.*, 1977), que es la forma más estable del aducto AFB1-ADN.

## 4.2 Carcinogénesis.

Factores de diversos tipos pueden modificar los efectos cancerígenos y otros efectos tóxicos de las aflatoxinas. Entre ellos figuran factores propios del huésped, particularmente las características endócrinas y las vinculadas con el sexo (Butler, 1964; Newberne & Wogan, 1968; Ward *et al.*, 1975; Butler *et al.*, 1969), y las interacciones con otros factores ambientales. Los efectos de los nutrientes merecen particular atención en vista de las deficiencias nutricionales que se advierten en ciertos países donde puede ser considerable la exposición a las aflatoxinas (Madhavan & Gopalan, 1968; Newberne 1974; Rogers, 1975; Newberne & Gross, 1977; Temcharoen *et al.*, 1978; Reddy *et al.*, 1973; Friedman & Mohr, 1968). Se ha

reportado que la luz, la riboflavina y los carotenos afectan la respuesta de las ratas a una toxicidad aguda por aflatoxinas (Newberne *et al.*, 1974; Joseph-Bravo *et al.*, 1976).

Aunque no se conocen los mecanismos por los cuales las hormonas, la nutrición y otros factores influyen en la carcinogénesis inducida por aflatoxinas, se estima que incluyen efectos sobre la síntesis de ADN, la división y diferenciación celulares, y/o efectos sobre el metabolismo y la excreción de aflatoxinas. Los animales con una ingesta de energía restringida son menos susceptibles que los animales normales a la acción de muchos cancerígenos. El retardo del crecimiento inducido por una fuerte deficiencia proteínica y también por hipofisectomía puede explicar la menor incidencia de tumores en dichos animales. En estudios de la mutagenicidad de la AFB1 con cepas de *Salmonella typhimurium*, se observa una diferencia entre las preparaciones hepáticas microsómicas de ratas alimentadas con una dieta deficiente en compuestos lipídicos, y las provenientes de ratas normales. La excreción de mutágenos en la orina es también distinta en las ratas con deficiencia de lípidos (Suit *et al.*, 1977).

En ratas pretratadas con fenobarbital, y también en animales sometidos a hipofisectomía, se encontraron cambios en el metabolismo de la AFB1 y niveles reducidos de aductos de AFB1-ADN ligados a macromoléculas de células hepáticas (Garner, 1975; Swenson *et al.*, 1977).

Los efectos cancerígenos de las aflatoxinas han sido probados en diferentes especies animales: ratas (Svoboda *et al.*, 1966; Epstein *et al.*, 1969; Butler, 1969), ratones (Wogan, 1973; Vesselinovitch *et al.*, 1972), monos (Gopalan *et al.*, 1972; Tilak, 1975; Adamson *et al.*, 1976), patos (Carnaghan, 1965), hurón (Butler, 1969), truchas arco iris (Sinnhuber *et al.*, 1968) y salmones, entre otros (Wales & Sinnhuber, 1972; Sato *et al.*, 1973; Sinnhuber & Wales, 1974).

Además de los carcinomas hepatocelulares, otros de los tumores relacionados con la exposición a aflatoxinas son los carcinomas de colon (Newberne & Suphakarn, 1977) y los carcinomas de estómago (Butler & Bearn, 1966) ambos de ratas. Ocasionalmente se ha reportado la inducción de otros tumores extrahepáticos después de la exposición oral a las aflatoxinas, por ejemplo, tumores



de las glándulas lagrimales (Dickens *et al.*, 1966; Goodal & Butler, 1969; Butler *et al.*, 1969), carcinomas de las células escamosas de la lengua (Ward *et al.*, 1975) y del esófago (Butler *et al.*, 1969).

Se ha observado una relación entre ingestión de aflatoxinas y cáncer hepático (Wogan *et al.*, 1974; Alpert *et al.*, 1971), por ejemplo en los estudios realizados por Shank *et al.* (1972 a,b,) en Tailandia, Peers & Linsell (1973) en Kenya, Van Rensburg *et al.* (1974) en Mozambique y Peer *et al.* (1976) en Swazilandia, las concentraciones reales de aflatoxinas en comidas para consumo se relacionaron con la incidencia del hepatoma primario en las localidades donde se obtuvieron las muestras de comida, se encontró una relación entre la exposición aflatoxínica y las tasas de incidencia de hepatomas existentes en las localidades estudiadas. En Kenya y Swazilandia, Peers & Linsell (1977), demostraron una relación significativa entre el aumento en la incidencia de cáncer hepático, con un incremento en la ingesta de aflatoxinas; este efecto fue más pronunciado en los hombres que en las mujeres. Una diferencia similar parece existir también en las otras zonas estudiadas (Shank, 1977).

Se ha considerado (Linsell & Peers, 1977) la posibilidad de que la infección con el virus de la hepatitis B confunda la relación entre la ingestión de aflatoxinas y la incidencia de cáncer hepático. La infección con hepatitis B es común en los países con elevada incidencia de cáncer hepático primario y la evidencia de exposición previa al virus de la hepatitis B en estos países es más común en los individuos con cáncer hepático que en sujetos normales (Vogel *et al.*, 1970; Reys & Sequeira, 1974; Prince *et al.*, 1975; Chainuvati *et al.*, 1975). No obstante la evidencia actual se inclina en favor de la aflatoxina como un posible e importante determinante de mortalidad en el cáncer hepático primario, aunque el virus de la hepatitis B bien puede ser un cofactor en la etiología (Peers & Linsell, 1977).

Con respecto a la carcinogenicidad de las aflatoxinas, Wogan *et al.* (1971) estudiaron la relación entre las estructuras químicas de éstas y su hepatocarcinogenicidad en ratas Fischer machos y concluyeron que la AFB1 era aparentemente más cancerígena que la AFG1, y que ambas eran mucho más activas que la AFB2.

Se ha sugerido que la formación reversible de aflatoxicol, constituye un "reservorio metabólico" de aflatoxina (Hsieh *et al.*, 1977; Patterson & Roberts, 1972 b), el cual estaría relacionado con la susceptibilidad a la inducción de tumores hepáticos.

Por otro lado, se ha propuesto la hipótesis de que el hígado humano podría ser más resistente a la carcinogénesis por aflatoxinas que el de otras especies, particularmente el de la rata (Salhab & Edward, 1977).

#### 4.2.1 Activación de proto-oncogenes.

Los proto-oncogenes celulares de la familia "ras" codifican la proteína p21, la cual tiene afinidad por guanidin-trifosfato (GTP), las cuales son importantes en la traducción de proteínas. Esas proteínas se activan al asociarse con GTP, y una hidrólisis rápida de éste en presencia de proteínas que activan GTPasa (GAP) las inactiva. Los genes "ras" sufren frecuentemente mutaciones puntuales, y los oncogenes resultantes, que son proto-oncogenes activados, producen proteínas con actividad de GTPasa disminuida, las cuales permanecen activas debido a que hay una disminución de la capacidad de GAP para inducir hidrólisis del GTP en el complejo activo. Es probable que la transmisión continua de señales por las formas mutantes contribuye a la transformación maligna (Anderson *et al.*, 1992), así como el papel de los genes "ras" en la hepatocarcinogénesis por AFB1, con ADN purificado de carcinomas de hígado de ratas Fisher o líneas celulares transformadas con AFB1 y transfectadas en fibroblastos de ratón NIH3T3. El desarrollo de zonas hepáticas transformadas, así como tumorigenicidad de las células transfectadas cuando se inyectan en nódulos hepáticos de ratones atímicos, se observa la presencia de oncogenes en un gran porcentaje de las muestras de ADN provenientes de tumores de hígado, aunque K-ras activado también se observa en pocos tumores. El análisis de secuencias de ADN de tumor, y amplificado enzimáticamente revelan que los tumores con el K-ras activado contienen sustituciones G-C a T-A ó G-C a A-T en el codón 12 (McMahon *et al.*, 1990). Estas mutaciones concuerdan con la aparente importancia de la guanina como un blanco en el ADN.

Considerando los más de 100 genes reconocidos relacionados con cáncer, la mutación en el gen p53 es la alteración genética más frecuentemente asociada con neoplasias. Las funciones de la proteína producida por el gen p53 incluyen: control

del ciclo celular, síntesis y reparación de ADN, diferenciación celular, plasticidad genómica y muerte celular programada (Harris & Hollstein, 1993). Esos efectos están asociados con la modulación de la transcripción mediada por el gen p53 y otros genes involucrados en el control del crecimiento celular, el cual incluye genes supresores y proto-oncogenes.

La elevada frecuencia de mutación específica de G a T en el codón 249 del gen p53 en carcinomas hepatocelulares de humanos que habitan en las áreas de China y África, donde existe ingestión de concentraciones altas de aflatoxinas, son de gran interés para el estudio de las interacciones de la AFB1 con el gen p53. La especificidad de las mutaciones en el codón 249 son muy importantes ya que en otros cánceres humanos se observa un alto índice de mutaciones en el gen p53 (Hollstein *et al.*, 1991).

Respecto al sitio de mutación, hay reportes acerca de la transcripción del ARNm de la AFB1, por activación de un factor 2 de crecimiento similar a la insulina causada por la misma aflatoxina, que induce una mutación en el gen p53 codón 249 y que tiene implicaciones en la formación del carcinoma hepatocelular (Lee *et al.*, 2000).

Hay estudios que muestran que la infección crónica por el virus B de la hepatitis unido a proteína aumenta la susceptibilidad del hepatocito para sufrir mutagénesis inducida por AFB1 o bien por su epóxido, posiblemente a través de la alteración del balance entre la reparación del ADN y la apoptosis, dos mecanismos de defensa celular contra el estrés genotóxico (Sohn *et al.*, 2000).

Cambios en el codón 249<sup>ser</sup> pueden tener repercusiones biológicas importantes en la proteína p53, como el de inducir un crecimiento agresivo de hepatocitos mutantes en los tejidos de hígado infectados de manera crónica con el virus de la hepatitis B, lo cual podría aumentar la frecuencia de esta mutación en tumores avanzados. Sin embargo, no todas las evidencias apoyan la importancia de las mutaciones del gen p53 en el codón 249, ya que en un análisis de ADN de 9 carcinomas hepatocelulares y de otros tumores de monos tratados con AFB1, no se encontró mutación en el codón 249 y sólo uno de los tumores mostró una mutación en la región conservada del p53, la cual no incluye el codón 249. Con base en estos datos, Fujimoto *et al.*, (1992), sugirieron que las primeras observaciones en el ADN de tumores humanos eran el resultado de diferencias en la estructura de los genes, metabolismo, presencia de hepatitis activa crónica inducida por el virus de la hepatitis B o bien que cancerígenos diferentes a la AFB1, eran responsables de las mutaciones en el codón 249.

También comparando tumores de pacientes que habitan en áreas con alto y bajo riesgo de daño por aflatoxinas, la frecuencia de mutaciones del codón 249 del gen p53 no correlacionó con la frecuencia de aductos de ADN-AFB1 (Atkinson *et al.*, 1993), por lo que la importancia de las mutaciones en el gen p53 para la toxicidad de la AFB1 es aún controversial.



## 5. Métodos de análisis de aflatoxinas.

El análisis de las micotoxinas comprende el muestreo, extracción, purificación, separación, identificación y cuantificación de estas toxinas.

Las aflatoxinas no se producen uniformemente en los productos agrícolas, por ejemplo se ha demostrado que dentro de un mismo lote de granos de maíz algunas zonas pueden contener cantidades significativas de aflatoxinas, mientras que otras zonas pueden estar libres de ellas.

Para la inspección de granos y semillas se toman muestras periódicas durante las operaciones de carga hacia el vehículo de transporte y descarga a las bodegas o al sitio de consumo, ambas muestras se juntan, se homogenizan y se reduce el tamaño de una muestra representativa de unos cuantos kilos (para maíz debe ser de 5 kg) (Davis *et al.*, 1980).

Para la identificación y cuantificación de las aflatoxinas se han desarrollado diversos métodos inmunológicos (Groopman *et al.*, 1982 y 1988; Fan and Chu, 1984; Hsieh *et al.*, 1988) y químicos (Pestka, 1988; Jones, 1972; Horwitz *et al.*, 1975, Romer, 1975) y biológicos (Carnaghan *et al.*, 1963; Holzapfel *et al.*, 1966; Purchase, 1967; Ames, 1971 y 1973 a y b). Los primeros tienen una alta sensibilidad y especificidad, y no requieren de una exhaustiva limpieza química de la muestra como en la cromatografía de líquidos, lo que disminuye su costo y permite procesar un gran número de muestras en un corto tiempo. Los métodos inmunológicos se basan en la reacción antígeno-anticuerpo y pueden ser del tipo del Radio inmunoanálisis si el compuesto marcado es un radioisótopo (Langone & Van Vunakis, 1976) ó Enzimo inmunoensayos, si el compuesto marcado es una enzima (Ishikawa, E. & Kato, K. 1977; Chu, 1984; Chu *et al.*, 1987), como es el caso del método de ELISA (Park & Rua, 1991).

Los métodos químicos posibilitan la detección de las aflatoxinas y su cuantificación. Los principales métodos cromatográficos son: en capa fina (CPF), (Peckok & Shields, 1983) y la cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC) (Yen & Bidasee, 1993; Guattocchi, 1992).

La columna empleada para analizar AF por HPLC es del tipo RP C<sub>18</sub> que es de gel de sílice (Garner *et al.*, 1993). Se emplea la cromatografía de partición o fase reversa (RP), el detector puede ser de ultravioleta o de fluorescencia y es importante el sistema de solventes que se usen. Para incrementar la fluorescencia de las AF, éstas se derivatizan con yodo, bromo o ácido trifluoroacético (Kok, 1994).

Los métodos biológicos usan animales o vegetales para detectar aflatoxinas en alimentos contaminados (Allcroft, 1969; Butler, 1969; Newberne & Butler, 1969; Butler, 1974), midiendo el grado de proliferación biliar como índice semicuantitativo. Diferentes especies animales muestran variaciones de susceptibilidad a la intoxicación aguda por AFB<sub>1</sub>, con valores DL<sub>50</sub> de 0.3 a 17.9 mg / kg de peso corporal. El principal órgano receptor, en estos es el hígado (Allcroft & Lewis, 1963; Sargeant *et al.*, 1961; Madhavan *et al.*, 1965; Bourgeois *et al.*, 1971; Wogan *et al.*, 1971; Patterson, 1976). Un método muy usado en las actividades de fiscalización es la biovaloración en embrión de pollo, al aplicar 0.1 – 0.2 µg de AFB<sub>1</sub> a la membrana del huevo y registrar el índice de mortalidad durante los 23 días del período de incubación (Horwitz, *et al.*, 1975). Se han implementado otros procedimientos valorando el crecimiento en plántulas de maíz, muerte de larvas de pez cebra y de camarones, bacterias, etc. (Goldblatt, 1969; Ciegler *et al.*, 1971).

Otro método biológico para detectar agentes genotóxicos es la prueba de Ames, que detecta mutágenos mediante el uso de cepas de *Salmonella typhimurium*, seleccionadas por su sensibilidad y especificidad de revertir el requerimiento del aminoácido histidina por los mutágenos probados (Ames, 1971; Ames *et al.*, 1973b y 1975). Esta prueba detecta agentes químicos que potencialmente pueden ser mutágenos o cancerígenos humanos, por la adición de homogenados de microsomas de hígado de rata o de humanos directamente a las cajas de Petri, incorporando de esta manera un aspecto importante del metabolismo de los mamíferos a las pruebas *in vitro*.

La prueba de Ames, también se utiliza para realizar estudios sobre el control de la AFB1, como por ejemplo: un extracto etanólico de melón amargo (*Momordica charantia* L.) (Chiampanichayakul *et al.*, 2001) que inhibe la mutagenicidad de la AFB1 determinada por la prueba de Ames, control por olitipraz, que es un 1,2-ditio-3-ol, usado inicialmente como agente antischistosomico, reduce la excreción de AFB1 y AFM1 en ratones, y (Kensler *et al.*, 2000), y el estudio de las propiedades antimutágenas de algunos tés de hierbas de Sudáfrica, los cuales disminuyen la mutación de *S. typhimurium* en la prueba de Ames (Marnewick *et al.*, 2000).

## 6. El maíz

### 6.1 Clasificación taxonómica.

La clasificación taxonómica del maíz (Reyes, 1990) es:

Reino	Plantae
División	Tracheophyta
Subdivisión	Pteropsidae
Clase	Angiospermae
Subclase	Monocotiledoneae
Grupo	Glumiflora
Orden	Graminales
Familia	Poaceae
Tribu	Maydeae
Género	<i>Zea</i>
Especie	<i>mays</i>

### 6.2 Razas y variedades botánicas.

En México, las miles de variedades de maíz dispersas en su territorio se han agrupado en 30 razas y 6 subrazas. Las 30 razas clasificadas (Reyes, 1990) pueden dividirse en 5 grupos principales como sigue:

- Indígenas antiguas: Palomero toluqueño, Arrocillo amarillo, Chapalote y Nal-Tel.
- Exóticas Pre-colombinas: Cacahuacintle, Harinoso de ocho, Olotón y Maíz dulce.
- Mestizas prehistóricas: Cónico, Reventador, Tabloncillo, Tehua, Tepecintle, Comiteco, Jala, Zapalote chico, Zapalote grande, Pepitilla, Olotillo, Tuxpeño y Vandeño.

- d) Modernas incipientes: Chalqueño, Celaya, Cónico norteño y Bolita.
- e) Serranas occidentales: Tablilla de 8, Bofo, Gordo, Azul y Apachito.

Antes del conocimiento actual de las razas del maíz, se subdividió a *Zea mays* en subespecies o variedades botánicas, en función de la calidad, cantidad y patrón de composición del endospermo.

Estas variedades según Reyes, 1990 y González, 1995, son:

- a) Maíz dentado (*Zea mays indentata*). Tiene una cantidad variable de endospermo córneo (duro) y harinoso (suave). La parte córnea está a los lados y detrás del grano, mientras que la porción harinosa se localiza en la zona central y en la corona del grano. Se caracteriza por una depresión o "diente" en la corona del grano, que se origina por la contracción del endospermo harinoso a medida que el grano va secándose, en éste se incluye el grupo más cultivado en el mundo. En México, las cuatro razas más relevantes son: la raza Celaya, Tuxpeño, Vandeño, Jala.
- b) Maíz cristalino (*Zea mays indurata*). Contiene una gruesa capa de endospermo cristalino, que cubre un pequeño centro harinoso. Generalmente el grano es liso y redondo.
- c) Maíz harinoso (*Zea mays amyfacea*). Se caracteriza por un endospermo cristalino, es muy suave, semidentado o de corona redonda, muy susceptible a plagas de almacén y al ataque por hongos. Incluye un conjunto de variedades de peso ligero, entre ellas, el maíz pozolero (raza Cacahuacintle) y el maíz "Cuzco"; que son notables por su rico contenido de lisina y triptofano.
- d) Maíz dulce (*Zea mays saccharata*). Estos son dentados, cristalinos o palomeros, que han perdido la propiedad de producir almidón. En este tipo de maíz, la conversión del azúcar en almidón es retardada durante el desarrollo del endospermo. El aspecto de un grano dulce es arrugado y vítreo.
- e) Maíz palomero (*Zea mays everta*). Conocido como maíz rosero, reventador o revienta ollas. Es una de las razas más primitivas y es una forma extrema de maíz cristalino. Se caracteriza por un endospermo cristalino muy duro, que solamente tiene una pequeña porción de endospermo harinoso. Sus granos son redondos o puntiagudos. Las razas indígenas antiguas: palomero toluqueño y Nal-Tel, son una modalidad de este tipo de maíz.

- f) Maíz tunicado (*Zea mays tunicata*). Se caracteriza porque cada grano está encerrado en una vaina o túnica.
- g) Maíz céreo (*Zea mays cerea*). El grano tiene un endospermo con fractura semejante a la cera, y su aspecto es vítreo.

### 6.3 Composición química y valor nutritivo.

La composición química del maíz es variable y está relacionada con: estadio, raza, variedad, tecnología del cultivo y clima, de la parte de la planta o del grano que se analice, de las técnicas y métodos de análisis.

En general, el maíz tiene un alto valor nutritivo como fuente de energía, por su gran contenido de carbohidratos, pero no posee las suficientes proteínas, tanto en cantidad como en calidad y es incompleto en dos aminoácidos esenciales: lisina y triptofano; además es insuficiente en niacina y en minerales, excepto en calcio.

La Figura 5 es el diagrama de un grano de maíz con el nombre de sus partes y la Tabla 2 indica la composición promedio de la materia seca del grano entero.

El endospermo incluye el 82 % del grano y contiene la mayor cantidad de almidón y las proteínas: albúmina, globulinas, zeína y glutelinas, y en escasas cantidades grasas, cenizas y azúcares.

El embrión incluye el 12 % del grano, contiene la mayor cantidad de grasa del grano, almidón, cenizas y azúcares. Sus proteínas (albúminas, globulinas, glutelinas y escasa zeína), son más nutritivas desde el punto de vista biológico.

El pericarpio incluye el 6 % del grano, contiene almidón, grasa, proteína, cenizas, azúcares y fibra (celulosa y hemicelulosa) (Reyes, 1990).



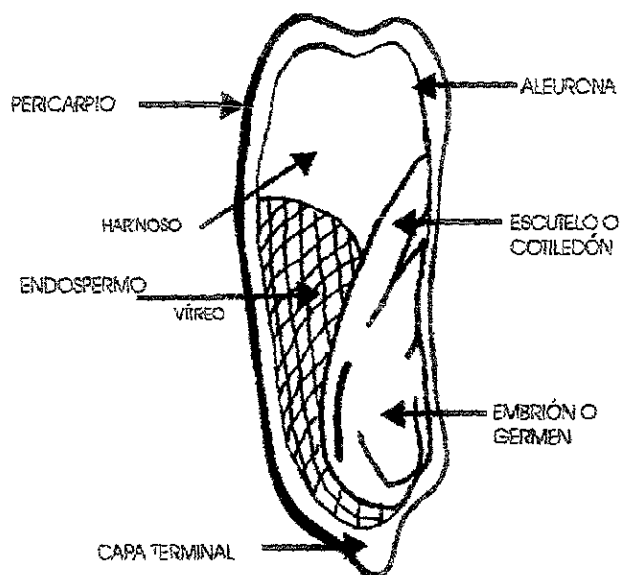


Figura 5. Diagrama de un grano de maíz (Reyes, 1990).

Tabla 2. Composición promedio de la materia seca del grano entero de maíz (Reyes, 1990).

Componente	Porcentaje %
Almidón	72.40
Grasa (aceite)	4.70
Proteína	9.60
Cenizas	1.43
Azúcares	1.94
Fibra	9.93

## 7. Anatomía y fisiología del aparato digestivo humano.

El tubo digestivo está formado esencialmente por 4 capas que son: la mucosa, la submucosa, la capa muscular y la capa externa (Hammerly, 1972).

El tubo digestivo se halla formado desde arriba hacia abajo por los siguientes órganos: boca, faringe, esófago, estómago, intestino delgado e intestino grueso, recto y ano (Netter, 1990; Hammerly, 1972; Yokochi *et al.*, 1991 ) (Figura 6).

La digestión de los alimentos es un proceso ordenado donde intervienen gran número de enzimas digestivas, de las secreciones de las glándulas salivales, del estómago y de la porción exocrina del páncreas. Otras enzimas se encuentran en las membranas celulares que dan a la luz del intestino delgado. La acción de las enzimas se favorece con el ácido clorhídrico secretado por el estómago y con la bilis secretada por el hígado.

