



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**“Identificación y cuantificación de Aflatoxinas (Bis-
dihidrofurano cumarinas), en tortillas de maíz, y
estudio de su mutagénesis con la prueba de Ames
con *Salmonella typhimurium* TA-98”**

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. PÁVEL CASTILLO URUETA



TUTOR: **Dra. Magda Carvajal Moreno**

AÑO: 2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

SINODALES

PRESIDENTE:	Dr. Alberto Tecante Coronel
VOCAL:	Dra. Araceli Peña Álvarez
VOCAL:	Dr. Jesús Javier Espinoza Aguirre
VOCAL:	Dr. Andrés Navarrete Castro
SECRETARIO:	Dra. Alejandra Hernández Santoyo

Congresos en que se presentó el trabajo.

Castillo-Urueta P., Carvajal M., Méndez I., Meza F., Gálvez A. 2008. Aflatoxinas en tortillas de maíz de la Ciudad de México. III Congreso Nacional y II Internacional de Nixtamalización: Del Maíz a la Tortilla. **FATA, UNAM**. Hotel Las Camelinas, **Querétaro**, Qro.20-23 de octubre 2008. 300-304.

Castillo-Urueta P., Carvajal M., Méndez I., Meza F. y Gálvez A. 2008. Identificación y cuantificación de Aflatoxinas (Bis-dihidrofuranocumarinas), en tortillas de maíz de la Ciudad de México. I Simposio Nacional de Micotoxinas. Panamá, **Panamá**. 21-22 de noviembre de 2008.

Castillo Urueta P., Carvajal M., Méndez I., Meza F. y Gálvez A.. 2009. **Niveles de Aflatoxinas en tortillas de maíz de la Ciudad de México**. Sesión de Micotoxinas. X Congreso Nacional de Micología. Organizado por la Sociedad Mexicana de Micología y la Universidad de Guadalajara. 20-24 de septiembre de 2009. Hotel Misión Carlton. Guadalajara, Jalisco. 220 p.

Castillo-Urueta P., Carvajal M., Méndez I., Meza, F., Gálvez A. 2010. **Aflatoxin concentrations in maize 'tortillas', from Mexico City**. 279 pp. En: Magda Carvajal, Ed. **VI Congreso Latinoamericano de Micotoxicología y II Symposium Internacional de Toxinas de Algas y Hongos para la Industria**. 27 de junio al 1° de Julio de 2010. UNAM. Hotel Fiesta Americana, Mérida, Yucatán, México. 410 pp.

Publicaciones

Castillo-Urueta, P., Carvajal, M., Méndez, I., Meza, F., Gálvez, A. 2011. Survey of aflatoxins in maize tortillas from Mexico City. Food Additives and Contaminants: Part B: Surveillance, 1939-3229, Vol. 4(1):42-51.

Agradecimientos

A Personas

A la Dra. Magda Carvajal, del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), por la dirección de esta tesis, su cuidadosa revisión, el apoyo en los Exámenes Tutorales y las publicaciones de este y otros trabajos.

A la M. en C. Ángela Sotelo López[†], Facultad de Química, UNAM, por sus acertados comentarios, sugerencias, confianza. Por haber sido una excelente profesora, investigadora y Miembro del Comité Tutorial.

A la Dra. Amanda Gálvez Mariscal, Facultad de Química, UNAM, por sus acertados comentarios, sugerencias y por el apoyo recibido en el muestreo y desarrollo de la investigación.

Al Dr. Octavio Eugenio Reyes Salas, Facultad de Química, UNAM, por sus siempre acertados comentarios y sugerencias y por el apoyo brindado para la culminación de esta investigación.

Al Dr. Ignacio Méndez del Instituto de Investigaciones en Matemáticas Aplicadas y en Sistemas (IIMAS), UNAM, por su colaboración en el diseño experimental, muestreo y análisis estadístico de la investigación.

A la Dra. Josefina Cortés Eslava, del Centro de Ciencias de la Atmósfera, UNAM, por su apoyo técnico para realizar la prueba de Ames.

Al M.C. Israel Pérez López, del laboratorio de Oncología Experimental del Instituto Nacional de Pediatría, SSA, por la donación de cepas de TA-98 de *Salmonella typhimurium* para realizar la prueba de Ames.

A la Dra. Sandra Gómez Arroyo, del Centro de Ciencias de la Atmósfera, UNAM, por su apoyo institucional para realizar la prueba de Ames.