Como resultado final de la digestión, los alimentos quedan reducidos a un número pequeño de sustancias simples, que son: 1) Carbohidratos: los monosacáridos, glucosa, fructosa y galactosa. 2) Grasas: ácidos grasos, glicerina y grasa neutra finamente emulsionada; y 3) Proteínas: gran número de mono- y diaminoácidos (Starling & Hartridge, 1952).

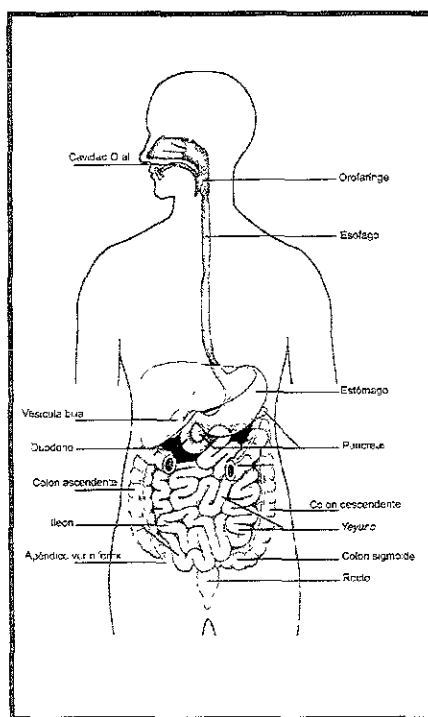


Figura 6. Anatomía del aparato digestivo (Yokochi *et al.*, 1991).

## 7.1 Digestión de carbohidratos.

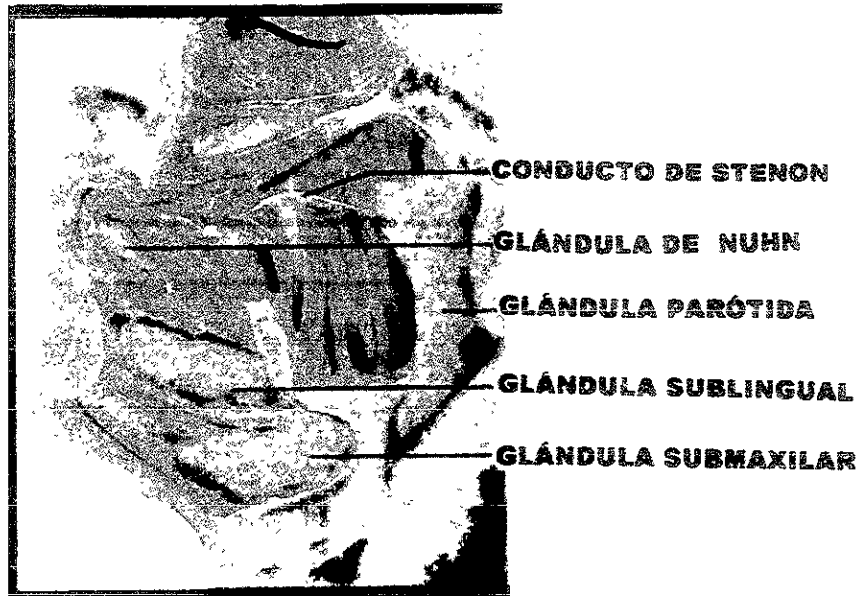
La alimentación humana normal sólo tiene tres tipos principales de carbohidratos: la sacarosa o azúcar de caña, la lactosa y los almidones que se encuentran en casi todos los alimentos, sobre todo en los granos. La mayor parte de carbohidratos ingeridos son almidones y el aparato digestivo los digiere con mucha facilidad.

El almidón natural se compone de 2 polisacáridos: un 25% de amilosa y un 75% de amilopectina, en proporción de 2:1, según su peso molecular de 60 000 y 300 000, respectivamente. El almidón se hidroliza por la acción de la amilasa o el jugo pancreático, siendo el resultado final una mezcla de 4 partes de maltosa y 1 de dextrina estable, que se deriva de la amilopectina. En los estadios intermedios de la reacción se produce primero un almidón soluble o amilodextrina. Éste a su vez se desdobra en un azúcar reductor y otra dextrina, la eritrodextrina, que a su vez continúa la hidrólisis y da lugar a más azúcar reductor y a acrodextrina. Así, la molécula se descompone en una serie de etapas, en cada una de las cuales se libera una molécula de azúcar y se produce una dextrina de menor tamaño (Mouncastle, 1977; Starling & Hartridge, 1952).

## 7.2 Digestión en la boca.

La masticación facilita la deglución, reduce el tamaño de las partículas y las lubrica con la saliva. En el momento de la deglución gran parte del alimento ha sido reducido a partículas de menos de 2 mm de diámetro; en general las partículas más grandes no exceden de 12 mm. La masticación contribuye a la digestión. El contacto prolongado de un alimento sabroso con la mucosa bucal hace que el cerebro acreciente la secreción del jugo gástrico y prepara el estómago para una acción más eficaz sobre las sustancias alimenticias que se van a ingerir. Cuanto más reducido sea el tamaño de las partículas, mayor será la superficie del alimento ingerido, y estarán más expuestas a la acción de las enzimas de la saliva y del jugo gástrico. Una copiosa salivación permite una digestión gástrica de los almidones más completa antes de que el bolo alimenticio se ponga en contacto con el ácido clorhídrico del jugo gástrico (Netter, 1990).

La saliva proviene de la secreción de 3 pares de glándulas: las parótidas, las submaxilares y las sublinguales (Figura 7).



**Figura 7. Glándulas salivales (Yokochi *et al.*, 1991).**

La cantidad de saliva secretada por día varía entre 1000 y 1500 mL, su pH es entre 6.2 y 7.6. Su turbidez se debe a la presencia de una serie de células epiteliales descamadas, linfocitos y grumos de mucina. La saliva que fluye libremente suele ser alcalina y la que se secreta en estado de reposo es en general ácida. Con el tiempo al calentarse, pierde  $\text{CO}_2$ , volviéndose alcalina y turbia, debido al depósito de sales de calcio. La viscosidad varía según el tipo de estímulo y ritmo de secreción. Las glándulas parótidas producen saliva acuosa con proteínas, sales y ptialina, pero sin moco. Las glándulas sublinguales son predominantemente de tipo mucoso y las glándulas submaxilares de tipo intermedio con predominio de secreción serosa. La saliva es hipotónica y su presión osmótica aumenta a medida que aumenta la secreción (Starling & Hartridge, 1952).

Los principales componentes de la saliva son la mucina, la ptialina, indicios de proteínas coagulables, sulfocianuro potásico, urea, ácido úrico. Los componentes inorgánicos incluyen los aniones  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{PO}_4^-$  y  $\text{HCO}_3^-$ , y los cationes  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ . También contiene una pequeña cantidad de tiocianato que posiblemente actúa como coenzima, pues puede activar la ptialina en ausencia de NaCl. Además, contiene gases, alrededor de 1 cc de  $\text{O}_2$ , 2.5 cc de  $\text{N}_2$  y 50 cc de  $\text{CO}_2$  (Netter 1990; Starling & Hartridge, 1952).

La única enzima salival, la ptialina ( $\alpha$ -amilasa), secretada principalmente por las glándulas parótidas y submaxilares, actúa sobre el almidón, preferiblemente el cocido (ya que la mayor parte de almidones se encuentran agrupados en pequeñas masas cubiertas por una delgada capa de protección), haciéndolo primero soluble y luego desdoblándolo en dextrina (eritrodextrina y luego acrodextrina); por último, la dextrina se transforma en maltosa. Sin embargo, como los alimentos permanecen poco tiempo en la boca, y al producirse la deglución no han sido transformados en maltosa más de 3 a 5 % de almidones. Una pequeña cantidad de maltosa puede transformarse en glucosa por acción de la maltasa sobre la maltosa.

Aunque la masticación no es prolongada, los alimentos al llegar al estómago no se mezclan de inmediato con el jugo gástrico, sino que una buena parte queda por un tiempo (30 a 40 minutos) sin ser sometida a la acción de dicho jugo y, en cambio, puede obrar sobre ellos la ptialina de la saliva hasta que la reacción ácida del jugo gástrico lo impida. De tal forma puede decirse que la parte más importante de la digestión salival ocurre, en realidad, en el estómago, produciendo una transformación en gran escala del almidón en dextrinas y maltosa (Hammerly, 1972; Starling & Hartridge, 1952).

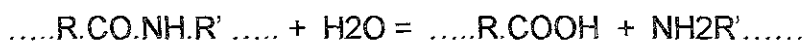
### **7.3 Digestión en el estómago**

Transcurridas varias horas después de la ingestión de alimento, el estómago normal rara vez está vacío, sino que contiene de 30 a 50 cc de un líquido compuesto de jugo gástrico, moco, saliva y contenido duodenal regurgitado. A los cinco minutos de entrar los alimentos en la boca, comienza la secreción de jugo gástrico por glándulas

tubulares que integran la mayor parte de la mucosa del estómago. Conforme el alimento va siendo deglutido en porciones sucesivas, se acumula, formando una masa en el cuerpo del estómago, masa en la que el jugo gástrico penetra con dificultad, de tal manera que la digestión salival puede continuar por más tiempo. La secreción del jugo gástrico continúa durante muchas horas, y en el hombre después de una comida abundante alcanza 500 cc o incluso más (Starling & Hartridge, 1952). Conforme avanza la mezcla de los alimentos con el jugo gástrico, el ácido inhibe la actividad de la amilasa salival, cuyo poder enzimático desaparece cuando el pH cae por debajo de 4.0. Sin embargo, un promedio de 30 a 40% de almidones ha sido transformado en maltosa antes que los almidones se hayan mezclado completamente con el jugo gástrico. El ácido del jugo gástrico es capaz de hidrolizar en parte los almidones y los disacáridos (Figura 8).

La acción del jugo gástrico se debe sobre todo a la acción combinada del ácido y las enzimas gástricas (Netter, 1990). La principal función digestiva del jugo gástrico va ligada a la acción de la pepsina, la cual se halla almacenada en las células principales en forma de pepsinógeno. Con un pH inferior a 6, el pepsinógeno se transforma en pepsina, reacción que se realiza en forma de autocatálisis, o sea que la pepsina libre activa la transformación continuada de pepsinógeno en pepsina. La pepsina tiene una intensa acción proteolítica en solución fuertemente ácida, su pH óptimo es de 1.5 a 2.0. Esta enzima ejerce su actividad proteolítica atacando a los enlaces peptídicos que contienen grupos amino de los aminoácidos aromáticos; esto tiene lugar con la liberación principalmente de proteínas intermedias, y algunos polipéptidos y aminoácidos.

La forma en que la pepsina actúa rompiendo los enlaces peptídicos es la siguiente:



Una vez que esta acción se hace completa, han venido a quedar destruidos por este procedimiento alrededor de la décima parte de los enlaces peptídicos totales de la molécula proteica (Starling & Hartridge, 1952). Otro componente del jugo gástrico es el factor intrínseco que actúa conjuntamente con la cobalamina (vitamina B12) para preparar esta última sustancia para ser absorbida por el intestino (Figura 8).

Por otra parte, el jugo gástrico contiene enzimas proteolíticas, catépsina (de significación indeterminada y origen celular desconocido), una débil lipasa, urea, aminoácidos, histamina y varios iones inorgánicos ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{SO}_4^{=}$  y fosfatos).

El jugo gástrico actúa por un máximo de 8 horas, la degradación proteica nunca va más allá de la fase de proteasas y peptonas, siendo en esta forma y como metaproteína ácida, como las proteínas alimenticias pasan al intestino delgado (Netter, 1990).

#### 7.4 Digestión en el intestino delgado

El contenido del estómago pasa de tiempo en tiempo a la primera porción del duodeno, encontrándose aquí con las secreciones del páncreas, del hígado y de las glándulas tubulares del intestino, así como con la secreción de las glándulas de Brunner. Su acidez se neutraliza, en parte, en el duodeno, cuyo contenido en ayunas tiene un pH de 6.5, que va disminuyendo hasta llegar a 3.5 durante el vaciamiento del estómago; la acidez se reduce más en los segmentos inferiores del intestino, si bien la alcalinidad aparece raras veces, si es que ocurre, ya que el pH del íleon es alrededor de 6.0 a 6.5 (Starling & Hartridge, 1952).

En el intestino delgado, los alimentos que llegan en forma de quimo ácido son sometidos a la acción de tres jugos digestivos: el jugo pancreático, la bilis y el jugo intestinal (Netter, 1990).

El páncreas segrega el jugo pancreático estimulado por una hormona llamada secretina, que se forma al ponerse en contacto con la mucosa duodenal el ácido clorhídrico del quimo proveniente del estómago.

Los componentes del jugo pancreático de mayor interés funcional y clínico son las enzimas: lipasa, amilasa, carboxipeptidasa, tripsina y quimotripsina, de las cuales las tres últimas mencionadas se secretan como enzimas inactivas precursoras que se activan al penetrar en el duodeno. El tripsinógeno pancreático es rápidamente convertido en tripsina por la enzima enterocinasa secretada por la mucosa duodenal y también autocatalíticamente por la propia tripsina (Figura 8).

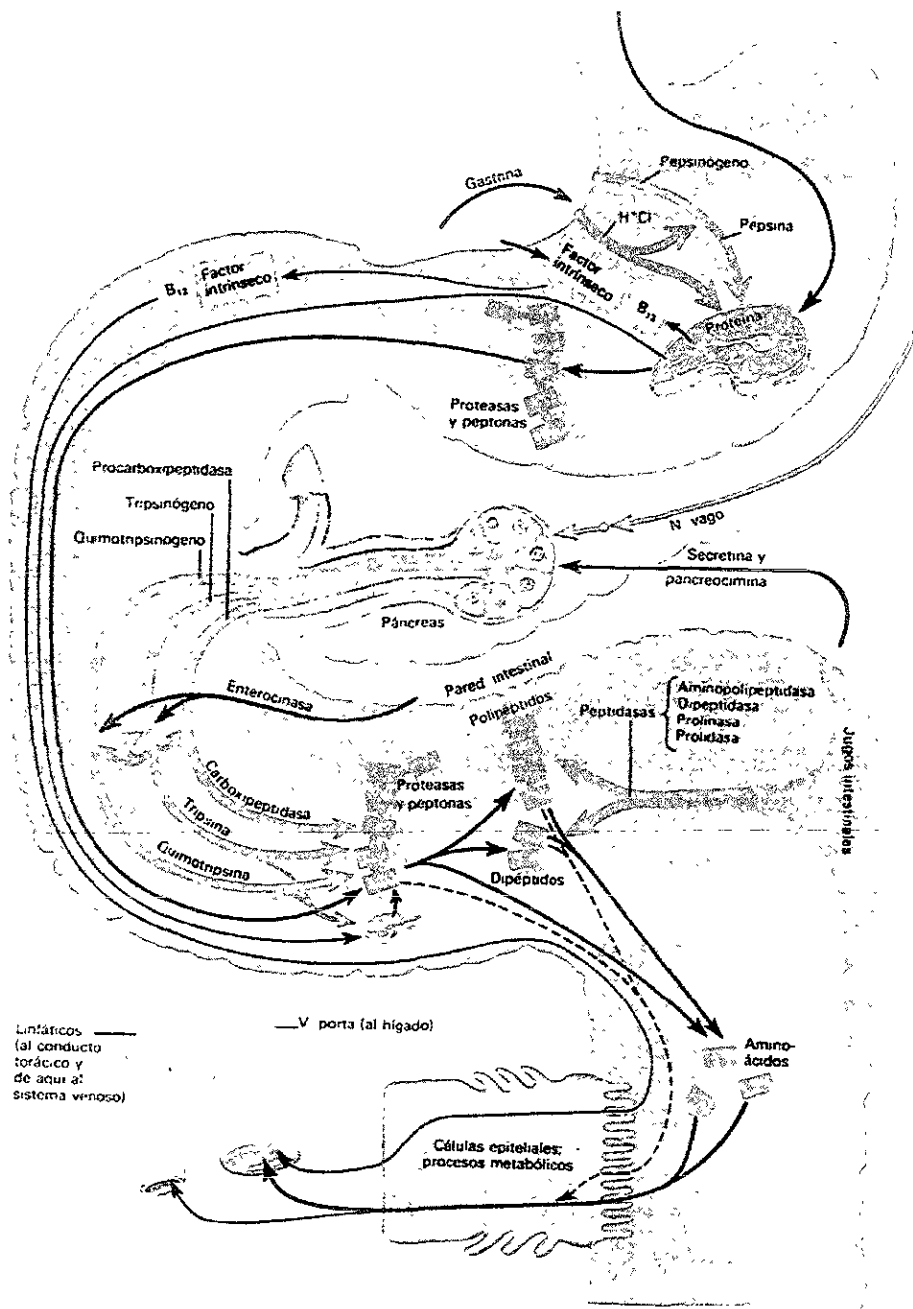


Figura 8. Digestión en el estómago (Netter, 1990).



La tripsina actúa en medio alcalino y desdobra principalmente los enlaces peptídicos en los que el grupo NH está combinado con el CO de la L-arginina o L-lisina. El quimotripsinógeno, segundo precursor proteolítico formado en las células de los acinos, es activado por la tripsina. Es posible que varias quimotripsinas sean el resultado de la activación de un tripsinógeno y que cada una de ellas sea capaz de acciones específicas sobre diferentes tipos de enlaces CO-NH. El precursor inactivo de la carboxipeptidasa es transformado por cantidades catalíticas de tripsina a la forma activa, la cual hidroliza los enlaces CO-NH adyacentes al extremo carboxílico, tanto en las proteínas como en los péptidos. Para la óptima actividad de estas enzimas proteolíticas es necesario un medio ligeramente alcalino (pH 7 a 9).

La lipasa o lipasas pancreáticas hidrolizan los enlaces éster de los triglicéridos ingeridos en sus componentes ácidos grasos y glicerol, también a un pH de 7 a 9. La acción de esta enzima es grandemente facilitada por la acción de la bilis, que emulsiona las grasas.

Amilasa pancreática e Intestinal. Al igual que la saliva, el jugo pancreático contiene gran cantidad de  $\alpha$ -amilasa, capaz de transformar los almidones en maltosa e isomaltosa. La secreción intestinal también contiene amilasa. Por lo tanto, en cuanto el quimo abandona el estómago y se mezcla con el jugo pancreático, los almidones todavía intactos son digeridos por la amilasa. Por lo regular la conversión de almidones

en maltosa e isomaltosa es casi completa cuando el quimo abandona el yeyuno. demás, la amilasa pancreática parece ser un fermento más potente que la ptialina, ya que puede digerir la mayor parte de almidones sin cocer (membrana celulósica protectora) cosa que no logra la amilasa salival (Guyton, 1967; Starling & Hartridge, 1952).

El jugo intestinal, segregado por las glándulas duodenales es un líquido viscoso, amarillo pálido. Contiene carbonato y bicarbonato de sodio, que le dan una reacción alcalina. Compuesto esencialmente de moco, y su función primaria parecer ser la protección del duodeno proximal contra la acción corrosiva del quimo gástrico. El aparato glandular del yeyuno y del íleon produce el jugo intestinal, cuya importancia en el proceso digestivo resulta difícil de fijar debido a que se mezcla constantemente con la bilis y el jugo pancreático.

La secreción intestinal contiene moco y enzimas, tales como peptidasa, nucleasas, nucleosidasas, fosfatasa, enteroquinasa, sustancia que activa el tripsinógeno del jugo pancreático y fermentos tales como: a) La erepsina que desdobla los polipéptidos en ácidos aminados; b) la maltasa, que desdobla la maltosa en dos moléculas de glucosa; c) la sucrasa (invertasa), que desdobla el azúcar común en glucosa y fructosa; d) la lactasa que desdobla la lactosa en galactosa y glucosa. Hay además en el espesor de la mucosa intestinal fermentos o enzimas que actúan sobre algunos compuestos derivados de ciertas albúminas (ácidos nucleicos, arginina). También se encuentra una lipasa. El intestino delgado segrega la mayor parte de su jugo en sus primeras porciones.

La secreción del intestino grueso está formada por mucus, sales y agua faltando casi por completo los fermentos (Netter, 1990).

La acción de la digestión intestinal sobre los alimentos los reduce a un líquido espeso y lechoso al que se da el nombre de quilo, en el cual las proteínas han sido reducidas a ácidos aminados, los hidratos de carbono se hallan en forma de glucosa y otros monosacáridos, y las grasas en forma de ácidos grasos, glicerina y jabones (Hammerly, 1972).

## **7.5 Digestión en el intestino grueso**

Al intestino grueso, llega un líquido que contiene las sustancias no absorbidas, no digeridas, restos de jugos digestivos, bacterias y células viejas descamadas del intestino delgado.

Por el intestino grueso se eliminan sustancias como calcio, fósforo, hierro y otros minerales (Hammerly, 1972).

# *Justificación*

## II. JUSTIFICACIÓN

El maíz es el principal alimento de la dieta de México, sin embargo, debido a sus condiciones de precosecha, cosecha, almacenamiento, manejo y distribución, llega a contaminarse con hongos microscópicos que generan toxinas. Entre ellos, los del género *Aspergillus*, especialmente *A. flavus*, produce aflatoxinas, que son agentes cancerígenos.

Se han realizado numerosas investigaciones sobre métodos físicos, químicos y biológicos para degradar las aflatoxinas, metabolitos muy estables. Los resultados de la posible inactivación de las aflatoxinas por el proceso de nixtamalización, no son satisfactorios, ya que las tortillas pueden presentar aflatoxinas.

Se requiere hacer un análisis de la concentración y efecto mutágeno de la AFB1 presente desde el maíz hasta las tortillas, y continuarlo en un Modelo de Digestión *in vitro* para conocer el efecto de las principales enzimas digestivas del hombre, sobre esta micotoxina y así explicar cómo es su comportamiento con los diferentes pH. Esta investigación nos permitirá determinar si la nixtamalización es un proceso útil para eliminar la AFB1 de las tortillas y si cuando éstas se ingieren se producen o no los efectos mutágenos medidos en la prueba de Ames, y que son similares a lo que sucedería en el ser humano.

# Objetivos



### III. OBJETIVOS

a. **General.**

Determinar la actividad química (fluorescencia) y biológica (mutagenicidad) de la AFB1 en cada paso de la manufactura de la tortilla y su digestión, para saber si la ingestión de este alimento, cuando está contaminado con AFB1, representa un riesgo para la salud.

b. **Específicos.**

1. Implementar un modelo de digestión humana *in vitro*, mediante la acción de saliva (con ptialina) y de soluciones de pepsina y pancreatina, que simulan el jugo gástrico y el pancreático.
2. Cuantificar la concentración de AFB1, por HPLC, presente en maíz natural y artificialmente contaminado, y en cada uno de los pasos de la manufactura de las tortillas.
3. Determinar la actividad biológica (mutagenicidad) de tortillas contaminadas con AFB1 con la prueba de Ames, en el modelo usado de digestión humana *in vitro*.
4. Conocer si la nixtamalización de las tortillas, contaminadas con AFB1, inhibe su efecto químico y biológico, y es un método seguro para evitar un posible riesgo a la salud humana.

# *Materiales y Métodos*



## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizaron 2 experimentos en tortillas contaminadas con AFB1 en forma natural y artificial, para someterlas a un modelo de digestión *in vitro*, con la acción de las enzimas digestivas en solución, para determinar la concentración de AFB1 por HPLC y su actividad biológica por medio de la prueba de Ames.

### 1. **Procesamiento al maíz naturalmente contaminado con AFB1**

En el primer experimento se hicieron tortillas a partir de un maíz contaminado de forma natural, obtenido de la Bodega Rural "Las Yescas" de Valle Hermoso, en el Estado de Tamaulipas, que estuvo almacenado de 1990 a 1994.

De un total de 2 kilos de maíz se tomó una submuestra de 100 g como testigo antes de nixtamalizar, el cual fue molido y separado en 3 repeticiones de 25 g cada una, guardando los 25 g restantes como maíz extra, en caso de que una repetición fallara. Este procedimiento se hizo para determinar tanto la cantidad inicial de AFB1 por HPLC como la actividad biológica de la AFB1 por la prueba de Ames. Los restantes 1900 g de maíz entero se nixtamalizaron, añadiendo 6 L de agua con 40 g de cal. Se midió el pH del agua de cocción (de nejayote) antes de la nixtamalización y después de la misma. El agua de cocción se concentró hirviéndola hasta llegar a un volumen de 100 mL, la concentración de AFB1 se determinó por HPLC y el efecto mutagénico con la prueba de Ames.

Del maíz nixtamalizado se tomaron 100 g que fueron molidos y separados en 3 repeticiones de 25 g cada una para la cuantificación de AFB1 y la determinación de su actividad mutagénica. El resto de maíz nixtamalizado y molido fue amasado por 2 horas con 2 L de metanol al 80%, mismo que fue evaporado bajo campana de extracción; después se hicieron las tortillas que se secaron a temperatura ambiente (Figura 9).



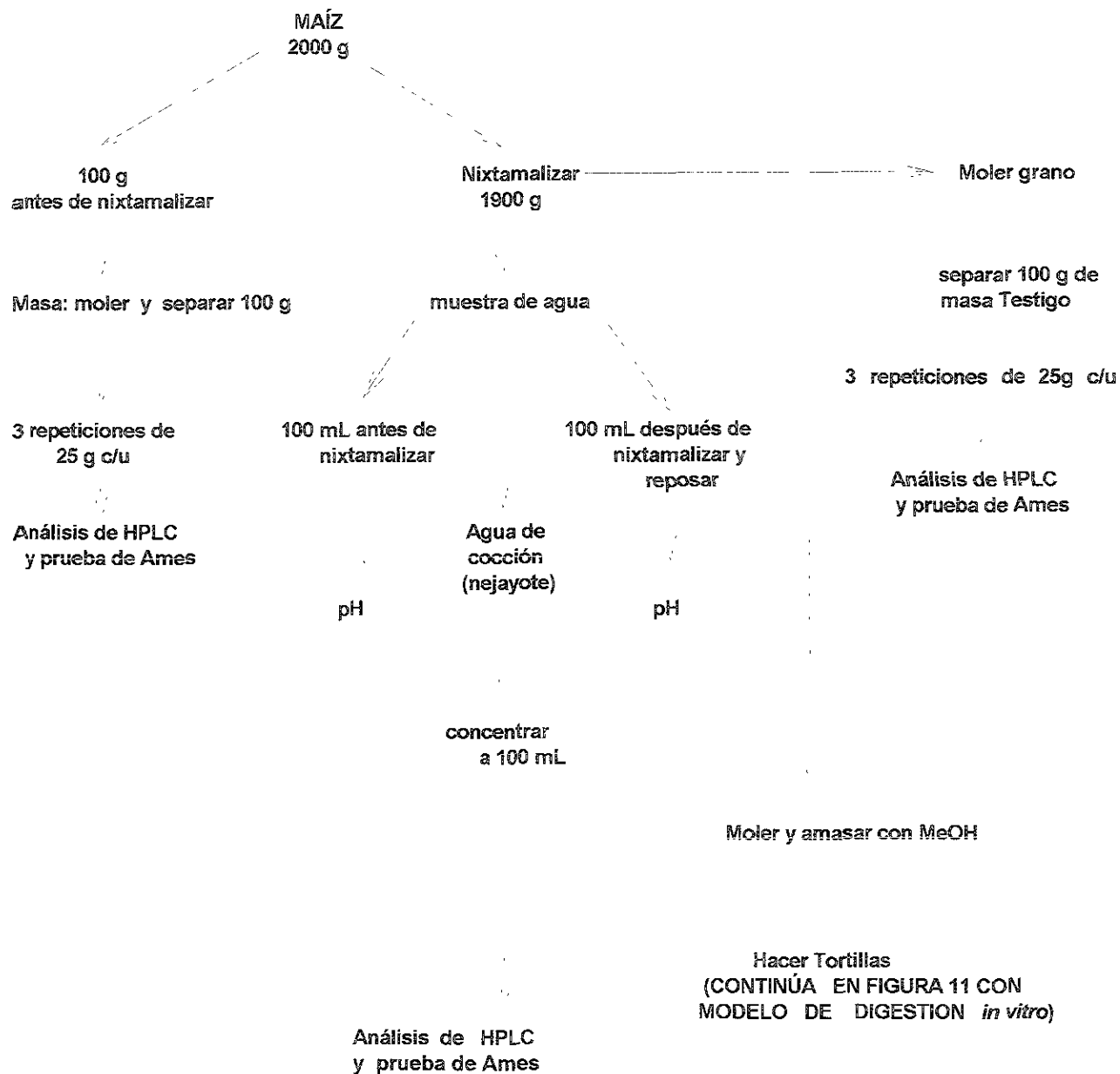


Figura 9. Proceso de manufactura de tortillas a partir de 2000 g de maíz naturalmente contaminado con AFB1 de la bodega rural Las Yescas, Valle Hermoso, Tamaulipas.

## 2. Procesamiento al maíz artificialmente contaminando con AFB1.

En el segundo experimento se trabajó con 1000 g de maíz comprado y en el paso en que se hizo la masa, se usaron 400 g de ella, de los cuales se tomaron 60 g para determinar la cantidad de AFB1 basal en 3 repeticiones. Los 340 g restantes de masa se contaminaron con una solución de 32  $\mu\text{g}$  de AFB1 estándar (de Sigma), disueltos en 390 mL de metanol al 80% en agua destilada, amasando por 2 horas y evaporando el metanol bajo campana de extracción. De esta masa contaminada, se hicieron tortillas, que una vez secas a temperatura ambiente y molidas a consistencia de harina, se trataron en un modelo de digestión *in vitro*, con la acción de las enzimas digestivas en solución (Figura 10).

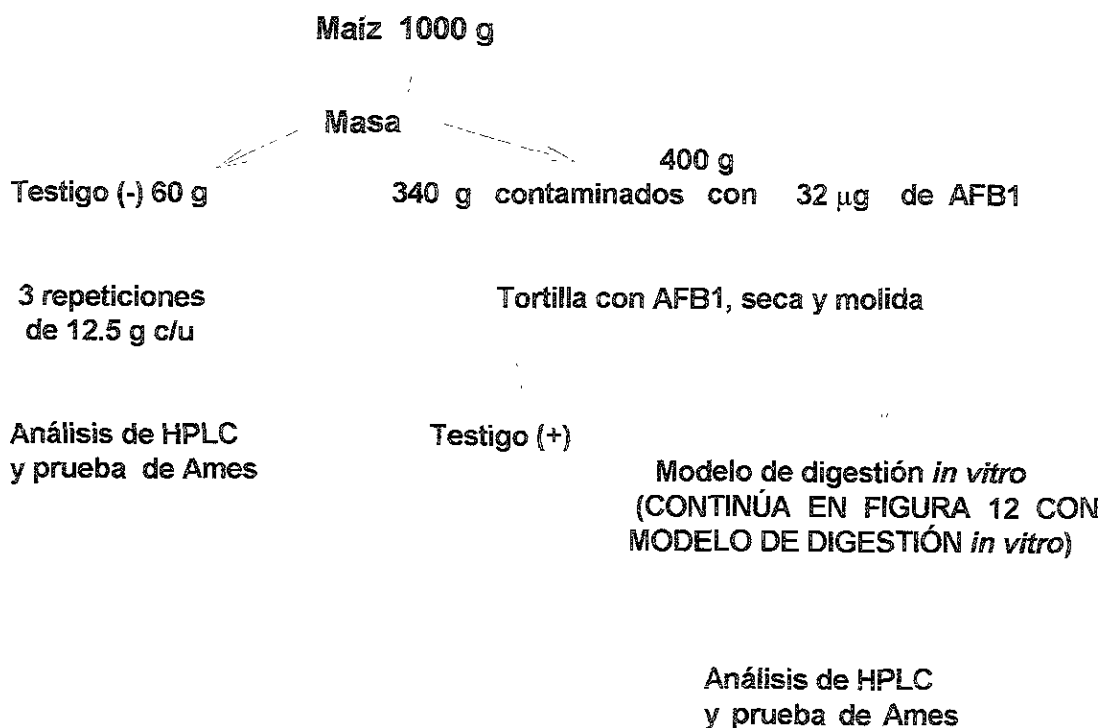


Figura 10. Procesamiento de tortillas contaminadas con AFB1.

### 3. Modelo de digestión *in vitro*.

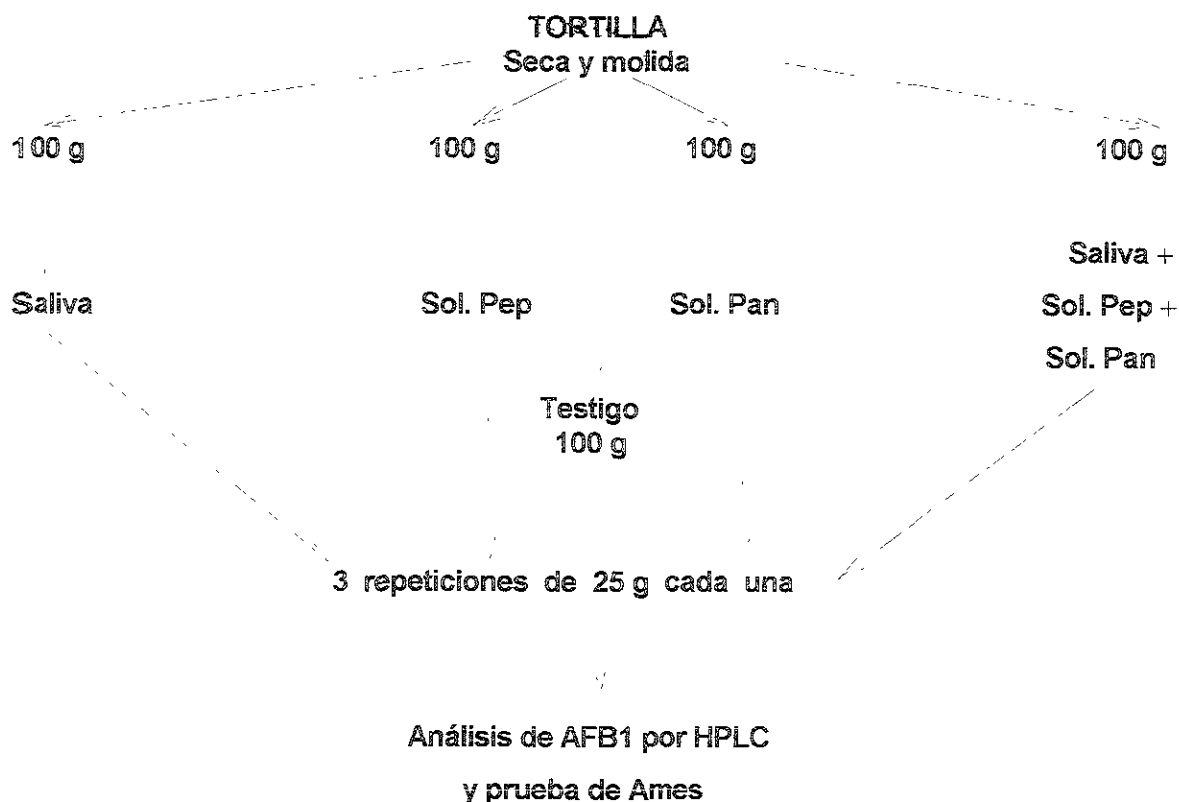
Se implementó un modelo de digestión humana *in vitro* usando las principales enzimas digestivas, en la siguiente forma:

- a) Se usaron 300 mL de saliva obtenida de personas en ayunas, y se tomó el pH que fue de 7.0.
- b) El jugo gástrico simulado, al que llamamos solución de pepsina (= Sol. Pep) se preparó disolviendo 2.0 g de NaCl (Merck) y 3.2 g de pepsina (Sigma, Chemical Co.) en 7 mL de HCl (J.T. Baker) con agua, aforando a 1000 mL, esta solución tuvo un pH final de 1.2.
- c) El jugo pancreático simulado, al que llamamos solución de pancreatina (= Sol. Pan) se preparó disolviendo 6.8 g de fosfato monobásico de potasio (Merck) en 250 mL de H<sub>2</sub>O destilada, se mezcló y se agregaron 190 mL de NaOH (Merck) 0.2 N y 400 mL de H<sub>2</sub>O destilada; enseguida se agregaron 10.0 g de pancreatina (Farmacia París), se mezcló y la solución resultante se ajustó con NaOH 0.2 N a un pH de  $7.5 \pm 2$ .

#### 3.1 Con maíz naturalmente contaminado con AFB1

Después del tratamiento mostrado en la Figura 9, se continuó moliendo las tortillas para obtener el peso seco de cada repetición y se aplicaron los siguientes tratamientos con enzimas digestivas (Figura 11):

- a) 100 g de tortilla molida se licuaron con 250 mL de saliva y se incubaron por 2 minutos.
- b) 100 g de tortilla molida se licuaron con 250 mL de solución de pepsina, que fueron incubados por 2 horas en la oscuridad.
- c) 100 g de tortilla molida se licuaron con 250 mL de solución de pancreatina y se incubaron por 5 horas en la oscuridad.
- d) 100 g de tortilla molida se licuaron con 83 mL de saliva (con 2 minutos de tiempo de incubación), se añadieron 83 mL de solución de pepsina y se volvió a licuar, y se incubó por 2 horas en la oscuridad, y finalmente se licuaron con 83 mL de solución de pancreatina incubando por 5 horas también en la oscuridad.



**Figura 11. Modelo de digestión *in vitro* aplicado a las tortillas de maíz naturalmente contaminado con AFB1.**

### **3.2 Con maíz artificialmente contaminado con AFB1.**

Después de aplicar el tratamiento mostrado en la Figura 10, la masa contaminada artificialmente con AFB1 se colocó en campana de extracción para evaporar el MeOH, se procesaron 3 repeticiones de 12.5 g c/u para someterlas a la acción de cada una de las enzimas digestivas, procesándolas por el método de Shepherd *et al.* (1987) de la siguiente manera (Figura 12):

Se añadieron 1.25 g de cloruro de sodio y 25 mL de MeOH (60% v/v en PBS, 0.25 M pH 7.4), y se licuó 2 minutos, se filtró y evaporó a 8 mL. A cada muestra obtenida se le añadieron 8 mL de las siguientes soluciones enzimáticas: saliva (con 3 minutos de incubación), Sol. Pep (con 2 horas de incubación), Sol. Pan (con 5 horas de incubación), mezcla de saliva + Sol. Pep, Sol. Pep + Sol Pan y de saliva + Sol. Pep +Sol.Pan a los tiempos de incubación mencionados previamente para cada

compuesto.

Posteriormente, cada muestra se diluyó en 40 mL de PBS 0.25 M, se filtró y aplicó a una columna de inmunoafinidad previamente activada, eluyendo la AFB1 con 2 mL de MeOH y evaporando a sequedad a 45 °C. La muestra se resuspendió en 600  $\mu$ L de MeOH tomando 300  $\mu$ L para el análisis químico por cromatografía líquida de alta presión (HPLC), de éstos, se derivatizaron 100  $\mu$ L para inyectarlos en el cromatógrafo de líquidos.

Los 300  $\mu$ L restantes se evaporaron a sequedad a 45° C y se resuspendieron en 100  $\mu$ L de (DMSO) para realizar la prueba de Ames (Ames *et al*, 1975) (Figura 12).

Debido a que las enzimas digestivas tienen un pH definido en el modelo de digestión y en el análisis químico (extracción de la AFB1) se estaba usando PBS con objeto de dar una mayor protección al anticuerpo anti-aflatoxinas totales de la columna de inmunoafinidad, y dado que este PBS no es parte natural en una digestión humana, se decidió hacer el mismo experimento referido en la Figura 12, pero sustituyendo el PBS por agua destilada y así conservar el pH natural de las enzimas usadas, lo cual haría que el modelo de digestión fuera más cercano a la realidad de la digestión humana. Otra modificación que se hizo además del uso del agua destilada, en lugar del PBS, fue que ya no se evaporaron las muestras a un volumen de 8 mL, sino que se llevaron sequedad en una incubadora Lab-Line Ambi-HI-LO Chamber.

12.5 g de tortilla molida + 1.25 g NaCl + 25 mL MeOH (60% en PBS 0.25 M)\*



Licuar (2') y filtrar



Evaporar a 8 mL ♦



Modelo de digestión *in vitro*:

- a) Tortilla testigo contaminada con AFB1
- b) Tortilla + saliva (8 mL / 3')
- c) Tortilla + Sol. Pep (8 mL / 2 h)
- d) Tortilla + Sol. Pan (8 mL / 5 h)
- e) Tortilla + saliva (8 mL / 3') + Sol. Pep (8 mL / 2 hr)
- f) Tortilla + Sol. Pep (8 mL / 2 h) + Sol. Pan (8 mL / 5 h)
- g) Tortilla + saliva (8 mL / 3') + Sol. Pep (8 mL / 2 h) + Sol. Pan (8 mL / 5 h)



Diluir c/u en 40 mL de PBS 0.25 M\*, filtrar



Aplicar todo a la columna activada



Lavar la columna con 10 mL de PBS-Tween 20 al 0.5% \*  
y después con 10 mL de PBS (pH 7.4) \*



Eluir la AFB1 con 2 mL de MeOH



Evaporar y redissolver en 600 µL MeOH



300 µL HPLC



Derivatizar  
100 µL



300 µL Ames



Evaporar y  
Redissolver en 100 µL  
de DMSO

Figura 12. Modelo de digestión *in vitro* y procesamiento de las tortillas hechas de masa de maíz artificialmente contaminadas con AFB1, para análisis químico (HPLC) y biológico (Prueba de Ames).

\* = mismo tratamiento sustituyendo PBS por agua destilada.

♦ = mismo tratamiento evaporando a sequedad la muestra.

### 3.3 Controles utilizados para el Modelo de Digestión *in vitro*.

Estos controles se analizaron tanto por HPLC, como en la prueba de Ames.

#### a) *Soluciones enzimáticas con AFB1.*

Se preparó una solución de 1 µg / mL de AFB1 en MeOH, de la cual se tomaron 150 µL y se evaporó a sequedad a 45 °C. Posteriormente, se resuspendió en 500 µL de cada uno de los siguientes compuestos:

- Saliva, pH 7.0 (3 minutos de incubación).
- Solución de pepsina, pH 1.2 (2 horas de incubación)
- Solución de pancreatina, pH 7.5 (5 horas de incubación)
- Saliva, pH 7.0 (3 minutos de incubación) + solución de pepsina pH 1.2 (2 horas de incubación), con un pH final de 1.8.
- Solución de pepsina pH 1.2 (2 horas de incubación) + solución de pancreatina, pH 7.5 (5 horas de incubación), con un pH final de 2.4
- Saliva, pH 7.0 (3 minutos de incubación) + solución de pepsina pH 1.2 (2 horas de incubación)+ solución de pancreatina, pH 7.5 (5 horas de incubación), con un pH final de 5.

Cada muestra se evaporó a sequedad a 45 °C, y se procesaron por sextuplicado, tomando 3 muestras para el análisis químico de aflatoxinas por HPLC y 3 para la prueba de Ames, las cuales se resuspendieron en 100 µL de DMSO.

#### b) *Soluciones enzimáticas sin AFB1.*

Se probó el efecto mutagénico en 100 µL de las siguientes soluciones enzimáticas sin AFB1.

- Saliva pH 7.0.
- Solución de pepsina pH 1.2.
- Solución de pancreatina pH 7.5.

Y 3 mezclas de enzimas:

- Saliva pH 7.0 + solución de pepsina pH 1.2 con un pH final de 1.8.
- Solución de pepsina pH 1.2. + solución de pancreatina pH 7.5 con un pH final de 2.4

- Saliva pH 7.0 + solución de pepsina pH 1.2 + solución de pancreatina pH 7.5 con un pH final de 5.0.

c) *Estándar de AFB1 y soluciones sin enzimas.*

De una concentración basal de 1 µg/mL de AFB1 en metanol, se evaporaron a sequedad 150 µL a 45 °C y se resuspendieron en 500 µL de los siguientes compuestos químicos sin enzimas:

- NaCl + HCl pH 1.2 incubado por 2 horas.
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + NaOH pH 7.5 incubado por 5 horas.
- NaCl + HCl incubado por 2 horas + KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + NaOH incubado por 5 horas con un pH final de 2.4.

Estas mezclas fueron analizadas por HPLC y la prueba de Ames.

d) *Estándar de AFB1 con los compuestos químicos para nixtamalizar y acidificar.*

Se usó Ca(OH)<sub>2</sub> para obtener un pH de 12 y la solución reguladora de acetato de K /ácido acético para obtener pH de 5 que fue con el que se trabajó en reportes anteriores de mutagénesis en tortillas (Price & Jorgensen, 1985)

De una solución de 1 µg / mL de AFB1 en metanol, se tomaron 150 µL y se evaporaron a sequedad a 45 °C. Posteriormente, el residuo se resuspendió en 500 µL de cada una de las siguientes soluciones sin enzimas, que fueron analizadas por HPLC y prueba de Ames:

- Ca(OH)<sub>2</sub> al 2% (pH 12) con 20 minutos de incubación y evaporación.
- Ca(OH)<sub>2</sub> al 2 % (pH 12) con calentamiento a ebullición, 94°C en la Ciudad de México, por 20 minutos.
- Solución reguladora de acetato de potasio / ácido acético (pH 5) incubada por 5 horas.

Todas las muestras se procesaron por sextuplicado, tomando 3 muestras para el análisis químico por HPLC y 3 para la prueba de Ames, las cuales se resuspendieron en 100 µL de DMSO.



## 4. Análisis químico.

### 4.1 Método de extracción de AFB1.

La purificación de la AFB1 de todas las muestras analizadas se realizó con columnas de inmunoafinidad (antes marca Biocode, ahora de laboratorio Romer), el método de extracción usado fue el de Shepherd *et al.* (1987). Este método constó de los siguientes pasos:

- a) Una muestra de 25 g de maíz se licuó con 2.5 g de cloruro de sodio y 50 mL de metanol (MeOH) al 60% en regulador de fosfatos (PBS) 0.25 M pH 7.4, por 2 minutos y se filtró.
- b) Se tomaron 8 mL del filtrado y se diluyeron en 40 mL de albúmina de suero bovino (BSA) al 3% w/v en 0.25 M de PBS. Se filtró en papel de fibra de vidrio (Whatman).
- c) Por separado se activó la columna de inmunoafinidad aplicándole 20 mL de PBS y posteriormente se le añadieron 36 mL del filtrado diluido, en BSA, de la muestra.
- d) Se lavó la columna con 20 mL de Tween al 0.5% v/v en PBS y otros 20 mL de PBS extra, se secó pasando aire a través de la columna.
- e) La AFB1 se eluyó de la columna aplicando 1.5 mL de MeOH G.R.
- f) Se evaporó a sequedad en baño María a 45 °C.
- g) Se redisolvió el eluido seco en 600  $\mu$ L de MeOH y se agitó en Vortex.
- h) Este volumen se distribuyó en dos tubos Eppendorf con 300  $\mu$ L cada uno, para el análisis químico de HPLC y la prueba de Ames.
- i) Del primer tubo Eppendorf se tomaron 100  $\mu$ L, se evaporaron a sequedad en baño María y se derivatizaron para hacer el análisis de aflatoxina por HPLC.
- j) Con el segundo tubo Eppendorf se realizó la prueba de Ames, para ello se evaporaron los 300  $\mu$ L a sequedad, en baño María y se redisolvieron en 100  $\mu$ L de dimetilsulfóxido (DMSO) (J.T. Baker).