A Florencia Meza por su apoyo durante el primer año de muestreo.

A los sinodales Dr. Alberto Tecante Coronel, Dra. Araceli Peña Álvarez, Dr. Jesús Javier Espinoza Aguirre, Dr. Andrés Navarrete Castro, Dra. Alejandra Hernández Santoyo, por sus comentarios y sugerencias que me permitieron mejorar la tesis.

A Instituciones

A la **Universidad Nacional Autónoma de México** por haberme brindado sus puertas, instalaciones, profesores, programas. Por ser mi segunda casa.

Al **Instituto de Biología**, UNAM, por hacer posible esta tesis aportando el laboratorio C-119 de Micotoxinas, equipo, materiales, reactivos, técnicas, bases de datos y facilidades en cómputo.

A **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)**, por la Beca de Doctorado N° **181805**.

A la **Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA)**, UNAM, por el apoyo al proyecto del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) IN226807 y a la beca de proyecto para culminación de tesis.

Al **Posgrado de Ciencias Químicas**, y Servicios Administrativos del Posgrado, UNAM, por aceptarme en su Plan de Doctorado.

Al **Centro de Ciencias de la Atmósfera**, UNAM, por la infraestructura, parte del material y laboratorios para realizar la prueba de Ames.

Al **laboratorio de Oncología Experimental del Instituto Nacional de Pediatría**, SSA, por la donación de las cepas de *Salmonella typhimurium* TA-98 para realizar la prueba de Ames.

Al **Instituto de Investigaciones en Matemáticas Aplicadas y en Sistemas**, UNAM, por su apoyo en el análisis estadístico y evaluación de la investigación.

DEDICATORIA

Con todo mi amor para mis padres Juana Cipactli y Sigfrido, por su apoyo y ejemplo, a mi hermano Sigfrido y a Virginia por su solidaridad y a mis sobrinos Yolotzin y Mazatzin por su cariño y alegría.

TABLA DE CONTENIDO

Páginas

Agradecimientos.....	i
A Personas.....	i
A Instituciones.....	ii
RESUMEN	ix
ABSTRACT	xi
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Importancia del maíz y tortillas en México.....	1
1.2. Diferentes mohos que contaminan el maíz y sus productos derivados.....	3
1.3. <i>Aspergillus spp.</i> , y la producción de aflatoxinas.....	5
1.4. Mutagenicidad y prueba de Ames.....	16
II. OBJETIVOS	19
<i>Actividades para el logro de los objetivos</i>	19
HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	19
NULA.....	19
ALTERNA.....	19
III. MATERIALES Y MÉTODOS	20
3.1. Muestreo y encuestas.....	20
3.2. Secado y molienda de tortillas.....	21
3.3. Análisis químico de las aflatoxinas.....	22
3.4. Prueba de Ames para muestras de tortilla.....	28
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	37
4.1. Muestreo y encuestas.....	37
4.2. Cálculo del factor de corrección.....	44
4.3. Curvas de calibración.....	45
4.4. Validación del método.....	50
4.5. Identificación y cuantificación de aflatoxinas en tortillas.....	54
4.6. Análisis estadístico de la contaminación de AF en tortillas.....	61
4.7. Prueba de mutagenicidad de las tortillas por el método de Ames.....	62
4.8. Verificación de la cepa <i>Salmonella typhimurium</i> TA98 con controles positivos y AFB ₁	65
4.9. Separación de las AF de los extractos de tortillas de maíz por capa fina para ser usados en la prueba de Ames.....	67
4.10. Prueba de Ames para las AF obtenidas mediante extracción de tortillas sin acidificación.....	68
4.11. Prueba de Ames para las AF obtenidas mediante extracción ácida de tortillas.....	70
V. CONCLUSIONES	75
VI. REFERENCIAS.....	76
ANEXO 1: Resultados de las encuestas de los muestreos.....	87
ANEXO 2: Resultados de la presencia de AF en los cuatro muestreos de tortilla.....	99
ANEXO 3: Cromatogramas de las muestras de tortillas.....	103
ANEXO 4. Soluciones y medios de cultivo para la Prueba de Ames.....	112