## 4.2 Cuantificación de la AFB1 por HPLC.

### 4.2.1 Equipo y material.

El análisis fue realizado en un cromatógrafo de líquidos con sistema de inyección de solventes (bomba) de HPLC Series 400 acoplado a una columna de fase reversa C18 Prodigy 5 ODS-2 Phenomenex (25 x 0.460 cm), Integrador de Datos LCI-100, Detector de Fluorescencia LC -10 y un Espectrofotómetro Lambda 3A UV/Vis, en un intervalo de 190-750 nm, siendo todo el equipo de Perkin Elmer.

### 4.2.2 Condiciones de HPLC.

Se tomaron 30  $\mu\text{L}$  de cada una de las muestras derivatizadas, para inyectarlas al HPLC, donde entraron solamente 20  $\mu\text{L}$ , ya que es lo que mide el "loop".

Fase móvil: 60% de agua, 22% de acetonitrilo (J.T. Baker) y 18% de metanol (J.T. Baker), los cuales se mezclaron, se filtraron y se desgasificaron.

Velocidad de flujo de 1 mL / min y tiempo de 15 – 20 minutos.

### 4.2.3 Derivatización

- a) A 100  $\mu\text{L}$  de muestra evaporada se añadieron 200  $\mu\text{L}$  de hexano (J.T. Baker) y 200  $\mu\text{L}$  de ácido trifluoroacético (TFA) (Sigma, Chemical Co.).
- b) Se añadió 1 mL de mezcla de agua-acetonitrilo (9:1 v/v), se agitó en Vortex por 30 seg y se dejó reposar 5 minutos.
- c) Se separaron las fases al dejarlas reposar de 5 a 10 minutos, se recuperó la fase acuosa (inferior) y se desechó la superior.

### 4.2.4 Cuantificación de la AFB1 con espectrofotómetro

Se puso metanol en las dos celdas y se hizo un barrido a 750 nm, después se colocó la solución de AFB1 a medir en una de las celdillas y se leyó a diferentes longitudes de onda: 355 a 365 nm, dado que en el rango 360 y 362 nm es donde mejor se detecta la AFB1.

Se aplicó la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Mayor Absorbancia leída} \times \text{peso molecular de la AFB1 (312)}}{\text{Coeficiente de extinción (21 800)}} = \text{Concentración de AFB1}$$

Para preparar una solución estándar de AFB1 a una concentración a 1 µg/mL (1000 ng/mL), de la siguiente manera:

Se dividió 1 entre la concentración de AFB1 obtenida y el resultado se restó de 1000 para conocer cuantos µL de solvente se debían de aplicar.

#### 4.2.5 Curva de Calibración de la AFB1

De la solución estándar de AFB1 (Sigma, Chemical Co.) de 1 µg/mL se prepararon 4 diluciones ( 0.25, 0.5, 1.0 y 2.0 µg) para hacer la curva de calibración. Cada una de estas concentraciones se analizó por HPLC y se obtuvieron los cromatogramas con sus áreas respectivas. Estas dos variables fueron de tipo lineal y se calculó el coeficiente de correlación (Steel y Torrie, 1985).

Se utilizó la ecuación de la recta:  $y = b + mx$

dónde:  $y =$  Área del cromatograma (variable dependiente).

$b =$  Ordenada al origen.

$m =$  Pendiente de la recta.

$x =$  Concentración de la micotoxina (variable independiente).

A partir de los valores conocidos de "x" y "y", se graficó la curva de calibración de la AFB1 mediante el programa Excel versión 5, y se obtuvieron los parámetros b, m y el coeficiente de correlación (r), los cuales se utilizaron posteriormente para calcular la concentración de la AFB1 en las muestras analizadas por HPLC.



## 5. Prueba de Ames para medir la actividad biológica o mutación.

### 5.1 Preparación de los medios de cultivo y de reactivos.

#### a) Agar de superficie.

Este contuvo 0.6% de agar (Merck) y 0.5% de NaCl (Merck), se calentó a punto de ebullición en un mechero hasta que se observo transparente, enseguida se añadieron 10 mL de una solución de L-histidina-biotina (0.5 mM), que contenía .0077 g de L-histidina (Sigma, Chemical Co.) y .0122 g de biotina (Sigma, Chemical Co.) en 100 mL de agua destilada, (esta solución se almacenó a 4°C en frasco ámbar), una vez añadida esta solución se mezcló por agitación, y se hicieron alícuotas de 2.5 mL en tubos con tapón de rosca de 13 x 100, se esterilizó en autoclave y se almacenó en refrigeración. Durante el experimento, los tubos con agar de superficie se colocaron en un baño de agua a 45°C .

#### b) Agar de placa.

Las placas contuvieron 30 mL de agar mínimo de glucosa, el cual contuvo 1.5 % de agar (Merck) y 2 % de glucosa (Merck), en medio E de Vogel-Bonner.

#### c) Medio mínimo E de Vogel-Bonner.

Para preparar este medio se pesaron 7.5 g de Bacto agar (Difco) o agar-agar (Merck) purificado y exento de inhibidores disueltos en 300 mL de agua destilada, se esterilizó a 121°C, durante 15 minutos.

Por separado, se pesaron 10 g de dextrosa anhidra (Merck) y se disolvieron en 100 mL de agua destilada y se esterilizó a 12°C durante 15 minutos.

Se usó una solución de sales (de Merck) que a continuación se describe:

Sulfato de magnesio heptahidratado.....	10 g
Acido cítrico monohidratado.....	100 g
Fosfato de potasio dibásico anhidro.....	500 g
Fosfato de sodio amonio tetrahidratado.....	175 g
Agua destilada.....	600 mL

Se agregaron las sales poco a poco en un agitador a temperatura de 30-35°C, una vez disueltas se aforaron a 1 L, y se filtró al vacío, enseguida se agregó 1 mL de cloroformo y se guardó en un frasco ámbar a temperatura ambiente. Esta solución es estable durante 6 meses.

De esta solución se tomaron 10 mL y se disolvieron en 90 mL de agua destilada y se esterilizó a 121° C durante 15 minutos.

Una vez esterilizadas, se mezclaron la dextrosa y la solución de sales con el medio mínimo de E de Vogel-Bonner antes descrito.

#### **d) Caldo Nutritivo.**

Se pesaron 1.25 g del caldo nutritivo (Oxoid N° 2) y se disolvieron en 50 mL de agua destilada, se esterilizaron a 121°C durante 15 minutos y posteriormente se vaciaron 5 mL de este medio, en tubos con tapón de rosca adicionándoles 5 µL de ampicilina a cada uno.

En estos tubos con caldo nutritivo y ampicilina se sembró la cepa bacteriana TA 98 de *Salmonella typhimurium* y se incubaron con agitación a 37 ° C durante 16 horas.

#### **e) Mezcla de fracción S-9, glucosa, solución de sales y NADP.**

La fracción S-9 correspondió al concentrado microsomal 11-Oil Rat Liver LS-9, inducido con Aroclor 1254 de hígado SD de rata macho (Molecular Toxicology, Incorporated = Moltox). Sirve para activar metabólicamente a los cancerígenos químicos y proviene de la fracción de sobrenadante 9000 g y cofactores (Krahn & Heidelberger, 1977).

La mezcla se realizó en la siguiente proporción:

0.1 mL de fracción S-9

0.02 mL de una solución de cloruro de magnesio (0.4M) y 0.02 mL de cloruro de potasio (1.65 M). Esta solución se preparó disolviendo 8.1332 g de cloruro de magnesio hexahidratado (Merck) y 12.3019 g de cloruro de potasio (Merck) en 100 mL de agua destilada.

0.0013 g de glucosa-6-fosfato (Merck).

0.0030 g de NADP (Sigma Chemical, Co.).

0.9 mL de amortiguador de fosfatos 0.2 M, pH 7.4.

Se adicionaron la solución de cloruros y el amortiguador de fosfatos a la glucosa y al NADP y se filtraron y enseguida se adicionó la fracción S-9.

#### f) Amortiguador de fosfatos 0.2 M pH 7.4

Se prepararon dos soluciones:

Solución A: Se disolvieron 28.369 g de fosfato ácido disódico (Merck) en 1 L de H<sub>2</sub>O destilada.

Solución B: Se disolvieron 27.6 g de fosfato ácido monosódico monohidratado (Merck) en 1 L de agua destilada.

De la solución A se tomaron 81.0 mL y de la solución B se tomaron 19.0 mL. Esta mezcla se guardó en refrigeración.

## 5.2 Ensayos de mutagenicidad en placa

La cepa bacteriana TA 98 de *S. typhimurium*, fue proporcionada por el Dr. Javier Espinosa del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, México, D.F. Esta cepa contiene un plásmido factor R, pKM101 que incrementa la mutagénesis (McCann *et al.*, 1975)

La prueba de Ames requiere de los siguientes controles:

- Control positivo: la cepa bacteriana TA 98, la fracción S-9 y 100 ng de la AFB1.
- La cepa sola.
- La cepa adicionada de la fracción S-9.
- La cepa más 500 µL del amortiguador de fosfatos (PBS) .
- La cepa, 500 µL del amortiguador y 100 ng de AFB1.

Para realizar esta prueba se añadieron en orden los siguientes componentes: una alícuota del agar de superficie, derretido a 45 °C, 0.1 mL de la cepa bacteriana TA 98 de *S. typhimurium* incubada toda la noche en caldo nutritivo, 0.1 mL de la muestra a analizar y 0.5 mL de la fracción S-9. Las bacterias pueden sobrevivir durante algunos

minutos a 45 °C, mientras que la fracción S-9 no, se mezcló por agitación, y se vació en las placas de agar mínimo más glucosa, se distribuyó uniformemente la mezcla añadida sobre la superficie del agar y se dejó solidificar (el mezclado y distribución se realizó en menos de 20 segundos, y la solidificación se llevó a cabo en algunos minutos, es muy importante tener en cuenta estos tiempos).

Si el agar ó mezcla añadida comienza a solidificarse antes ó a mitad de la operación, se pueden formar gránulos en la superficie lo cual puede dificultar el análisis de las colonias revertantes. También se deben de cubrir rápidamente las cajas para evitar los efectos de la luz sobre la fotosensibilidad del agente químico. Después de 1 hora, las placas se incubaron en la obscuridad durante 48 horas a 37°C, y posteriormente se contaron las colonias crecidas en las placas con cada tratamiento y con cada control. El número de colonias revertantes son directamente proporcionales a la mutagenicidad de la sustancia probada, de modo que la prueba de Ames es de suma utilidad para cuantificar biológicamente las mutaciones.

Un resultado positivo se definió como un aumento en el número de colonias bacterianas revertantes que superó por más de dos veces la frecuencia de reversión espontánea y que mostró un incremento en el número de mutantes en función de la concentración del compuesto (Ames *et al.*, 1975; Maron & Ames, 1983).

La cepa TA 98 de *S. typhimurium* dio un promedio de reversión de 20-50 colonias, por lo que se consideró que era la adecuada para los estudios de mutagenicidad *in vitro* con AFB1.

### 5.3 Límites de detección para la AFB1.

Con objeto de conocer la cantidad mínima necesaria de AFB1 para causar mutación se realizó un ensayo con diferentes concentraciones (0.39, 0.778, 1.6, 3.8, 6.25, 10.0, 12.5, 25, 50 y 100 ng) de esta toxina para determinar si había un riesgo de mutación por ingestión de tortillas de maíz en la ciudad de México.

También se pesaron tortillas de diferentes localidades para conocer la cantidad de gramos que se ingería por unidad y así calcular el posible riesgo de ingestión de AFB1 por tortillas.

# Resultado Discusión





## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

### 1. Procesamiento al maíz naturalmente contaminado con AFB1 y Modelo de Digestión *in vitro*.

La cantidad promedio de AFB1 en cada una de las muestras procesadas del maíz naturalmente contaminado de la Bodega Rural "Las Yescas" se indica a continuación.

Las muestras de maíz sin nixtamalizar presentaron un promedio de 12.8 ng de AFB1, en las muestras de maíz nixtamalizado y molido no se detectó AFB1, pues el anillo de lactona presente en su molécula se abrió debido a la hidrólisis alcalina, provocando que perdiera temporalmente su fluorescencia. Sin embargo, cuando este maíz nixtamalizado y molido se hizo masa, se encontró una concentración de 1.2 ng de AFB1. Esto se debió, tal vez a que cuando se amasó con metanol, la cantidad de AFB1 se distribuyó homogéneamente en toda la masa.

La cantidad de AFB1 detectada en las tortillas ya cocidas fue de 5.3 ng, esta cantidad aumentó considerablemente cuando las tortillas se sometieron a la acción de la saliva detectándose 11.6 ng y con la acción de la pancreatina se encontraron 12.8 ng.

Las tortillas tratadas con la solución de pepsina, tuvieron casi la misma cantidad (5.7 ng) de AFB1 que las tortillas que no se sometieron a ningún tratamiento (5.3 ng).

Las muestras de tortilla que se sometieron a las 3 enzimas digestivas: saliva con ptialina, y a la acción de las 2 soluciones de pepsina y pancreatina, presentaron 2.9 ng de AFB1, es decir 1.7 ng más que en las muestras de maíz nixtamalizado, molido y amasado (Tabla 3).

**Tabla 3. Concentración de AFB1 y promedio de colonias revertantes en el maíz naturalmente contaminado y tortillas con y sin soluciones enzimáticas.**

Muestra	ng de AFB1	Promedio de colonias revertantes
Maíz antes de nixtamalizar	12.8	52
Maíz en agua con cal	18.7	21
Agua después de nixtamalizar	11.0	31
Maíz nixtamalizado y molido	0.0	21
Maíz nixtamalizado, molido y amasado	1.2	35
Tortilla	5.3	32
Tortilla + saliva	11.6	32
Tortilla + Sol. Pep	5.7	31
Tortilla + Sol. Pan	12.8	43
Tortilla + saliva + Sol. Pep + Sol. Pan	2.9	40

Sol. = Solución; Pep = pepsina; Pan = pancreatina; ng = nanogramos.

Ninguna de estas muestras procesadas presentó mutagenicidad, a pesar de que algunas, tenían una concentración de AFB1 dentro de los límites de detección. (Tabla 3).

El pH que presentó el agua con el maíz y la cal, antes y después de realizar el proceso de nixtamalización, fue de 12. La cantidad de AFB1 detectada en estas muestras fue de 18.7 ng y 11 ng respectivamente. Ninguna de ellas fue mutagénica en la Prueba de Ames.

La disminución en el contenido de AFB1 en las muestras de maíz nixtamalizado, pudo ser debido al desprendimiento de las aflatoxinas superficiales localizadas en el pericarpio del maíz, ya que es en éste donde se acumula la mayor cantidad de AFB1, y eliminada en el agua de cocción y lavado (Ulloa-Sosa and Schroeder, 1969), o bien porque el pH alcalino disminuye la fluorescencia de la AFB1 al abrir el anillo de lactona (Parker and Melnick, 1966), también por el efecto conjunto de temperatura-hidróxido de calcio que actúa provocando una gelatinización parcial del almidón (Machorro y Valdivia, 1984).

Los resultados de este experimento coinciden con los de Machorro y Valdivia (1984), quienes evaluaron las modificaciones que ocurren en las aflatoxinas durante el proceso de la nixtamalización del maíz y elaboración de la tortilla. Encontrando que la principal destrucción de AFB1 fue debida al tratamiento térmico-alkalino y a la cocción de la tortilla, teniendo una pérdida efectiva, por destrucción y no por arrastre del 28.75% de AFB1 durante todo el proceso de nixtamalización.

En el trabajo realizado por Price & Jorgensen (1985), sobre el efecto del tratamiento térmico-alkalino en las aflatoxinas que en forma natural se encontraban presentes en el maíz (entre 127 y 145  $\mu\text{g} / \text{kg}$  de muestra), se analizó la mutagenicidad usando la Prueba de Ames para cada producto (maíz crudo, nixtamal, masa y tortilla) y, con objeto de evaluar el posible efecto de los ácidos en el estómago de los monogástricos, acidificaron cada una de las muestras a un pH final de 5, ya que el pH del agua donde nixtamalizaron el maíz fue de 13 aproximadamente y el pH de las muestras de nixtamal, masa y tortilla fue aproximadamente de 11. Estos pH fueron muy similares a los encontrados en nuestro trabajo (pH 12).

Cuando se sometieron las muestras de tortillas (hechas a partir del maíz naturalmente contaminado), a la digestión *in vitro* de las enzimas digestivas, se recuperaron los niveles de aflatoxina iniciales, detectados en el maíz sin nixtamalizar, bajo la acción de la saliva y bajo la acción de la solución de pancreatina, pero en ninguna de ellas se detectó actividad mutagénica. La cantidad de AFB1 fue sumamente baja y es posible que se haya disminuido aún más al realizar la Prueba de Ames, de modo que quizá era necesaria una mayor cantidad de AFB1 en las muestras para que llegara a la tortilla digerida.

2. **Procesamiento al maiz artificialmente contaminado con AFB1 y Modelo de Digestión *in vitro*.**

Las muestras de tortilla, provenientes de masa inoculada con 32 µg AFB1, se sometieron a la acción de las soluciones enzimáticas siguiendo el Modelo de Digestion *in vitro*, para conocer el efecto mutagénico de la tortilla digerida. Se observó que el pH de la solución del MeOH al 60 % mezclado con 40% de PBS, empleado para la extracción de la aflatoxina, alteró el pH original de las soluciones enzimáticas utilizadas, así, el pH original de la solución de pepsina fue de 1.2 con agua destilada, y se vio alterado a un pH 6.0. El pH original fue de 2.4 en la mezcla de solución de pepsina y pancreatina en agua y subió a pH 6.4 con PBS (Tabla 4).

**Tabla 4. Muestras de tortillas hechas de masa contaminada con 32 µg de AFB1 tratada con el Modelo de Digestión *in vitro* (licuadas con metanol al 60% en 40% de PBS), determinación del pH, concentración de AFB1 por HPLC y promedio de colonias revertantes.**

Muestra de tortilla	pH original de las soluciones enzimáticas	Modelo de Digestión <i>in vitro</i> (muestras licuadas con metanol al 60% en 40% de PBS).		
		pH alterado por PBS de las soluciones enzimáticas.	ng de AFB1	Promedio de colonias revertantes
Sin inocular con AFB1	-		0	31
Contaminada con AFB1	-		35	68
Con saliva	7.0	6.9	75	112 *
Con Sol. Pep	1.2	6.0	68	121 *
Con Sol. Pan	7.5	7.0	44	66
Con saliva + Sol. Pep	1.8	6.1	63	98 *
Con Sol. Pep + Sol. Pan	2.4	6.4	19	66
Con saliva + Sol. Pep + Sol. Pan	5.0	6.5	30	110 *

Sol. = Solución; PBS = Solución amortiguadora de fosfatos; Pep = pepsina; Pan = pancreatina; ng = nanogramos; \* = efecto mutagénico.

Como se observa en la Tabla 4, con la alteración que el PBS provocó sobre el pH de las soluciones enzimáticas empleadas, no se pudo determinar la acción real de cada una de ellas sobre la mutagenicidad de la AFB<sub>1</sub>, para cada una de las muestras de tortilla procesadas, sin embargo, aún con esta alteración, hubo efecto mutagénico evidente con los tratamientos con saliva, donde hubo 112 colonias revertantes, que fue más del triple de colonias que el testigo, que tuvo 31. Con solución de pepsina hubo 121 colonias revertantes que representan un efecto mutagénico evidente, gracias al PBS que subió el pH original de la pepsina y que no debería haber sido mutagénica en condiciones naturales (con agua destilada sin PBS). La suma de saliva y solución de pepsina dio 98 colonias, siendo también un efecto claramente mutagénico, al presentar 3 veces más colonias revertantes que el testigo, y que tampoco debería de ser mutagénico en condiciones naturales, dado que su pH original sería de 1.8 y con esta acidez no se presenta mutación como se aprecia en la Tabla 5. Por efecto del PBS el pH subió a 6.1 que es casi neutro presentando mutagenicidad. El mismo efecto mutagénico se presentó con la mezcla de las tres enzimas, que dieron 110 colonias revertantes en este caso de todas maneras hubiera sido mutagénica debido a que el pH original de 5.0 está muy cerca del pH alterado por PBS que fue de 6.5.

Por las razones anteriores, se decidió sustituir el PBS por agua y evaporar a sequedad cada muestra antes del tratamiento con cada una de las soluciones enzimáticas, de esta manera el pH de cada solución no se alteró y su actividad sobre la mutagenicidad de la AFB<sub>1</sub> en cada una de las muestras fue más cercana a lo que sucede *in vivo* (Tabla 5).

Las muestras que presentaron mutagenicidad fueron las que se sometieron a la acción de la saliva (con 147 ng de AFB<sub>1</sub>), de la Sol. Pan (con 67 ng de AFB<sub>1</sub>) y de la solución de saliva + Sol. Pep + Sol. Pan con (83 ng de AFB<sub>1</sub>), presentando un promedio de colonias revertantes de 254, 115 y 104 respectivamente (Tabla 5).

Fue interesante encontrar que la concentración (ng) de AFB1 en las muestras de tortilla sometidas a la acción de la Sol. Pan sola (67 ng y pH 7.5), y la Sol. Pep + Sol. Pan (70 ng y pH 2.4) fue muy parecida, sin embargo, sólo en las muestras de tortilla con la solución de pancreatina se observó mutagenicidad. Este hecho refuerza nuestra hipótesis acerca de la importancia del pH sobre el efecto mutagénico de la AFB1, dado que la diferencia de pH de 7.5 que dio dicho efecto fue muy diferente al de 2.4 que lo inhibió.

**Tabla 5. Muestras de tortillas hechas de masa contaminada con 32 µg de AFB1 tratada con el Modelo de Digestión *in vitro* (licuadas con metanol al 60% en 40% de agua destilada), determinación del pH, concentración de AFB1 por HPLC y promedio de colonias revertantes.**

Muestra de tortilla	pH de las soluciones enzimáticas	ng de AFB1	Promedio de colonias revertantes
Sin inocular con AFB1	-	0	25
Marcada con AFB1	-	37	53
Con saliva	7.0	147	254 *
Con Sol. Pep	1.2	36	25
Con Sol. Pan	7.5	67	115 *
Con saliva + Sol. Pep	1.8	35	20
Con Sol. Pep + Sol. Pan	2.4	70	51
Con saliva + Sol. Pep + Sol. Pan	5.0	83	104 *

Sol. = Solución; Pep = pepsina; Pan = pancreatina; ng = nanogramos;

\* = Efecto mutagénico.

La saliva (pH 7.0), Sol. Pan (pH 7.5) y mezcla de saliva + Sol. Pep + Sol. Pan (pH 5.0), incrementaron el efecto mutagénico de la AFB1 en las muestras de tortilla (Figura 15), pero sólo la saliva incrementó la fluorescencia de la toxina que se traduce en una mayor concentración de la misma detectada por el detector de fluorescencia acoplado al HPLC.

Estos resultados son muy similares a los obtenidos por Price & Jorgensen (1985), quienes encontraron que a un pH ligeramente ácido (5.0) aumenta la concentración de aflatoxina y el número de colonias revertantes. Pero nosotros encontramos que no es el pH ligeramente ácido (5.0) el que más favorece el efecto mutágeno de la AFB1, sino el neutro de 7.0 de la saliva

A un pH ácido 1.2 de la Sol. Pep, y de 1.8 de la mezcla de saliva + Sol. Pep se disminuye la fluorescencia y la concentración de AFB1 y no se produce un efecto mutagénico. Sin embargo, a un pH 2.4 correspondiente a la Sol. Pep + Sol. Pan, se obtiene el doble de concentración de AFB1 (70 ng) que con las otras soluciones ácidas (Tabla 5) pero tampoco hubo efecto mutagénico (Figura 13).

Estos datos concuerdan con los trabajos publicados por Ciegler & Peterson (1968), Dutton & Heathcote (1966), Pohland, *et al.*, 1968, y Pons *et al.*, 1972, quienes reportan que los ácidos degradan a las aflatoxinas, actuando en el grupo vinileno de la parte de dihidrofurano de la molécula de la AFB1 haciéndola menos tóxica ya que se integra una molécula similar a la AFB2, con un bajo nivel mutagénico y que se conoce como AFB<sub>2a</sub>.

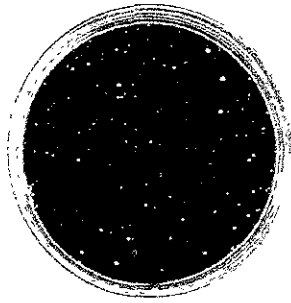
### **3. Controles utilizados para el Modelo de Digestion *in vitro*.**

#### **3.1 Soluciones enzimáticas con AFB1.**

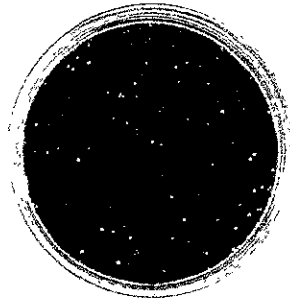
De los 150 µL de AFB1 procesados con cada una de las soluciones enzimáticas se detectaron 102 ng de AFB1 en las muestras sometidas a la acción de la Sol. Pep + Sol. Pan (pH 2.4) pero no presentaron mutagenicidad, sin embargo, a una concentración de 89 ng de AFB1 correspondiente a las muestras tratadas con la solución de pancreatina (pH 7.5) sí la presentaron (Tabla 6).

En la misma Tabla 6, se observa que la mayor cantidad de AFB1 (116 ng) se detectó con la acción de la saliva (pH 7.0) y con la mezcla de saliva + Sol. Pep + Sol. Pan (pH 5), sin embargo hubo mayor cantidad de colonias revertantes (156) con la acción de la saliva que con la mezcla de las 3 enzimas donde hubo 84.

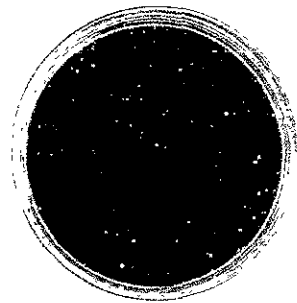
Al determinar el efecto químico y mutágeno del estándar de AFB1, bajo la acción de saliva y las soluciones enzimáticas, se encontraron resultados muy similares a los que presentaron las muestras de tortilla contaminadas artificialmente con esta micotoxina.



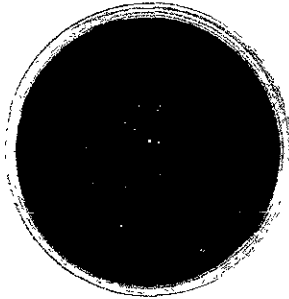
Muestra de tortilla con saliva  
=254 colonias



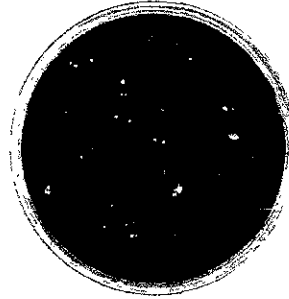
Muestra de tortilla con  
solución de pancreatina  
=115 colonias



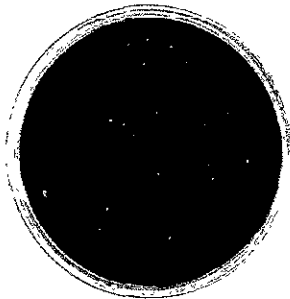
Muestra de tortilla con  
saliva +  
solución de pepsina +  
solución de pancreatina  
=104 colonias



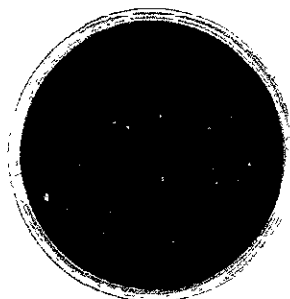
Muestra de tortilla sin AFB1  
= 25 colonias



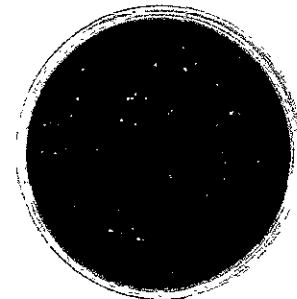
Muestra de tortilla con AFB1  
= 53 colonias



Muestra de tortilla con  
saliva +  
solución de pepsina  
= 25 colonias



Muestra de tortilla con  
saliva +  
solución de pepsina  
=20 colonias



Muestra de tortilla con  
solución de pepsina +  
solución de pancreatina  
= 51 colonias

Figura 13. Prueba de Ames con controles y digestión *in vitro*.



**Tabla 6. Determinación del pH, concentración (ng) de AFB1 y promedio de colonias revertantes en 150  $\mu$ L de estándar de AFB1 sometidos a la acción de la saliva y soluciones enzimáticas.**

Estándar de AFB1	pH de las soluciones enzimáticas	ng de AFB1	Promedio de colonias revertantes
Con saliva	7.0	116	156 *
Con Sol. Pep	1.2	66	38
Con Sol. Pan	7.5	89	74 *
Con saliva + Sol. Pep	1.8	54	38
Con Sol. Pep + Sol. Pan	2.4	102	40
Con saliva + Sol. Pep + Sol. Pan	5.0	116	84 *

Sol. = Solución; Pep = pepsina; Pan = Pancreatina; ng = nanogramos;

\* = Efecto mutágeno.

Con los resultados obtenidos en estos experimentos sugerimos que en la boca y en el duodeno, la AFB1 recupera su actividad química (fluorescencia) y mutagénica, aunque en la boca por la acción de la saliva (pH 7) se tiene una mayor actividad mutagénica que en el duodeno (pH 5), ya que se presentaron el doble de colonias revertantes con la saliva que con la acción de la mezcla de las 3 enzimas. Hay que tomar en cuenta que la acción de la saliva no sólo es en la boca sino que continúa más tiempo en el estómago, en el interior del bolo alimenticio que no es tocado aún por la pepsina, esto aumenta la importancia del efecto de la saliva en la producción de una mutación también a nivel de estómago, hecho que no ha sido confirmado en humanos, sólo en ratas (Butler & Bearners, 1966).

Sin embargo, no estamos de acuerdo con el reporte dado por Stoloff (1979), quien dice que la mayor parte de la AFB1 se recupera en el estómago a pH ácido, quizá debido a que este autor no trabajó con todo el rango de pH que nosotros usamos en el Modelo de Digestión *in vitro*.

Además, en el estómago el bolo alimenticio está sujeto a un pH de 1.8 (debido a la mezcla de saliva con la solución de pepsina) y tanto Price & Jorgensen (1985) como Stoloff (1979), acidificaron las muestras de maíz y tortilla contaminadas con AFB1 con

HCl, y nosotros usamos el ácido como parte del jugo gástrico junto con la pepsina en un Modelo de Digestión *in vitro*, y además, no usaron enzimas. Nosotros consideramos que el pH de 5.0, en el que trabajaron Price & Jorgensen se obtiene en un tiempo muy breve, al llegar el bolo alimenticio de la boca con 7.0 de pH de la saliva hacia el estómago, pero al mezclarse con el jugo gástrico el pH va bajando hacia 1.2. Ahora bien, al salir el bolo alimenticio del píloro hacia el duodeno recibe a la pancreatina que eleva el pH a un rango de 5.0 a 7.5 y es en el intestino delgado donde hay mayor efecto mutágeno de la AFB1, debido a que el alimento se queda ahí alrededor de 7 horas en una digestión normal hasta llegar al colon y el recto incrementando el riesgo de una mutación y su consecuente cáncer colorrectal en gente que sufre estreñimiento.

Es interesante marcar que la saliva con pH 7.0, tanto en los experimentos de digestión *in vitro* con muestras de tortillas como con los controles sin tortilla, produjo la mayor concentración de ng de AFB1 y el mayor número de colonias revertantes que muestran un mayor riesgo de mutación. Quizá el hecho de que el bolo alimenticio pase poco tiempo en la boca disminuye el riesgo de que las aflatoxinas de alimentos contaminados produzcan una mutación en ella, aunque hay reportes de carcinoma de las células escamosas de la lengua producidas por AFB1 (Ward *et al.*, 1975). En el estómago, el bolo alimenticio recibe a la pepsina que baja el pH de 7 a 1.2, lo cual disminuye el riesgo de mutaciones a este nivel.

### 3.2 Soluciones enzimáticas sin AFB1.

Ninguna de las soluciones enzimáticas, solas, sin AFB1, mostró efecto mutágeno (Tabla 7). Como era de esperarse, esto comprueba que el mutágeno es la AFB1.

**Tabla 7. Efecto mutágeno de las soluciones enzimáticas sin AFB1.**

Solución enzimática	PH	Promedio de colonias revertantes
Saliva	7.0	33
Pepsina	1.2	14
Pancreatina	7.5	29
Saliva + Sol. Pep	1.8	13
Sol. Pep + Sol. Pan	2.4	24
Saliva + Sol. Pep + Sol. Pan	5.0	38

Sol. = Solución; Pep = pepsina; Pan = pancreatina.

### 3.3 Estándar de AFB1 con compuestos químicos (sales, ácido y base) y sin enzimas.

Al determinar la actividad mutagénica del estándar de AFB1 bajo la acción de los compuestos químicos (sales, base y ácido) donde se disolvieron las enzimas pepsina (NaCl + HCl) y la pancreatina (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + NaOH), no se observó mutagenicidad con pH 1.2 y 2.4, a pesar de que la cantidad de AFB1 era la suficiente para presentar dicha actividad, pero con un pH 7.5 sí se observó el efecto mutagénico de la AFB1. Nuevamente el efecto del pH parece ser determinante para que la AFB1 produzca mutación (Tabla 8).

**Tabla 8. Determinación de pH, concentración de AFB1 y promedio de colonias revertantes en 150 µL de AFB1 sometidos a la acción de compuestos químicos (sales, ácido y base) donde se disolvieron las enzimas.**

Muestra de AFB1	pH de los agentes químicos	ng de AFB1	Promedio de colonias revertantes
Con NaCl + HCL	1.2	40	21
Con KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + NaOH	7.5	30	52 *
Con [ NaCl + HCl ] + [ KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + NaOH ]	2.4	103	16

\* = Efecto mutagénico.

Por otro lado, al analizar el efecto mutágeno de las soluciones enzimáticas sin AFB1 (Tabla 7) y el de los compuestos químicos (sales, ácido y base) en que se disolvieron las enzimas (Tabla 8), adicionadas con la AFB1, no presentaron actividad mutagénica, aunque sí actividad química. Sin embargo, cuando la AFB1 estuvo en contacto con los agentes químicos ( $\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{NaOH}$ ) en un pH de 7.5, sí hubo mutación, lo cual confirma la importancia de un pH neutro para que la AFB1 tenga efecto mutagénico.

### 3.4 Estándar de AFB1 con los compuestos químicos para nixtamalizar y acidificar.

Se determinó la cantidad de AFB1 y su actividad mutagénica bajo la acción del hidróxido de calcio ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ) al 2 % a un pH de 12 con y sin calentamiento. En la Tabla 9 se puede observar la disminución drástica de 150 ng iniciales de AFB1 a 12 ng sin calentamiento y a 11 ng de AFB1 con calentamiento por la acción del  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ .

También se probó la actividad mutagénica de la AFB1 a un pH 5 obtenido con una solución reguladora de acetato de potasio / ácido acético, pues a este pH, Price y Jorgensen (1985) reportaron que el anillo de la aflatoxina, que estuvo bajo la acción de un pH alcalino, se cierra y se activa nuevamente presentando fluorescencia. Con esta solución se obtuvo un promedio de 123 ng de AFB1, más que suficiente para producir una mutación y sin embargo, no la hubo (Tabla 9).

**Tabla 9. Determinación del pH, concentración de AFB1 y promedio de colonias revertantes en 150  $\mu\text{L}$  de AFB1 sometidos a la acción de los agentes químicos (solución reguladora y  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ).**

Estándar de AFB1	pH de los agentes químicos	ng de AFB1	Promedio de colonias revertantes
Con solución reguladora de acetato de potasio / ácido acético	5.0	123	41
Con $\text{Ca}(\text{OH})_2$ al 2% sin calentamiento	12.0	12	33
Con $\text{Ca}(\text{OH})_2$ al 2% con calentamiento	12.0	11	33

Finalmente, al analizar el efecto de la solución reguladora de acetato de potasio / ácido acético a un pH 5.0 se encontró buena recuperación de AFB1, pero no el efecto mutagénico esperado, como el observado con el control de AFB1 con las 3 enzimas, donde sí hubo ambas actividades. Estos resultados sugieren que existe un efecto aditivo entre las soluciones enzimáticas, con su respectivo pH, sobre el efecto mutagénico de la AFB1.

Con el control de AFB1 + Ca(OH)<sub>2</sub> antes y después de calentamiento usado en la nixtamalización, no hubo ni recuperación química de la AFB1 ni efecto mutagénico, Price & Jorgensen (1985), reportaron que al llevarse a cabo la reacción entre la cal y la AFB1 se forma la sal de calcio de la AFB1, que ya no es extraída durante el análisis químico ni determinada por fluorescencia. Sin embargo, al acidificar la sal de cal, se destruye, y a un pH de 5.0 la AFB1 recupera su fluorescencia y ya puede ser detectada en el análisis químico.



#### **4. Análisis químico de la AFB1**

##### **4.1 Curva de calibración y concentración de AFB1.**

Las diferentes concentraciones de AFB1 se analizaron por HPLC y se obtuvieron sus cromatogramas con sus respectivas áreas (Tabla 10).

La curva de calibración se graficó a partir de los valores de la concentración de AFB1 y del área del cromatograma, obteniendo de esta manera la ordenada al origen, la pendiente y el coeficiente de correlación (Figura 14). Se obtuvo un excelente coeficiente de correlación de la AFB1 ( $r = 0.99210447$ ) que demuestra la alta confiabilidad del análisis químico realizado.

Tabla 10. Áreas del cromatograma y valores de la ecuación de la recta de regresión usados para graficar la curva de calibración de la AFB1.

Nº Dilución	x = Concentración del estándar de AFB1 $\mu\text{g}$ (10.05 mL)	y = Áreas de cromatograma
1	0.25	450059
2	0.5	548085
3	1	4142473
4	2	9371459

Ecuación de la recta de regresión  $y = -1415569 + 53798272 x$

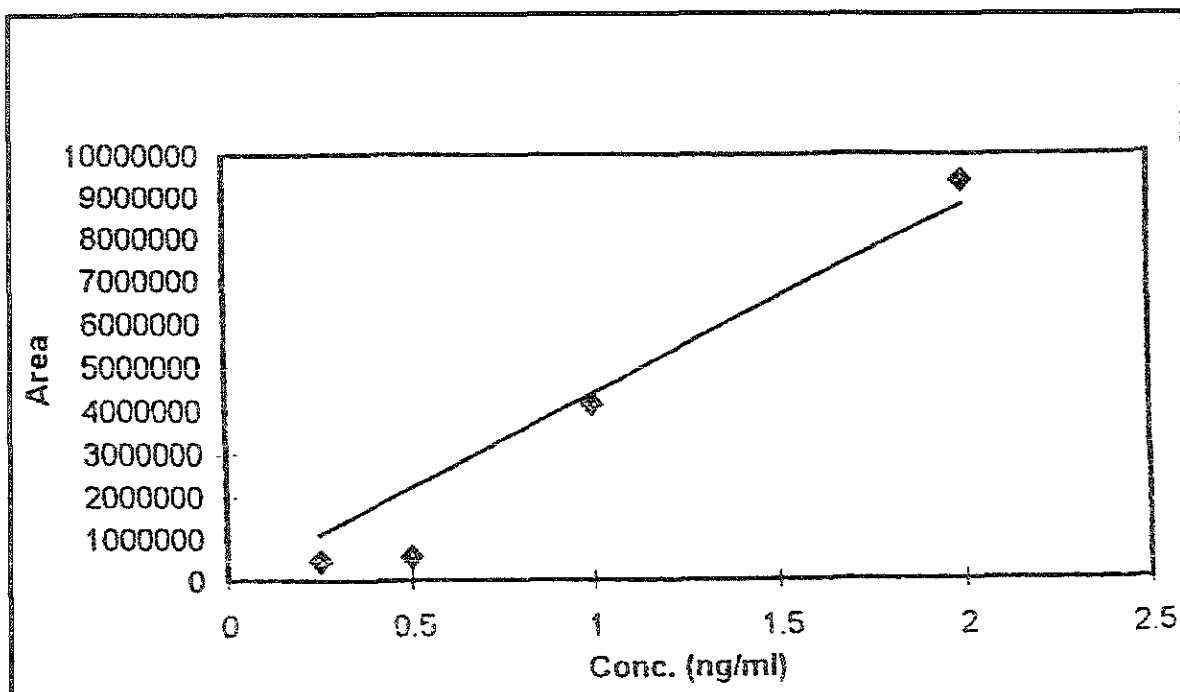


Figura 14 . Curva de calibración de la AFB1.

## 5. Límites de detección de mutagenicidad para la AFB1.

Se estudió el límite de detección de mutagenicidad para la AFB1, determinado por la prueba de Ames con la cepa TA 98 de *S. typhimurium*. Se inició analizando la mutagenicidad de cantidades más altas de AFB1 (Tabla 11) y se continuó bajando las mismas, encontrando que a partir de una concentración de 10.0 ng de AFB1 se inicia el efecto mutagénico (Tabla 12).

En una caja de Petri hablamos de ng y la legislación considera concentraciones ng/g, o sea la cantidad de aflatoxina (ng) por determinados gramos de alimento en una unidad del mismo. La legislación tiene que ver con la ingesta promedio de alimento, mientras que en la caja de Petri hay que relacionar la cantidad de AFB1 (10 ng) de límite mínimo para producir una mutación con los 12.5 g de la muestra de tortilla. Hay que dividir los 10 ng de AFB1 entre los 12.5 g de muestra, esto daría ng/g, en nuestro caso 0.8 ng/g o sea 800 picogramos (pg) para producir una mutación.

El límite máximo de tolerancia de AFB1 en alimentos de humanos de Codex Alimentarius, es de 10 ng/g, que es equivalente a nuestro nivel, mientras que el gobierno de Estados Unidos a través de la FDA da un límite de 20 µg/kg que es más del doble y representa un riesgo para la salud, dada su acumulación en el ADN (CAST, 1989). Sin embargo, como testigo de trabajo en cada uno de los experimentos realizados se usó una concentración de 100 ng de AFB1, por ser ésta la concentración recomendada para la prueba de Ames (Ames *et al.*, 1975).

Tabla 11. Límite de detección de mutagenicidad de AFB1 en Prueba de Ames con la cepa *Salmonella typhimurium* TA 98 (100 µL) con concentraciones frecuentes en tortillas.

N° de caja	S9 inducido con Aroclor (µL)	PBS (µL)	AFB1 (ng)	Prueba de Ames			Promedio de colonias revertantes
				Número de colonias revertantes			
				Replicaciones			
				1	2	3	
Controles							
1	-	-	-	15	34	20	23
2	500	-	-	18	18	25	20
3	-	500	-	21	13	25	20
4	-	500	100	14	12	10	12
Tratamientos							
5	500	-	20	235	257	255	249
6	500	-	40	270	290	259	273
7	500	-	60	706	804	900	803
8	500	-	80	920	970	846	912
9	500	-	100	1074	1038	922	1010

PBS = Solución amortiguadora de fosfatos.

S9 = Concentrado microsomal de hígado de rata macho.



Tabla 12: Prueba de Ames con la cepa *Salmonella typhimurium* TA 98 (100  $\mu$ L) para conocer el límite mínimo de detección de mutagenicidad de la AFB<sub>1</sub>.

N° de caja	S9 inducido con Aroclor ( $\mu$ L)	PBS ( $\mu$ L)	AFB <sub>1</sub> (ng)	Prueba de Ames			Promedio de colonias revertantes
				Número de colonias revertantes			
				Replicaciones			
				1	2	3	
Controles							
1	-	-	-	26	26	27	26
2	500	-	-	26	26	22	23
3	-	500	-	20	14	16	17
4	-	500	50	13	25	17	18
Tratamientos							
5	500	-	0.39	27	21	20	23
6	500	-	0.78	19	16	25	20
7	500	-	1.6	40	32	35	37
8	500	-	3.8	40	30	30	33
9	500	-	6.25	29	40	35	35
10	500	-	10.0 *	68	69	67	68 **
11	500	-	12.5	82	87	87	85
12	500	-	25	202	160	153	172
13	500	-	50	337	370	285	331

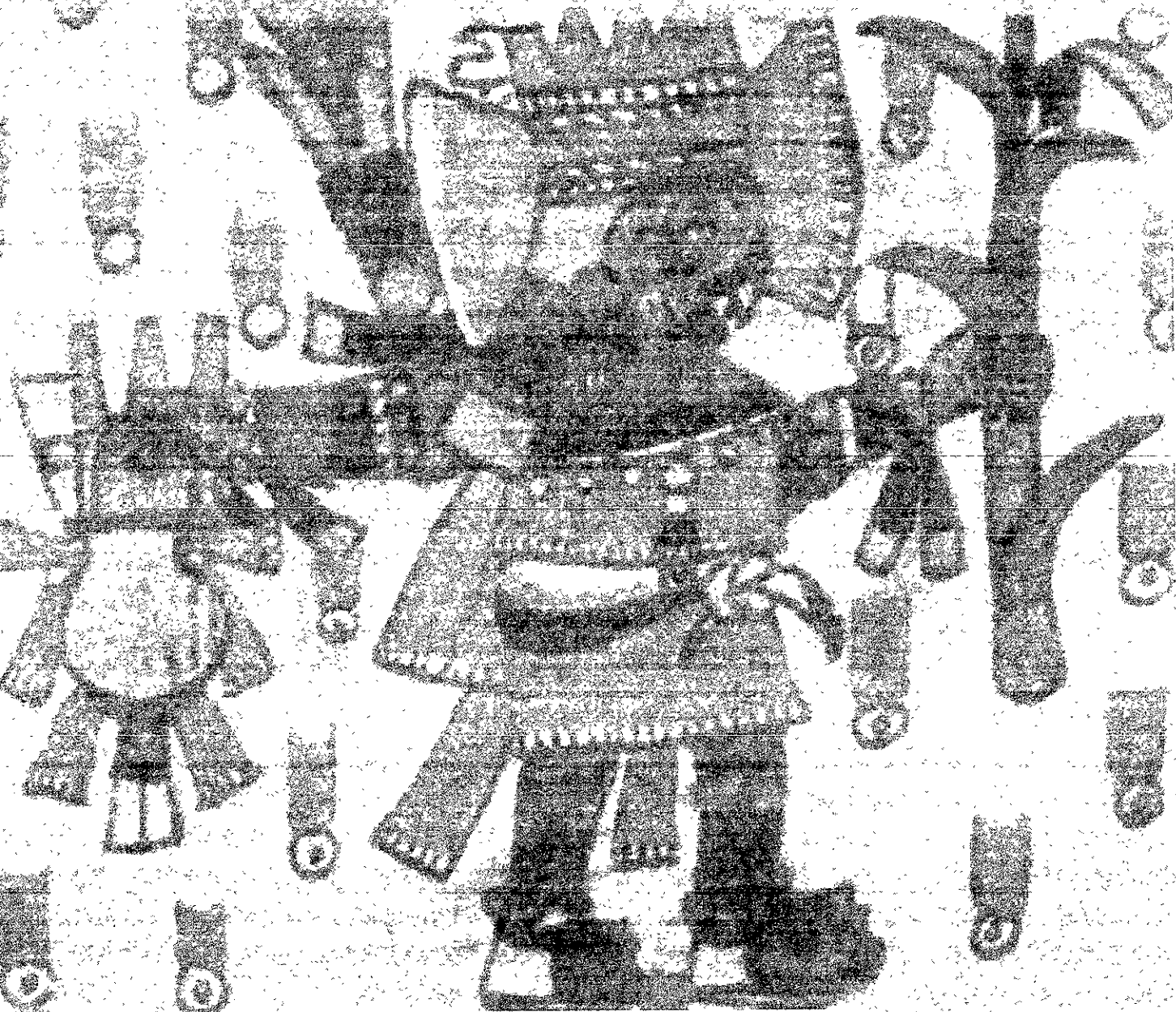
\* Cantidad mínima de AFB<sub>1</sub> que produce una mutación.

\*\* Cantidad de colonias revertantes que triplican el número promedio de mutaciones espontáneas del control.

PBS = Solución amortiguadora de fosfatos.

S9 = concentrado microsomal de hígado de rata macho.

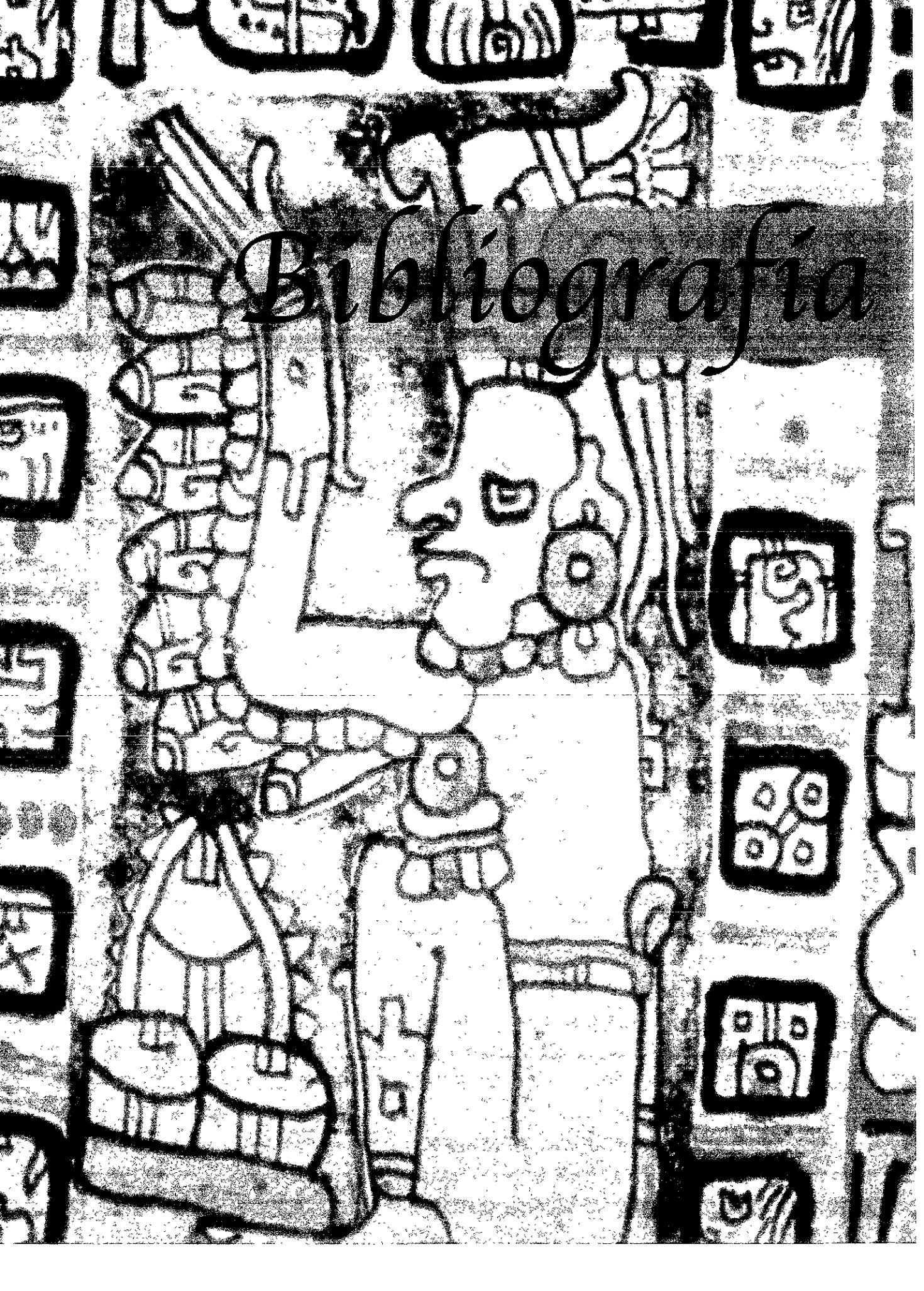
# Conclusiones



## VI. CONCLUSIONES

- El proceso de nixtamalización no elimina por completo a las aflatoxinas que contaminan al maíz.
- El pH está directamente relacionado con las actividades química y mutágena de la AFB1 que es activa en un rango neutro de pH entre 5 y 7.5.
- Existe cierto grado de pérdida de la AFB1 durante la nixtamalización del maíz, no por efecto de la cal con pH básico, sino por el lavado que elimina muchos pericarpios de los granos, permaneciendo las aflatoxinas del interior del grano.
- Las aflatoxinas de las tortillas siguen siendo activas biológica y químicamente, y esto se manifiesta en pH de 5 a 7.5, aunque con el pH básico de la nixtamalización y el pH muy ácido de la pepsina, se disfrazan los efectos mutágeno y de fluorescencia química.
- La saliva (pH 7.0), solución de pancreatina (pH 7.5) y mezcla de saliva + solución de pepsina + solución de pancreatina (pH 5.0), incrementaron el efecto mutágeno de la AFB1, con respecto al nixtamal.
- El límite mínimo para que la AFB1 produzca una mutación fue de 10 ng.
- Es importante seleccionar el maíz menos contaminado por AFB1 para el consumo humano, pues después de la nixtamalización y al someterla a la digestión, sus niveles químicos y biológicos se recuperan tanto en la boca (por la acción de la saliva), como en el duodeno ( por la pancreatina) y en el estómago se inhibe por el bajo pH bajo (de la pepsina), pudiendo ocasionar daños en la salud.

# *Bibliografía*



## VII. BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Adamson, R.H., Correa, P., Sieber, S.M., McIntire, K.R. and Dalgard, D.W. 1976. Carcinogenicity of aflatoxin B1 in rhesus monkeys: Two additional cases of primary liver cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 57: 67-78.
- Ademoyero, A.A. and Dalvi, R.R. 1983. Efficacy of activated charcoal and other agents in the reduction of hepatotoxic effects of a single dose of aflatoxin B1. *Toxicology Letters*, 16 : 153-157.
- Aguilar, F., Harris, C.C., Sun, T., Hollstein, M. and Cerutti, P. 1994. Geographic variation of p53 mutational profile in nonmalignant human liver. *Science*, 264: 1317-1319.
- Ahmed, E.Y. and Elmer, H.M. 1985. Degradation of aflatoxin M1 in milk by ultraviolet Energy. *Journal of Food Protection*, 48 (8) : 697-698.
- Aibara, K. and Yamagishi, S. 1970. Effect of ultraviolet irradiation on the destruction of aflatoxin B1. *In*: Herzberg M. (Ed.), *Proceedings of the first US-Japan conference on toxic microorganisms*. US Department of the Interior Washington, D.C. 211-221.
- Akano, D.A. and Atanda, O.O. 1990. The present level of aflatoxin in Nigeria groundnut cake (Kulikuli). *Letter Applied of Microbiology*, 10 : 187-189.
- Allcroft, R. 1969. Aflatoxicosis in farm animals. *In*: Goldblatt, L.A. Ed. *Aflatoxin: Scientific background, control and implications*. Academic Press. New York. 237-264.
- Allcroft, R. and Lewis, G. 1963. Groundnut toxicity in cattle: Experimental poisoning of calves and a report on clinical effects in older cattle. *Veterinary Research*, 75 : 487-493.
- Allcroft, R., Rogers, H., Lewis, G., Nabney, J. and Best, P.E. 1966. Metabolism of aflatoxin in sheep: excretion of the "milk toxin". *Nature (London)*, 209 : 154-155.
- Alpert, M.E., Hutr, M.S.R., Wogan, G.N. and Davidson, C.S. 1971. Association between aflatoxin content of food and hepatoma frequency in Uganda. *Cancer*, 28 : 253-260.
- Ames, B. N. 1971. The detection of chemical mutagens with enteric bacteria in A. Hollaender (Ed.), *Chemical Mutagens: Principles and Methods for their Detection*, Plenum, New York, 1 : 267-282.
- Ames, B. N., Lee, F.D. and Durston, W.E. 1973 a. An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. *Proceedings of National Academy of Sciences. USA*, 70 : 782-786.

- Ames, B.N., Durston, W.E., Yamasaki, E. and Lee, F.D. 1973 b. Carcinogens are mutagens: A simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. *Proceedings of Natural Academy Sciences. USA*, 70: 2281-2285.
- Ames, B.N., McCann, J. and Yamasaki, E. 1975. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutation Research*, 31 : 347-364.
- Amla, I., Kamala, C.S., Gopalakrishna, G.S., Jayaraj, A.P., Screenivasamurthy, V. and Parpia, H.A.B. 1971. Cirrhosis in children from peanut meal contaminated by aflatoxin. *American Journal of Clinical Nutrition*, 24 : 609-614.
- Anderson, H.W., Nehring, E.W. and Wichser, W.R. 1975. Aflatoxin contamination of corn in the field. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 23 : 775.
- Anderson, M.W., Reynolds, S.H., You, M. and Maronpot, R.R. 1992. Role of proto-oncogene activation in carcinogenesis. *Environmental Health Perspectives*, 98 :13-24.
- Apeagyei, F., Lamplugh, S.M., Hendrickse, R.G., Afframy, K. and Lucas, S. 1982. Aflatoxins in the livers of children with kwashiorkor in Ghana. *Tropical and Geographical Medicine Home. Medical of Biology Environmental*, Sep-Dec. : 9-12.
- Applebaum, R.S. and Marth, E.H. 1982. Inactivation of aflatoxin M1 in milk using hydrogen peroxide and hydrogen peroxide plus riboflavin or lactoperoxidase. *Journal of Food Protection*, 45 : 557-560.
- Argumedo, L.M., Torreblanca, A., Rosiles, R. y López, M.Y. 1985 Cuantificación de aflatoxinas y detección de zearalenona en muestras de maíz proveniente de los molinos para nixtamal del Distrito Federal. *Tecnología de los Alimentos*, 20 (3) : 15-19.
- Arriola, M.C., Porres, E., Cabrera, S., Zepeda, M. and Rolz, C. 1988. Aflatoxin fate during alkaline cooking of corn for tortilla preparation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 36 : 530-533.
- Asao, T., Büchi, G., Abdel-Kader, M.M., Chang, S.B., Wick, E.L. and Wogan, G.N. 1965. The structures of aflatoxins B and G1. *Journal of the American Chemical Society*, 87 : 882-886.
- Atkinson, D.N., Hsieh, D.P.H. and Zhao, M.S. 1993. Lack of association between p53 gene codon 249 mutation and aflatoxin-DNA adducts in human hepatomas. *Toxicologist*, 13 : 86.
- Austwick, P.K.C. 1983. Fungal nephrotoxins. *Veterinary Research Communication*, 7(1): 145-154.

Avila-Castro, R.M. 1991. Detección de aflatoxina y zearalenona en cacahuete y sus productos derivados. Tesis de Licenciatura de Biología, UNAM. México. 62 pp.

Ball, R.W., Wilson, D.W. and Coulombe, R.A. 1990. Comparative formation and removal of aflatoxin B1-DNA adducts in cultured mammalian tracheal epithelium. *Cancer Research*, 50 : 4918-4922.

Barry, D., Lillehoj, E.B., Widstrom, N.W., McMillian, W.W., Zuber, M.J., Kwolek, W.F., Guthrie, W.D. 1986. Effect of husk tightness and insect (Lepidoptera) infestation on aflatoxin contamination of preharvest maize. *Environmental Entomology*, 15:1116-1118.

Bassir, O. and Osiyemi, F. 1967. Biliary excretion of aflatoxin in the rat after a single dose. *Nature*. 215-882.

Bennett, R.A., Essigmann, J.M. and Wogan, G.N. 1981. Excretion of an aflatoxin-guanine adduct in the urine of AFB1-treated rats. *Cancer Research*, 4: 650-654.

Bilgrami, K.S. and Sinha, K.K. 1992. Aflatoxin: their biological effects and ecological significance. *In: Mycotoxins in Ecological Systems. Handbook of Applied Mycology. Vol. 5.* Editors: Bhatnagar D., Lillehoj, E.B. and Arora D.K. Marcel Dekker, Inc. Editorial New York, Basel and Hong Kong. 59-86.

Boller, R.A. and Schroeder, H.W. 1973. Influence of *Aspergillus chevalieri* on production of aflatoxin in rice by *Aspergillus parasiticus*. *Phytopathology*, 63:1507-1510.

Boller, R.A. and Schroeder, H.W. 1974. Influence of *Aspergillus candidus* on production of aflatoxin in rice by *Aspergillus parasiticus*. *Phytopathology*, 64:121-123.

Bourgeois, C.H., Shank, R.C., Grossman, R.A., Johnsen, D.O., Wooding, W.L. and Chandavimol, P. 1971. Acute aflatoxin B1 toxicity in the macaque and its similarities to Reye's Syndrome. *Laboratory Investigation*, 24: 206-216.

Bravo, G., González, A. y Rosiles, R. 1985. La aflatoxina B1 en dulce de mazapán. *Tecnología de los Alimentos Mex*, 20 (4): 33-35.

Büchi, G., Spitzner, D., Paglialunga, S. and Wogan, G.N. 1973. Synthesis and toxicity evaluation of aflatoxin P1. *Life Sciences*, 13 : 1143-1149.

Bullerman, L.B. 1981. Public health significance of molds and mycotoxins in fermented dairy products. *Journal Dairy of Science*, 64:24-39. *In: Mycotoxins and food safety. Food Technology*, 40 (5) : 60.

Bullerman, L.B. 1986. Mycotoxins and Food Safety. *Food Technology*, 40 (5) : 60.

- Butler, W.H. 1964. Acute toxicity of aflatoxin B1 in rats. *British Journal of Cancer*, 18: 756-762.
- Butler, W.H. 1969. Aflatoxicosis in laboratory animals. *In: Goldblatt, L.A. Ed. Aflatoxin: Scientific background, control and implication. Academic Press. New York. 223-236.*
- Butler, W.H. and Bearn, J.M. 1966. Carcinoma of the glandular stomach in rats given diets containing aflatoxin. *Nature*, 209: 90.
- Butler, W.H., Greenblatt, M. and Lijinsky, W. 1969. Carcinogenesis in rats by aflatoxins B1, G1 and B2. *Cancer Research*, 29: 2206-2211.
- Butler, W.H. 1974. Aflatoxin. *In: Purchase, I.F.H. Ed. Mycotoxins. Amsterdam, Elsevier. 1-28.*
- Campbell, T.C. and Salamat, L. 1971. Aflatoxin ingestion and excretion by humans. *In: Symposium on mycotoxins in human health. Purchase, I.F.H. Ed. Mac Millan Press, London. 271-280.*
- Campbell, T.C. and Hayes, J.R. 1976. The role of aflatoxin metabolism in its toxic lesion. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 35: 199-222.
- Campos-Nieto, E., Leyva Casas J. y Pérez Becerra, R. 1977. Aborto producido por aflatoxinas en un bisonte del zoológico de Chapultepec, México, D.F. *Boletín de la Sociedad Mexicana de Micología*, 11: 111-114.
- Campos-Nieto, E., Cruz, A. y Leyva, J. 1980. Dos casos de aborto porcino en una posible asociación con aflatoxina B1. *Boletín de la Sociedad Mexicana de Micología*, 14: 101-105.
- Carnaghan, R.B.A., Hartley, R.D. and O'Kelly, J. 1963. Toxicity and fluorescence properties of the aflatoxins. *Nature*, 200: 1101
- Carnaghan, R.B.A. 1965. Hepatic tumors in ducks fed on low level of toxic groundnut meal. *Nature*, 208: 308.
- Carvajal, M. and Irvin, T.R. 1988. Mycotoxins of "tortillas", their carcinogenic and cytotoxic effects. Section XVI. Poster 1-17. V. *International Congress of Plant Pathology. Kyoto, Japan, August 20-27, 1988. 450 p.*
- Carvajal, M., Moctezuma, G., Espinosa, J., Rojo, F., López-Ridaura, S. and López-Cruz, E.A. 2000. Aflatoxins in mexican tortillas and the effects of lime treatment and digestive enzymes on their mutagenicity. *In: Mycotoxins and phycotoxins in perspective at the turn of the millennium. Edited by Koe, W.J., Samson, R.A., van Egmond, H.P., Gilbert, J. and Sabino M. Ed. Board. Wageningen, The Netherlands. 133-141.*



CAST, 1989. Mycotoxins: Economic and Health Risks. Council for Agricultural Science and Technology. Report 116: 91 p.

Chainuvati, T., Viranuvatt, V. and Pongpipat, D. 1975. Relationship of hepatitis B antigen in cirrhosis and hepatoma in Thailand. An etiological significance. *Gastroenterology*, 68: 1261-1264.

Chang, L. W., Hsia, S.M. T., Chan, P. C. and Hsieh, L.L. 1994. Macromolecular adducts: biomarkers for toxicity and carcinogenesis. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 34: 41-67.

Chevel, B. 1989. *Eléments d'Epidemiologie des maladies digestives*. Medical Clinical Diagnostic, Tome 18, suppl 8: 1-8.

Chiampanichayakul, S., Kataoka, K., Arimochi, H., Thumvijit, S., Kuwahara, T., Nakayama, H., Vinitketkumnuen, U. and Ohnishi, Y. 2001. Inhibitory effects of bitter melon (*Momordica charantia* Linn.) on bacterial mutagenesis and aberrant crypt focus formation in the rat colon. *Journal of Medical Investigation*, 48 (1-2): 88-96.

Christensen, C.M. and Meronuck, R.A. 1986. Quality maintenance in stored grains and seeds. University of Minnesota Press. Minneapolis, M.N. 250-273.

Christensen, C.M. and Sauer, D.B. 1982. Mycoflora. *In: Storage of cereal grains and their products*, C.M. Christensen, Ed. American Association of Cereal Chemists. St. Paul, MN. 219-240.

Chu, F.S. 1984. Immunoassays for analysis of mycotoxins. *Journal of Food Protection*, 47 (7): 562-569.

Chu, F.S., Fan, T.S.L., Zhang, G-S. and Xu, Y-C. 1987. Improved enzyme-linked immunosorbent assay for aflatoxin B<sub>1</sub> in agricultural commodities. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 70 (5): 854-857.

Chu, F. S. 1991. Mycotoxins: food contamination, mechanism, carcinogenic potential, and preventive measures. *Mutation Research*, 259: 291-306.

Ciegler, A., Kadis, S. and Ajl, S.J. Eds. 1971. Microbial toxins, fungal toxins. Academic Press. New York. Vol. VI: 563 p.

Ciegler, A. and Peterson, R.E., 1968. Aflatoxin Detoxification: Hydroxydihydroaflatoxin B<sub>1</sub>. *Applied Microbiology*, 14: 665.

Codifer, L. P., Mann, G.E. and Dollear, F.G. 1976. Aflatoxin inactivation: treatment of peanut meal with formaldehyde and calcium hydroxide. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 53: 204-206.

Cole, R.J., Sanders, T.H., Dorner, J.W. and Blankenship, P.D. 1989. Environmental conditions required to induce preharvest aflatoxin contamination of groundnuts : Summary of six years research. *In*: Aflatoxin contamination of groundnut. ICIRISAT Center, Pantacheru, India. 279-287.

Cotty, P.J., Bayman, P., Egel, D.S. and Elias, D.S. 1994. Agriculture, aflatoxins, and *Aspergillus*. *In*: The Genus *Aspergillus*. Edited by Powell, K.A., Fenwic, A. and Peberdy, J.F. Plenum Press. New York. USA. 1-27.

Coulter, J.B.S., Lamplugh, S.M., Suliman, G.I., Omer. M.I.A. and Hendrickse, R.G. 1984. Aflatoxins in human breast milk. *Annals of Tropical Pediatrics*, 4: 61-66.

Crespi, C.L., Perman, B.W., Steimel, D.T., Gelboin, H.V., González, F.J. 1991. The development of a human cell line stably expressing human CYP3A4: Role in the metabolic activation of aflatoxin B1 and comparison to CYP1A2 and CYP2A3. *Carcinogenesis*, 12: 355-359.

Crisan, E.V. 1973. Effects of aflatoxin on germination and growth of lettuce. *Applied Microbiology*, 25 (3): 206.

Croy, R.G., Essigmann, J.M., Reinhold, V.N. and Wogan, G.N. 1978. Identification of the principal aflatoxin B1-DNA adduct formed *in vivo* in rat liver. *Proceedures of Natural Academy of Sciences. USA*, 75 (4): 1745-1749.

Dalezios, J.I., Wogan, G.N. and Weinreb, S.M. 1971. Aflatoxin P1: A new aflatoxin metabolite in monkeys. *Science*, 171: 584-585.

Dalezios, J.I. and Wogan, G.N. 1972. Metabolism of aflatoxin B1 in rhesus monkeys. *Cancer Research*, 32: 2297-2303.

Datta, K., Roy, S.K., Joseph, P., Mitra, A.K. Srinivasan, N.S. and Kulkarni, A.P. 1993. Xenobiotic metabolism in 10-weeks old human conceptus. *Toxicologist.*, 13: 60.

Davis, W.D., Dickens, J.W., Freil, R.L., Hamilton, P.B., Shotwell, O.L., Wyllie, T.D. and Fulkerson, J.F. 1980. Protocols for surveys, sampling post-collection, handling and analysis of grain samples involved in mycotoxins problems. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 63: 95-102.

Davis, N.D., Currier, C.G. and Diener, U.L. 1985. Response of corn hybrids to aflatoxin formation by *Aspergillus flavus*. *Bulletin Alabama Exp. Sta.*, 575: 3-23.

Deger, G.E. 1976. Aflatoxin: human colon carcinogenesis. *Annals of Internal Medicine*, 85: 204-208.

De longh, H., Beerthuis, R.K., Vles, R.O., Barrett, C.B. and Ord, W.O. 1962. Investigation of the factor in groundnut meal responsible for turkey X disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, 65: 548-551.

De Miguel, J. A. 1987. Rapid detection of aflatoxin producing strains of *Aspergillus flavus* group isolated from mixed feed and cereal grain in Spain. *Journal of the Science of Food and Agricultural*, 40: 11-15.

Detroy, R.W. and Hesseltine, C.W. 1970. Aflatoxicol: Structure of a new transformation product of aflatoxin B<sub>1</sub>. *Canadian Journal of Biochemistry*, 48: 830-832.

Dhavan, A.S. and Choudary, M.R. 1995. Incidence of aflatoxins in animal feedstuffs: a decade's scenario in India. *Journal of AOAC International*, 78 (3): 693-698.

Dickens, F., Jones, H.E.H. and Waynforth, H.B. 1966. Oral subcutaneous and intratracheal administration of carcinogenic lactones and related substances: The intratracheal administration of cigarette tar in the rat. *British Journal of Cancer*, 20: 134-144.

Diener, U.L. and Davis, N.D. 1970. Limiting temperature and relative humidity for aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in stored peanuts. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 47: 347-351.

Diener, U.L. and Davis, N.D. 1977. Aflatoxin formation in peanuts by *Aspergillus flavus*. Alabama Agricultural Experimental Station. Bulletin 493. Auburn, Alabama. 423-427.

Diener, U.L., Davis, N.D. and Danilson, D.A. 1985. Detoxification of aflatoxin contaminated corn makes grain safe for feeding. *Highlights of Agricultural Research*, 32 (2): 235.

Diener, U.L. and Davis, N.D. 1987. Biology of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. In Zuber, M.S., Lillehoj, E.B. and Renfro, B.L. Eds. *Aflatoxin in Maize: A Proceedings of th Workshop*. CYMMYT/UNDP/USAID. April 7-11, 1986. El Batan. Mexico, D.F. 33-40.

Doerr, J.A. 1974. Impairment of hemostatic function during aflatoxicosis in young chicken. *Poultry Science*, 53 (5): 1919.

Doerr, J.A. 1978. Enhanced susceptibility to bacterial toxins during aflatoxicosis. *Poultry Science*, 57(4): 1134.

Dutton, M.F., Ehrlich, K. And Bennett, I.W. 1985. Biosynthetic relationship among aflatoxins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, M<sub>1</sub> and M<sub>2</sub>. *Applied and Environmental Microbiology*, 49 (6): 1392-1395.

Dutton, M.F. and Heathcote, J.G. 1966. Two new Hydroxyaflatoxins. *Biochemical Journal*, 101: 21.

- Dvorak, M. 1990. Chemical detoxification of aflatoxins. *Veterinari Medicina*, 35: 37-42.
- Dvorácková, I. 1976. Aflatoxin inhalation and alveolar cell carcinoma. *British Medical Journal*, 1: 691.
- Dvorácková, I., Stora, C. and Ayraud, N. 1981. Evidence for aflatoxin B1 in two cases of lung cancer in man. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 100: 221-224.
- Eaton, D.L. and Gallagher, E.P. 1994. Mechanisms of aflatoxin carcinogenesis. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 34: 135-172.
- Ehrlich, K. and Ciegler, A. 1985. Effect of phytate on aflatoxin formation by *Aspergillus parasiticus* grown on different grains. *Mycopathologia*, 92: 3-6.
- El Gendy, S.M. and Marth, E.H. 1980. Proteolytic and lipolytic activities of some toxigenic and non toxigenic *Aspergillus* and *Penicillia*. *Journal of Food Protection*, 43: 354-355.
- Eling, T.E., Thompson, D.C., Foureman, G.L., Curtis, J.F. and Hughes, M.F. 1990. Prostaglandin H synthase and xenobiotic oxidation. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 30: 1-45.
- Epstein, S.M., Bartus, B. and Farber, E. 1969. Renal epithelial neoplasms induced in male Wistar rats by oral aflatoxin B1. *Cancer Research*, 20: 1045-1050.
- Essigmann, J.M., Croy, R.G., Bennett, R.A. and Wogan, G.N. 1982. Metabolic activation of aflatoxin B1: Patterns of DNA adduct formation, removal, and excretion in relation to carcinogenesis. *Drug Metabolism Review*, 13: 581-602.
- Fan, T.L. and Chu, F. 1984. Indirect enzyme-linked immunosorbent assay for detection of aflatoxin B1 in corn and peanut butter. *Journal of Food Protection*, 47 (4): 263-266.
- Friedman, L. and Mohr, H. 1968. Absence of interaction between cyclopropenoid fatty acids and aflatoxin in rats. *Federation Proceeding*, 27: 551.
- Fujimoto, Y., Hampton, L. L., Luo, L., Wirth, P. J. and Thorgeirsson, S.S. 1992. Low frequency of p53 gene mutation in tumors induced by aflatoxin B1 in nonhuman primates. *Cancer Research*, 52 (4): 1044-1046.
- Gardner, C.A.C., Darrah, L.L., Zuber, M.S., Wallin, J.R. 1987. Genetic control of aflatoxin production in maize. *Plant Disease*, 71 (5): 426-429.
- Garner, R.C. 1975. Reduction in binding of [<sup>14</sup>C] aflatoxin B1 to rat liver macromolecules by phenobarbitone pretreatment. *Biochemical Pharmacology*, 24: 1553-1556.

- Garner, R.C. 1985. Assessment of carcinogen exposure in man. *Carcinogenesis*, 6: 1071-1078.
- Garner, R.C., Miller, E.C., Miller, J.A., Garner, J.V. and Hanson, R.S. 1971. Formation of a factor lethal for *S. typhimurium* TA 1530 and TA 1531 on incubation of aflatoxin B1 with rat liver microsomes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 45: 774-780.
- Garner, R.C. Miller, E.C., Miller, J.A. 1972. Liver microsomal metabolism of aflatoxin B1 to a reactive derivative toxic to *Salmonella typhimurium* TA1530. *Cancer Research*, 32: 2058-2066.
- Garner, R.C., Whattam, M.M., Taylor, P.J.L. and Stow, M.W. 1993. Analysis of United Kingdom purchased spices for aflatoxins using an immunoaffinity column clean-up procedure followed by high-performance liquid chromatographic analysis and post-column derivatisation with pyridinium bromide perbromide. *Journal of Chromatography*, 648: 485-490.
- Giambone, J.J. 1978. Aflatoxin on human and cell-mediated immunosystems of chicken. *American Journal of Veterinary Research*, 39 (2): 305-308.
- Giralt-Pont, J., Javierre-Jordana, J.A., Piñol-Campanera, J.M. y Ramallo-Arroyo T. 1989. El problema de la contaminación fúngica en la industria de piensos. 2ª. Edición. Lucta, S.A. Barcelona, España. 33-65.
- Goldblatt, L.E. 1969. Aflatoxin: Scientific background, control and implications. Academic Press. New York. 472 p.
- González, P.A. 1987. The use of urea a control of aflatoxin in maize. *In*: Zuber, M.S., Lillehoj, E.B. and Renfro, B.L. Eds. *Aflatoxin in Maize: A Proceedings of the Workshop*. CYMMYT/UNDP/USAID. April 7-11, 1986. El Batán. Mexico, D.F. 280-284.
- González, M., Molerio, J. y Muñoz, M.C. 1990. Evaluación de la acción fungicida del ozono frente a *A. flavus* a productos vegetales contaminados con este hongo. I Congreso Ibero Latinoamericano de Aplicaciones del ozono. Ciudad de la Habana Cuba. 12 p.
- Goodal, C.M. and Butler, W.H. 1969. Aflatoxin carcinogenesis: inhibition of liver cancer induction in hypophysectomized rats. *International Journal of Cancer*, 4: 422-429.
- Gorman, D.P. and Kang, M.S. 1991. Preharvest aflatoxin contamination in maize: resistance and genetics. *Plant Breeding*, 107: 1-10.

- Gopalan, C., Tulpule, P.G. and Krishnamurthi, D. 1972. Induction of hepatic carcinoma with aflatoxin in the rhesus monkey. *Food Cosmetics and Toxicology*, 10: 519-521.
- Groopman, J.D., Haugen, A., Goodrich, G.R., Wogan, G.N. and Harris, C.C. 1982. Quantitation of aflatoxin B1 modified DNA using monoclonal antibodies. *Cancer Research*, 42: 3120-3124.
- Groopman, J.D. and Donahue, K.F. 1988. Aflatoxin, a human carcinogen: Determination in foods and biological samples by monoclonal antibody affinity chromatography. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 71 (5): 861-867.
- Groopman, J.D., Jiaqi, Z., Donahue, P.R., Pikul, A., Lisheng, Z., Jun-shi, C. and Wogan, G.N. 1992. Molecular dosimetry of urinary aflatoxin-DNA adducts in people living in Guangxi autonomous region, People's Republic of China. *Cancer Research*, 52: 45-52.
- Guattocchi, O.A. 1992. Introducción a la HPLC. (Aplicación Práctica) Artes Gráficas Farro. Buenos Aires. 50-110.
- Gurtoo, H.L. and Dave, C.V. 1975. *In vitro* metabolic conversion of aflatoxins and benzo(a)pyrene to nucleic acid-binding metabolites. *Cancer Research*, 35: 382-389.
- Guyton, A.C. 1967. *Tratado de Fisiología Médica*. 3ª Edición Editorial Interamericana, S.A. México, D.F. 847-886.
- Guzmán de Peña, D., Mathieu, L. y Peña-Cabriales, J.J. 1985. Presencia de aflatoxinas en maíz recién cosechado. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 27: 249-252.
- Hagler, W. M., Hutchins, J. E. and Hamilton, P. B. 1982. Destruction of aflatoxin in corn with sodium bisulfite. *Journal of Food Protection*, 45 (14): 1287-1291.
- Hagler, W. M., Hutchins, J. E. and Hamilton, P. B. 1983. Destruction of aflatoxin in corn B1 with sodium bisulfite: isolation of the major product aflatoxin B1. *Journal of Food Protection*, 46: 295-300.
- Hammerly, M.A. 1972. *Enciclopedia Médica Moderna*. Tomo II. Ediciones Interamericanas. México D.F. 1060-1072.
- Harcharan, D., Tandon, M.D., Badri, N. and Velimiri, R. 1978. Epidemic of toxic hepatitis in India of possible mycotoxic origin. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, 102: 372-374.
- Harris, C.C. and Hollstein, M. 1993. Clinical implications of the p53 tumor-suppressor gene. *The New England Journal of Medicine*, 329: 1318-1327.

Harrison, J.C., Carvajal, M. and Garner, R.C. 1991. Immunological detection of AFB1-DNA and AFB1- serum albumin adducts in rat and human tissue, *In: Human Carcinogen Exposure: Biomonitoring and Risk Assessment*. Oxford University Press, Oxford. 255-265.

Harrison, J.C. and Garner, R.C. 1991. Immunological and HPLC detection of aflatoxin adducts in human tissues after an acute poisoning incident in S.E. Asia. *Carcinogenesis*, 12: 741-743.

Harrison, J.C., Carvajal, M. and Garner, R.C. 1993. Does aflatoxin exposure in the United Kingdom constitute a cancer risk?. *Environmental Health Perspectives*, 99: 99-105.

Hartley, R.D., Nesbitt, B.F. and O'Kelly, J. 1963. Toxic metabolites of *Aspergillus flavus*. *Nature*, 198: 1056-1058.

Hayes, J.D., Judah, D.J. and Neal, G. E. 1993. Resistance to aflatoxin B1 is associated with the expression of a novel aldo- keto reductase which has catalytic activity towards a cytotoxic aldehyde containing metabolite of the toxin. *Cancer Research*, 53: 3887-3894.

Heathcote, J.G. and Hibbert, J.R. 1978. Aflatoxins chemical and biological aspects. Vol.1. Elsevier, Amsterdam. 212 p.

Heimbecher, S.K., Jorgensen, K.V., and Price, R.L. 1988. Interactive effects of duration of storage and addition of formaldehyde on levels of aflatoxin M1 in milk. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 71: 285-287.

Hesseltine, C. W. 1967. Aflatoxins and other mycotoxins. *Health Laboratory Science*, 4 (4): 222-228.

Hill, R.A., Blankenship, P.D., Cole, R.J. and Sanders, T.H. 1983. Effect of soil moisture and temperature of preharvest invasion of peanuts by the *Aspergillus flavus* group and subsequent aflatoxin development. *Applied and Environmental Microbiology*, 45: 629-633.

Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B. and Harris, C.C. 1991. p53 mutations in human cancers. *Science*, 253: 49-53.

Holzappel, C.W., Steyn, P.S. and Purchase, I.F.H. 1966. Isolation and structure of aflatoxins M1 and M2. *Tetrahedron Letters*, 25: 2799-2803.

Horwitz, W., Senzel, A., Reynolds, H. and Park, D.L. Eds. 1975. Natural poisons. *In: Chapter 26, Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. Washington, D.C., AOAC, 24.

Howart, B. 1976. Effect of dietary aflatoxin on fertility, hatchability and progeny performed of broiler breeder hens. *Applied and Environmental Microbiology*, 31 (55): 680-684.

Hsieh, D.P.H., Wong, Z.A., Wong, J.J., Michas, C. and Ruebner, B.H. 1977. Comparative metabolism of aflatoxin. *In: Rodricks, J.V., Hesseltine, C.W. and Mehman, M.A. Eds. Mycotoxins in human and animal health. Park Forest. South, IL. U.S.A., Pathotox Publishers. 37-50.*

Hsieh, L.L., Hsu, S.W., Chen, D.S. and Santella, R.M. 1988. Immunological detection of aflatoxin B1-DNA adducts formed "in vivo". *Cancer Research*, 48: 6328-6331.

Irvin, T.R. 1987. Development of DNA adduct technology to monitor human exposure to cancer-causing mycotoxins. *In: Aflatoxin in Maize: A Proceeding of the Workshop. Eds. Zuber, M.S., Lillehoj, E.B. and Renfro, B.L. CIMMYT / UNDP / USAID. April 7-11, 1986. El Batan. Mexico, D.F. 79-91.*

Ishikawa, E. and Kato, K. 1977. *Ultrasensitive enzyme immunoassay. Blackwell Scientific Publications. 155 p.*

Ito, Y., Peterson, S.W., Wicklow, D.T. and Goto, T. 2001. *Aspergillus pseudotomarii*, a new aflatoxin producing species in *Aspergillus* section *Flavi*. *Mycology Research*, 105 (2): 233-239.

Iyer, R.S., Coles, B.F., Raney, K.D., Thier, R., Guengerich, F.P. and Harris, T.M. 1994. DNA adduction by the potent carcinogen aflatoxin B1: Mechanistic studies. *Journal of the American Chemical Society*, 116: 1603-1609.

Jones, B.D. 1972. *Methods of aflatoxin analysis. Tropical Products Institute. London, 58.*

Jones, B.D. 1977. Chemistry of mycotoxins. *In: Mycotoxic Fungi. Mycotoxins. Mycotoxicoses. An Encyclopedic Handbook, Vol. I., T.D. Willie y L.G. Morehouse Eds. New York and Basel. 136-143.*

Joseph-Bravo, P.I., Findley, M. and Newberne, P.M. 1976. Some interactions of light, riboflavin, and aflatoxin B1 *in vivo* and *in vitro*. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 1: 353-376.

Kelly, S.M. 1987. Systemic infection of maize plants by *Aspergillus flavus*. *In: Zuber M.S., Lillehoj, E.B. and Renfro, B.L. Aflatoxin in Maize: A Proceedings of the Workshop CYMMYT/UNDP/USAID. April 7-11, 1986. El Batan. Mexico, D.F. 187-193.*

Kensler, T.W., Curphey, T.J., Maxiutenko, Y. and Roebuck, B.D. 2000. Chemoprotection by organosulfur inducers of phase 2 enzymes: dithiolethiones and dithiins. *Drug Metabol Drug Interact*, 17 (1-4): 3-22.



- Kok, W.T. 1994. Derivatization reactions for the determination of aflatoxins by liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography Biomedical Application.*, 659: 127-137.
- Krahn, D.F. and Heidelberger, C. 1977. Liver homogenated-mediated mutagenesis in Chinese hamster V79 cells by polycyclic aromatic hydrocarbons and aflatoxins. *Mutation Research* 1; 46 (1): 27-44.
- Krishnamachari, K.A.V.R., Bhat, R.V., Nagarajan, V. and Tilak, T.B.G. 1975. Hepatitis due to aflatoxicosis. An Outbreak in Western India. *Lancet*, 1 (7915): 1061-1063.
- Krogh, P. 1987. *Mycotoxins in food*. Academic Press. U.S.A. 65-95.
- Kubena, L.F., Harvey, R.B., Huff, W.E., Corrier, D.E. and Phillips, T.D. 1990 a. Efficacy of hydrated sodium calcium aluminosilicate to reduce the toxicity of aflatoxin and T-toxin. *Poultry Science*, 69: 1078-1086.
- Kubena, L.F., Harvey, R.B., Corrier, D.E., Phillips, T.D. and Huff, W.E., 1990 b. Diminution of aflatoxicosis in growing chickens by dietary addition of hydrated sodium calcium aluminosilicate. *Poultry Science*, 69: 727-735.
- Kubena, L.F., Huff, W.E., Harvey, R.B., Yersin, A.G., Elissalde, M.H. and Witzel, D.A. 1991. Effect of hydrated sodium calcium aluminosilicate on growing turkey poult during aflatoxicosis. *Poultry Science*, 70: 1823-1830.
- Kumagai, S. 1989. Intestinal absorption and excretion of aflatoxin in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 97: 88-97.
- Kurtzman, C.P., Horn, B.W. and Hesseltine, C.W. 1987. *Aspergillus nomius*, a new aflatoxin-producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamaris* Leeuwenhoek, 53: 147-158.
- Langone, J.L. and Van Vunakis, H. 1976. Aflatoxin B<sub>1</sub> : specific antibodies and their use in radioimmunoassay. *Journal of the National Cancer Institute*, 56 (3): 591-595.
- Lee, Y., Lee, S., Das, G.C., Park, U.S. and Park, S.M. 2000. Activation of insulin-like growth factor II transcription by aflatoxin B<sub>1</sub> induced p53 mutant 249 is caused by activation of transcription complexes, implications for a gain-of-function during the formation of hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 3; 19 (33): 3717-3726.
- Lilly, L.J. 1965. Induction of chromosome aberrations by aflatoxin. *Nature (London)*, 207: 433.
- Lillehoj, E.B., McMillian, W.W., Widstrom, N.W., Guthrie, W.D., Jarvis, J.L., Barry, D. and Kwolek, W.F. 1984. Aflatoxin contamination of maize kernels before harvest. *Mycopathologia*, 86: 77-81.

- Lin, J.K., Miller, J.A. and Miller, E.C. 1977. 2,3-dihydro-2-(guan-7-yl)-3-hydroxy-aflatoxin B1, a major acid hydrolysis product of aflatoxin B1-DNA or ribosomal RNA adducts formed in hepatic microsome-mediated reactions and rat liver *in vivo*. *Cancer Research*, 37 (12): 4430-4438.
- Linsell, C.A. and Peers, F.G. 1977. Field studies on liver cell cancer. *In*: Hiatt, H.H., Watson, J.D. and Wingsten, J.A. Eds. *Origins of human cancer*. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, N.Y.: 549-556.
- Llewelyn, G.C., Stephenson, G.A. and Hoffman, J.W. 1977. AFB1 toxicity and teratogenicity in Japanese Medaka eggs (*Oryzias latipes*). *Toxicol*, 15: 582-587.
- Machorro, V.L. y Valdivia, L.A. 1984. Cambios cuantitativos en las aflatoxinas durante el proceso de la nixtamalización y elaboración de la tortilla. *Tecnología de los Alimentos*, 19 ( 4): 10-14.
- Madhavan, T.V., Tulpule, P.G. and Gopalan, C. 1965. Aflatoxin-induced hepatic fibrosis in rhesus monkeys. *Archives of Pathology*, 79: 466-469.
- Madhavan,T.V. 1967. Tubular epithelial reflux in kidney in aflatoxin poisoning. *The Journal of Pathology and Bacteriology*, 93: 329.
- Madhavan,T.V. and Gopalan, C.1968. The effect of dietary protein on carcinogenesis of aflatoxin. *Archives of Pathology*, 85: 133-137.
- Mahalingam, R.J., Govindam, S., Punniamurthy, N., Balachandran, C. 1990. A study on aflatoxin detoxification by aqua-ammonia method in poultry feed. *Indian Veterinary Journal*, 67: 149-151.
- Marnewick, J.L., Geldelblom, W.C., and Joubert, E. 2000. An investigation on the antimutagenic properties of South African herbal teas. *Mutation Research* 20; 471 (1-2): 157-166.
- Maron, D. M. and Ames B. N. 1983. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Research*, 113: 173-215.
- Marsh, P.B. and Simpson, M.E. 1984. *Aspergillus flavus* and aflatoxin in cotton and corn by ultraviolet fluorescence. *Journal of Environmental Quality*, 13: 8-17.
- Masri, M.S., Haddon, W.F., Lundin, R.E. and Hsieh, D.P.H. 1974 a. Aflatoxin Q1: A newly identified major metabolite of aflatoxin B1 in monkey liver. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 22: 512-514.
- Masri, M.S., Booth, A.N. and Hsieh, D.P.H. 1974 b. Comparative metabolic conversion of aflatoxin B1 to aflatoxin M1 and aflatoxin Q1 by monkey, rat and chicken liver. *Life Science*, 15: 203-212.

- Massey, T. E., Stewart, R. K., Daniels, J. M. and Liu, L. 1995. Biochemical and molecular aspects of mammalian susceptibility to aflatoxin B1 carcinogenicity. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 208 (3): 213-227.
- McCann, J., Spingar, N.E., Kobori, J. and Ames, B.N. 1975. Detection of carcinogenes as mutagens: bacterial tester strains with R factor plasmids. *Procedures of Natural Academy of Sciences. U.S.A.*, 72 (3): 979-983.
- McMahon, G., Davis, E.F., Huber, L.J., Kim, Y. and Wogan, G.N. 1990. Characterization of c-K-ras and N-ras oncogenes in aflatoxin B1 induced rat liver tumors. *Procedures of Natural Academy of Sciences. USA.*, 87: 1104-1108.
- McMillian, W.W., Widstrom, N.W. and Wilson, D.M. 1985. Insect damage and aflatoxin contamination in preharvest corn: influence of genotype and ear wetting. *Journal of Entomological Science*, 20: 66-68.
- McMillian, W.W., Widstrom, N.W. and Wilson, D.M. 1987. Impact of husk type and species of infesting insects on aflatoxin contamination in preharvest corn at Tifton, Georgia. *Journal of Entomological Science*, 22: 307-310.
- Mitchell, G.E. 1988. Influence of irradiation of food on aflatoxin production. *Food Technology in Australia*, 40 (8): 324-326.
- Mitchell, M.D., Brennecke, S.P., Saeed, S.A. and Strickland, D.M. 1985. Arachidonic acid metabolism in the fetus and neonate. *In: Cohen, M.M, Ed. Biological Protection with Prostaglandins. Boca Raton: CRC Press*, 1: 27-44.
- Moerck, K.E., McElfresh, P., Wohlman, A., Hilton, B.W. 1980. Aflatoxin destruction in corn using sodium bisulfite, sodium hydroxide and aqueous ammonia. *Journal of Food Protection*, 43: 571-574.
- Moreno, E. and Ramírez, J. 1985. Protective effect of fungicides on corn seed stored with low and high moisture content. *Seed Science and Technology*, 13: 285-290.
- Moreno, M.E. 1988. The influence of hermetic storage on the behavior of maize seed germination. *Seed Science and Technology*, 13: 285-290.
- Moreno, E. y Gil, M. 1991. La biología de *Aspergillus flavus* y la producción de aflatoxinas. Primera edición. Instituto de Biología, UNAM. 42 p.
- Moss, M.O. 1996. Mycotoxins. *Mycological Research*, 100 (5): 513-523.
- Mouncastle, V.B. 1977. Fisiología Médica. La Prensa Médica Mexicana. Segunda edición. México, D.F. Vol. II: 1090-1091.

Netter, F.H. 1990. Colección Ciba de ilustraciones médicas. Tomo III/2. Sistema Digestivo. Conducto Inferior. Tomo III/3. Sistema Digestivo. Hígado, Páncreas, Vías biliares. Salvat. 5ª reimpresión. Barcelona, España. 55: 89-93.

Newberne, P.M. 1974. Mycotoxins: Toxicity, carcinogenicity and the influence of various nutritional conditions. *Environmental Health Perspectives*, 9: 1-32.

Newberne, P.M. and Wogan, G.N. 1968. Sequential morphologic changes in aflatoxin B1 carcinogenesis in the rat. *Cancer Research*, 28: 770-781.

Newberne, P.M. and Butler, W.H. 1969. Acute and chronic effects of aflatoxin on the liver of domestic and laboratory animals: A review. *Cancer Research*, 29: 236-250.

Newberne, P.M., Chan, W.C.M. and Rogers, A.E. 1974. Influence of light, riboflavin, and carotene on the response of rats to the acute toxicity of aflatoxin and monocrotaline. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 28: 200-208.

Newberne, P.M. and Suphakarn, V. 1977. Preventive role of vitamin A in colon carcinogenesis in rats. *Cancer*, 40: 2553-2556.

Newberne, P.M. and Gross, R.L. 1977. The role of nutrition in aflatoxin injury. *In*: Rodricks, J.V., Hesseltine, C.W. and Mehلمان, M.A. Eds. *Mycotoxins in human and animal health*. Park Forest South, IL., U.S.A., Pathotox Publishers. 51-65.

Norred, W.P. 1982. Ammonia treatment to destroy aflatoxins in corn. *Journal of Food Protection*, 45 (10): 972-977.

Ochoa, M.A., Torres, C. P., Moreno, J.G., Yepiz, G.S., Alvarez, C. R., Marroquin, J.A., Tequida, M.M. y Silveira, G.M. 1989. Incidencia de aflatoxina B1 y zearalenona en trigo y maíz almacenado en el estado de Sonora. *Revista de Ciencias Alimentarias*. Vol. 1 (1): 1.

Olsen, J.H., Dragsted, I. and Autrup, H. 1988. Cancer risk and occupational exposure to aflatoxins in Denmark. *British Journal of Cancer*, 58: 236-250.

Olson, L.C., Bourgeois, C.H., Cotton, R.B., Harikui, S., Grossman, R.A. and Smith T. 1983. Encephalopathy and fatty degeneration of the viscera in northeastern Thailand. *Clinical Syndrome and Epidemiology Pediatrics*, 47: 707.

Ong, T.M. 1975. Aflatoxin mutagenesis. *Mutation Research*, 32: 35-53.

Organización Panamericana de la Salud. 1983. Criterios de Salud Ambiental. 11: Micotoxinas Oficina Sanitaria Panamericana. Oficina Regional de la Organización Mundial de la Salud. 2-83.

zurk, M. 1991. p53 mutation in hepatocellular carcinoma after aflatoxin exposure. *Lancet*, 338: 1356-1359.

Park, D.L., Jemmali, M., Frayssinet C., Lafarge-Frayssinet, C. 1981. Decontamination of Aflatoxin-Contaminated peanut meal using monomethylamine:  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ . *Journal of the American Oil Chemistry Society*, 995-1002.

Park, D.L., Lee, L.S., Price, R.L. and Pohland, A.E. 1988. Review of the decontamination of aflatoxins by ammoniation: current status and regulation. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 71: 685-703.

Park, D.L. and Rua, S.M. 1991. Sample collection and sample preparation techniques for aflatoxin determination in whole cottonseed. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 74 (1): 73-75.

Parker, W.A. and Melnick, D. 1966. Absence of aflatoxin from refined vegetable oils. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 43: 645.

Patterson, D.S.P. 1973. Metabolism as a factor in determining the toxic action of the aflatoxin in different animal species. *Food Cosmetics and Toxicology*, 11: 287-294.

Patterson, D.S.P. 1976. Structure, metabolism and toxicity of the aflatoxins: A review. *Cahiers de Nutrition et de Dietetique*, 11 (Suppl. 2): 71-76.

Patterson, D.S.P. 1977. Aflatoxins and related compounds. *In: Mycotoxic Fungi, Mycotoxins, Mycotoxicoses. An Encyclopedic Handbook. Vol. I*, T.D. Willie and L.G. Morehouse Eds. New York and Basel. 136-189.

Patterson, D.S.P. and Roberts, B.A. 1971. The *in vitro* reduction of aflatoxins B1 and B2 by soluble avian liver enzymes. *Food Cosmetics and Toxicology*, 9: 829-837.

Patterson, D.S.P. and Roberts, B.A. 1972 a. Steroid sex hormones as inhibitors of aflatoxin metabolism in liver homogenates. *Experientia*, 28: 929-930.

Patterson, D.S.P. and Roberts, B.A. 1972 b. Aflatoxin metabolism in duck-liver homogenates: The relative importance of reversible cyclopentenone reduction and hemiacetal formation. *Food Cosmetics and Toxicology*, 10: 501-512.

Peckok, R.L. and Shields, D. 1983. *Métodos de análisis químicos*. Limusa. México. 487 p.

Peers, F.G. and Linsell, C.A. 1973. Dietary aflatoxins and liver cancer - A population based study in Kenya. *British Journal of Cancer*, 27: 473-484.

Peers, F.G., Gilman, G.A. and Linsell, C.A. 1976. Dietary aflatoxins and human liver cancer. A study in Swaziland. *International Journal of Cancer*, 17: 167-176.

Peers, F.G. and Linsell, C.A. 1977. Dietary aflatoxins and human primary liver cancer. Gaucher, A. Ed. *Annals of Nutrition and Alimentation*, 31: 1005-1018.

Pestka, J.J. 1986. Fungi and mycotoxins in meats. *In: Advances in Meat Research*. Westport, CT: AVI Publishing, 2: 277-309.

Pestka, J.J. 1988. Enhanced surveillance of foodborne mycotoxins by immunochemical assay. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 71: 1075-1081.

Phillips, T.D., Clement, B.A., Kubena, L.F. and Harvey, R.B. 1988. Mycotoxin: Detection and detoxification. *Proc. 23<sup>rd</sup> Natl. Meet. Poultry Health and Condemnations*. Ocean City, MD. Delmarva Poultry Industry, Inc. 94-106.

Pier, A.C., Firchner, R.E. and Cysewski, S.J. 1977. Effect of aflatoxin on the cellular immune system. *Annals of Nutrition Animal*, 34: 781-788.

Pier, A.C. 1979. Implications of mycotoxins in animal-disease. *Journal American of Veterinary Medicine*, 175 (6): 605.

Pier, A.C. and McLoughlin, M.E. 1985. Mycotoxic suppression of immunity. *In: Trichothecenes and other mycotoxins*. Edited by J. Lacey. John Wiley and Sons Ltd. 507-519.

Piva, G., Galvano, F., Pietri, A. and Piva, A. 1995. Detoxification methods of aflatoxins. A review. *Nutrition Research*, 15 (5): 767-776.

Pohland, A.E., Cushmac, M.E. and Andrellos, P.J. 1968. Aflatoxin B1 Hemiacetal. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*. 51: 907.

Pons, W.A., Cucullu, A.F., Lee, L.S., Janssen, H.J. and Goldblatt, L.A. 1972. Kinetic Study of Acid-Catalized Conversion of Aflatoxins B1 and G1 to B2a and G2a. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 49: 124.

Price, R.L. and Jorgensen, K.V. 1985. Effects of processing on aflatoxin levels and on mutagenic potential of tortillas made from naturally contaminated corn. *Journal of Food Science*, 50: 347-349.

Prince, A.M., Szmunn, W., Michon, J., Demaille, J., Diebolt, G., Linhard, J., Quenum, C, and Sankale, M. 1975. A case control study of the association between primary liver cancer and hepatitis B infection in Senegal. *International Journal of Cancer*, 16: 376-383.

Purchase, I.F.H. 1967. Acute toxicity of aflatoxins M1 and M2 in one-day-old ducklings. *Food Cosmetics and Toxicology*, 5: 339-342.

- B.P., Hart, P., Shotwell, O.L. and Pestka, J.J. 1986. Enzyme immunoassay of aflatoxin B1 in naturally contaminated corn and cottonseed. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 69: 904-907.
- Reber, K.B. and Fennell, D.I. 1965. The Genus "Aspergillus". Williams and Wilkins, Baltimore. USA. 360-379.
- Ausuddin, R., Singh, K.P., Zaidi, S.I.A. and Saxena, A.K. 1990. Effects of aflatoxin of lymphoid cell of weanling rats. *Journal of Applied Toxicology*, 10: 245-250.
- Reddy, G.S., Tilak, T.B.G. and Krishnamurthi, D. 1973. Susceptibility of vitamin A-deficient rats to aflatoxin. *Food Cosmetics and Toxicology*, 11: 467-470.
- Reye, R.D.K., Morgan, G. and Baral, J. 1963. Encephalopathy and fatty degeneration of the viscera: A disease entity in childhood. *Lancet*, 2: 749-752.
- Reyes, C.P. 1990. Botánica del Maíz. En: El maíz y su cultivo. Primera Edición. A.G.T. Editor, S.A. México, D.F. 141-154, 460.
- Reys, L.L. and Sequeira, O.A. 1974. Detection of Australia antigen (HBAg) in blood donors and hepatoma patients in Mozambique. *South Africa Medical Journal*, 48: 267-269.
- Robens, J.G. and Richard, J.L. 1992. Aflatoxin in animal and human health. *Rev. Environmental Contamination of Toxicology*, 127: 69-94.
- Rodríguez, C. 1988. Identificación de la micoflora y análisis de las micotoxinas en pastas para sopa. Tesis de Licenciatura en la carrera de Biología, UNAM. México. 54 p.
- Rogers, A.E. 1975. Variable effects of a lipotrope-deficient, high fat diet on chemical carcinogenesis in rats. *Cancer Research*, 35: 2469-2474.
- Romer, T.R. 1975. Screening method for the detection of aflatoxins in mixed feeds and other agricultural commodities with subsequent confirmation and quantitative measurement of aflatoxins in positive samples. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 58: 500-506.
- Rosiles, R. 1979. Las aflatoxinas en las tortillas. *Veterinaria de México*, 10: 37-44.
- Roy, A.K. and Chourasia, H.K. 1989. Effect of temperature on aflatoxin production in *macuna pruriens* seed. *Applied and Environmental Microbiology*, 55: 531-532.
- Salhab, A.S. and Edwards, G.S. 1977. Comparative *in vitro* metabolism of aflatoxinol by liver preparations from animals and humans. *Cancer Research*, 37: 1016-1021.

Salhab, A.S. and Hsieh, D.P.H. 1975. Aflatoxicol H<sub>1</sub>: A major metabolite of aflatoxin B<sub>1</sub> produced by human and rhesus monkey livers *in vitro*. Research Communication in Chemical Pathology and Pharmacology, 10: 419-431.

Sánchez-Regueiro, O., García-Pino, C. y Grata-González, E. 1984. Niveles de aflatoxina B en arroz, trigo y algunos de sus derivados. Revista Cubana de Higiene y Epidemiología, 22: 92-97.

Sargeant, K., O'Kelly, J., Carnaghan, R.B.A. and Allcroft, R. 1961. The assay of a toxic principle in certain groundnut meals. Veterinary Research, 73: 1219-1223.

Sargeant, K., Sheridan, A., O'Kelly, J. and Carnaghan, R.B.A. 1983. Toxicity associated with certain samples of groundnuts. Nature, 191: 1096.

Sato, S., Matsushima, T., Tanaka, N., Sugimura, T. and Takashima, F. 1973. Hepatic tumors in the guppy (*Lebistes reticulatus*) induced by aflatoxin B<sub>1</sub>, dimethylnitrosamine, and 2-acetylaminofluorene. Journal of the National Cancer Institute, 50: 765-778.

Sauer, D.B. and Burroughs, R. 1974. Efficacy of various chemicals as grain mould inhibitors. Transactions of the American Society of Agricultural Engineering, 17: 557-559.

Shank, R.C. 1977. Epidemiology of aflatoxin carcinogenesis. In: Kraybill, H.F. and Mehlman, M.M. Eds. Environmental cancer. Advances in modern toxicology. Vol 3. John Wiley and Sons. New York, US. 291-318.

Shank, R.C., Wogan, G.N., Gibson, J.B. and Nondasuta, A. 1972 a. Dietary aflatoxins and human liver cancer. II. Aflatoxins in market food and foodstuffs of Thailand and Hong Kong. Food Cosmetics and Toxicology, 10: 61-69.

Shank, R.C., Gordon, J.E., Wogan, G.N., Nondasuta, A. and Subhamani, B. 1972 b. Dietary aflatoxins and human liver cancer. III. Field survey of rural Thai families for ingested aflatoxins. Food Cosmetics and Toxicology, 10: 71-84.

Shanta, T., Sreenivasa, N., Rati, E.R. and Prema, V. 1986. Detoxification of groundnut seed by urea and sunlight. Journal Food Safety, 7 (4): 225.

Shayiq, R.M. and Avadhani, N.G. 1989. Purification and characterization of hepatic mitochondrial cytochrome P-450 active in aflatoxin B<sub>1</sub> metabolism. Biochemistry, 28 (19): 7546-7554.

Shepherd, M.J, Mortimer, D.N and Gilbert, J. 1987. A review of approaches to the rapid analysis of aflatoxins in foods. Association Public Analysts Journal, 25: 129-142.



Shih, C.N. and Martin, E.H. 1974, Aflatoxin formation, lipid-synthesis and glucose-metabolism by *A. parasiticus* during incubation with and without agitation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 338 (1): 286-296.

Singh, A. and Sinha, K. K. 1983. Biochemical changes and aflatoxin production in guava fruits by *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* *Indian Phytopathology*, 36: 365-366.

Sinnhuber, R.O., Lee, D.J., Wales, J.H. and Ayres, J.L. 1968. Dietary factors and hepatoma in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). II. Cocarcinogenesis by cyclopropenoid fatty acids and the effect of gossypol and altered lipids on aflatoxin-induced liver cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 41: 1293-1301.

Smith, T.K. 1982. Influence of mycotoxins on protein and amino-acid utilization. *Federation Proceeding*, 41 (11): 2828-2832.

Sohn, S., Jaitovitch-Groisman, I., Benlimame, N., Galipeau, J., Batist, G. and Alaoui-Jamali, M.A. 2000. Retroviral expression of the hepatitis B virus x gene promotes liver cell susceptibility to carcinogen-induced site specific mutagenesis. *Mutation Research*, 460 (1): 17-28 .

Starling, E.H. and Hartridge, H. 1952. *Principios de Fisiología Humana*. 10ª Edición. Aguilar, S.A. de Ediciones, Madrid, España. 866 p.

Steel, R. y Torrie, J. 1985. *Bioestadística: Principios y procedimientos*. Segunda edición. McGraw-Hill. México, D.F. 622 p.

Steyn, P.S., Vleggaar, R. and Wessels, P.L. 1980. The biosynthesis of aflatoxin and its congeners. Chap. 4. *In: The biosynthesis of mycotoxins*. Steyn, P.S. Ed. Academic Press. New York, U.S.A. 105-155.

Stoloff, L. 1972. Analytical methods for mycotoxins. *Clinical Toxicology*, 5: 465-494.

Stoloff, L. 1979. The three eras of fungal toxin research. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 56: 784.

Stoloff, L. and Trager, W. 1965. Recommended decontamination procedures for aflatoxin. *Journal of the American Agricultural*, 48: 681.

Stora, C., Dvorácková, I. and Ayraud, N. 1983. Aflatoxin and Reye's syndrome. *Journal of Medicine*, 14 ( 1): 47-53.

Suit, J.L., Rogers, A.E., Jetten, M.E.R. and Luria, S.E. 1977. Effects of diet on conversion of aflatoxin B1 to bacterial mutagen(s) by rats *in vivo* and by rat hepatic microsomes *in vitro*. *Mutation Research*, 46: 313-323.

Svoboda, D., Grady, H.J. and Higginson, J. 1966. Aflatoxin injury in rat and monkey liver. *The American Journal of Pathology*, 49: 1023-1051.

Swenson, D.H., Miller, E.C. and Miller, J.A. 1974. Aflatoxin B1-2,3-oxide: Evidence for its formation in rat liver *in vivo* and by human liver microsomes *in vitro*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 60: 1036-1043.

Swenson, D.H., Lin, J.K., Miller, E.C. and Miller, J.A. 1977. Aflatoxin B1-2,3-oxide as a probable intermediate in the covalent binding of aflatoxins B1 and B2 to rat liver DNA and ribosomal RNA *in vivo*. *Cancer Research*, 37: 172-181.

Taguchi, S., Fukushima, S., Sumimoto, T., Yoshida, S. and Nishimune, T. 1995. Aflatoxins in foods collected in Osaka, Japan, from 1988 to 1992. *Journal of AOAC International*, 78 (2): 325-327.

Temcharoen, P., Anukarahanonta, T. and Bhamarapavati, N. 1978. The influence of dietary protein and vitamin B12 on the toxicity and carcinogenicity of aflatoxins in rat liver. *Cancer Research*, 38: 2185-2190.

Tilak, T.B. 1975. Induction of cholangiocarcinoma following treatment of a rhesus monkey with aflatoxin. *Food Cosmetics and Toxicology*, 13: 247-249.

Torreblanca, A., Bourges, H. and Morales, J. 1987. Aflatoxin in maize and tortillas in Mexico. *In*: Zuber, M.S., Lillehoj, E.B. and Renfro, B.L. *Aflatoxin in Maize: A Proceedings of the Workshop. CYMMYT/UNDP/USAID. April 7-11, 1986. El Batan. Mexico, D.F.* 310-317.

Torres, CH.P., Yepis, G.S., Moreno, I.G. y Bedolla, V. S. 1987. Nixtamalización como método de detoxificación para aflatoxinas. *Tecnología de los Alimentos*, 22 (6): 13.

Trail, F., Mahanti, N. and Linz, J. 1995. Molecular biology of aflatoxin biosynthesis. *Microbiology*, 141: 755-765.

Trinder, D.W. 1988. A survey of aflatoxins in industrially brewed South African sorghum beer and beer strainings. *Journal of the Institute of Brewing*, 95: 307-309.

Tsuruta, O., Kawasugi, S., Saito, M. and Manabe, M. 1985. An examination on *Aspergillus flavus* infection of Thailand maize. *Proceeding of Japan Association of Mycotoxicology*, 21: 32-33.

Tsuruta, O. 1987. Quality deterioration of cereal grains caused by fungal infection during storage. Corn and milo imported for feed. *Japan Agriculture Research Quarterly*, 20 (4): 276-281.

Tung, H.T. 1971. Aflatoxicosis and bruising in chicken. *Poultry Science*, 50(3): 795.

- sa, M. and Schroeder, H.W. 1969. Effect of making tortillas from corn. *Cereal Chemistry*, 46: 100-102.
- Grignon, H.P., Paulsch, W.E., Veringa, H.A. and Schuller, P.L. 1977. The effect of processing on the aflatoxin M1 content of milk and milk products. *Archives of the Pasteur Tunis*, 54: 381-390.
- Rensburg, S.J., Van Der Watt, J.J., Purchase, I.F.H., Pereira-Coutinho, L. and Kham, R. 1974. Primary liver cancer rate and aflatoxin intake in a high cancer area. *South African Medical Journal*, 48: 2508 a -2508 d.
- Asselinovitch, S.D., Mihailovich, N., Wogan, G.N., Lombard, L.S. and Rao, K.V.N. 1972. Aflatoxin B1, a hepatocarcinogen in the infant mouse. *Cancer Research*, 32: 2289-2291.
- Villarreal-Lozano, B. 1990. Aspectos generales sobre aflatoxinas. *Revista de Ciencias Alimentarias*, 1 (2): 21-25.
- Vogel, C.L., Anthony, P.P., Mody, N. and Barker, L.F. 1970. Hepatitis-associated antigen in Ugandan patients with hepatocellular carcinoma. *Lancet*, 2: 621-624.
- Wales, J.H. and Sinnhuber, R.O. 1972. Hepatomas induced by aflatoxin in the sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). *Journal of the National Cancer Institute*, 48: 1529-1530.
- Ward, J.M., Sontag, J.M., Weisburg, E.K. and Brown, C.A. 1975. Effect of lifetime exposure to aflatoxin B1 in rats. *Journal of the National Cancer Institute*, 55: 107-113.
- Wei, R.D. 1968. El problema de la contaminación fúngica en la industria de piensos. *Chinese J. Physiol.*, 20. En: Giralt Pont, J., Piñol Campanera, J., Arroyo, R. 1989. 2ª Edición. Lucta, S.A. Barcelona España. 33-65.
- Wei, C. and Hsieh, D.P.H. 1980. Aflatoxin in human and animal health. Proc. of the 84th Annual Meeting of the US Animal Health Association. Louisville. Kentucky. USA.
- Wheeler, J.L., Harrison, M.A. and Koehler, P.E. 1987. *In vitro* metabolism of aflatoxin B1 with microsomal enzymes in the presence of selected nutrients. *Journal of Food Science*, 52 (5): 1432-1433.
- Wild, C.P., Pionneau, F., Montesano, R., Mutiro, C.P. and Chetsanga, C.J. 1987. Aflatoxin in human breast milk. *International Journal of Cancer*, 40: 328-33.
- Wilson, D.M. and Jay, E. 1975. Influence of modified atmosphere storage on aflatoxin production in high-moisture corn. *Applied Microbiology*, 29: 224-228.
- Wilson, D.M. and Stansell, J.R. 1983. Effect of irrigation regimes on Aflatoxin contamination of peanut pods. *Peanut Science*, 10: 54-56.

- Wogan, G.N. 1992. Aflatoxins as risk factors for hepatocellular carcinoma in humans. *Cancer Research*, (Suppl) 52 : 2114s-2118s.
- Wogan, G.N., Edwards, G.S. and Newberne, P.M. 1971. Structure-activity relationships in toxicity and carcinogenicity of aflatoxins and analogs. *Cancer Research*, 31: 1936-1942.
- Wogan, G.N. 1973. Aflatoxin carcinogenesis. *In*: Bush, M. Ed. *Methods in cancer research*. New York, Academic Press. 309-344.
- Wogan, G.N., Paglialunga, S. and Newberne, P.M. 1974. Carcinogenic effect of low dietary levels of aflatoxin B1 in rats. *Food Cosmetics and Toxicology*, 12: 681-685.
- Wong, J.J. and Hsieh, D.P.H. 1976. Mutagenicity of aflatoxins related to their metabolism and carcinogenic potential. *Proceedures of National Academy of Sciences*, 73: 2241-2244.
- Wyllie, T.D. and Morehouse, L.G. 1978. *Mycotoxic fungi, mycotoxins and mycotoxicoses*. Vol. 3. Marcel Dekker Inc. U.S.A. 119-143.
- Yen, I.C. and Bidasee, K.R. 1993. Liquid chromatographic determination of aflatoxins in animal feeds and feed components. *Journal of AOAC International*, 76 (2): 366-370.
- Yokochi, C., Rohen, J. and Weinreb, E. 1991. *Atlas fotográfico de anatomía del cuerpo humano*. Editorial Interamericana, McGraw-Hill. Tercera Edición, México D.F. 73, 118 p.
- Yoshimoto, T., Magata, K., Ehara, H., Mizuno, K. and Yamamoto, S. 1986. Regional distribution of prostaglandin endoperoxide synthase studied by enzyme-linked immunoassay using monoclonal antibodies. *Biochimica et Biophysica Acta* 877: 141-150.
- Yoshizawa, H., Uchimarui, R., Kamataki, T., Kato, R. and Ueno, Y. 1982. Metabolism and activation of aflatoxin B1 by reconstituted cytochrome P-450 system of rat liver. *Cancer Research*, 42: 1120-1124.
- Yu, F.K., Huang, J.X., Bender, W., Wu, Z.R., Chang, J.C. 1991. Evidence for the covalent binding of aflatoxin B1-dichloride to cytosine in DNA. *Carcinogenesis*, 12: 997-1002.
- Zenteno-Zevada, M. 1971. Producción de aflatoxinas por cepas de *Aspergillus flavus* aisladas de maíz. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 13: 263-266.