Lista de Tablas

N°	Tabla	Página
Tabla 1.	Proyección de cuotas mínimas para la importación de maíz blanco y amarillo provenientes de Estados Unidos de América y Canadá (DOF, 2003a).....	2
Tabla 2.	Valores de DL ₅₀ para algunas micotoxinas en aves	3
Tabla 3.	Distintos hongos y sus toxinas	4
Tabla 4.	Masa y fórmula molecular de las AF.....	9
Tabla 5.	Valores de absorción molar para cada aflatoxina en benceno:ACN.....	22
Tabla 6.	Concentración aportada por cada aflatoxina para hacer la concentración total de los cuatro estándares	24
Tabla 7.	Muestras de tortillas, naturalmente contaminadas con aflatoxinas, usadas para el análisis de mutagenicidad mediante la prueba de Ames, en los dos experimentos con y sin acidificación	28
Tabla 8.	Verificación de la cepa TA98 con controles de mutagenicidad.....	36
Tabla 9.	Resumen de resultados de las encuestas del primer muestreo (secas 2006).....	37
Tabla 10.	Resumen de resultados de las encuestas del segundo muestreo (lluvias 2006) ..	38
Tabla 11.	Resumen de resultados de las encuestas del tercer muestreo (secas 2007).....	39
Tabla 12.	Resumen de las encuestas del cuarto muestreo (lluvias 2007).....	40
Tabla 13.	Cálculo del factor de corrección con base en la absorción en UV para soluciones de K ₂ Cr ₂ O ₇	44
Tabla 14.	Datos de la curva de calibración de AFB ₁	46
Tabla 15.	Datos de la curva de calibración de AFB ₂	47
Tabla 16.	Datos de la curva de calibración de AFG ₁	48
Tabla 17.	Datos de la curva de calibración de AFG ₂	49
Tabla 18.	Precisión del sistema.....	50
Tabla 19.	Porcentaje del coeficiente de variación de la señal analítica para cada una de las aflatoxinas.....	50
Tabla 20.	Valores de los parámetros de adecuabilidad del sistema.....	51
Tabla 21.	Cálculo del porcentaje de recuperación y linealidad del método	52
Tabla 22.	Cálculo de porcentaje de recuperación para determinar la exactitud del método .	53
Tabla 23.	Datos de curvas de calibración.....	54
Tabla 24.	Concentraciones de Aflatoxinas (µg kg ⁻¹) por muestra de tortilla en peso seco. Primer muestreo de secas de 2006 (S06).....	56
Tabla 25.	Concentraciones de Aflatoxinas (µg kg ⁻¹) por muestra de tortilla en peso seco. Segundo muestreo de lluvias de 2006 (LL06)	57
Tabla 26.	Concentraciones de Aflatoxinas (µg kg ⁻¹) por muestra de tortilla en peso seco. Tercer muestreo de secas de 2007 (S07)	59
Tabla 27.	Concentraciones de Aflatoxinas (µg kg ⁻¹) por muestra de tortilla en peso seco. Cuarto muestreo de lluvias de 2007 (LL07).....	60
Tabla 28.	Diferencias significativas para la concentración de AFB ₂ por delegación de muestreo	62
Tabla 29.	Reversión espontánea para las tres cepas de <i>Salmonella typhimurium</i> TA98 probadas	65
Tabla 30.	Verificación de la cepa <i>Salmonella typhimurium</i> TA98 por controles positivos y AFB ₁	65
Tabla 31.	Resultados de la prueba de mutagénesis del estándar de AFB ₁ con y sin activación metabólica	66

Tabla 32. Resultados de los testigos usados en la prueba de mutagénesis de las AF extraídas de tortillas sin tratamiento ácido	68
Tabla 33. Prueba de Ames con AF aisladas de tortillas sin tratamiento ácido	69
Tabla 34. Resultados de los controles usados en la prueba de mutagénesis de las AF extraídas de tortillas con tratamiento ácido	70
Tabla 35. Resultados de la prueba de Ames con AF aisladas de tortillas con tratamiento ácido.....	72
Tabla 36. Observaciones microscópicas de la prueba de Ames	74
Tabla 37. Primer muestreo (secas 2006)	87
Tabla 38. Segundo muestreo (lluvias 2006)	90
Tabla 39. Tercer muestreo (secas 2007).....	93
Tabla 40. Cuarto muestreo (lluvias 2007).....	96
Tabla 41. Resultados de la presencia de aflatoxinas en el primer muestreo de tortillas	99
Tabla 42. Resultados de la presencia de aflatoxinas en el segundo muestreo de tortillas..	100
Tabla 43. Resultados de la presencia de aflatoxinas en el tercer muestreo de tortillas	101
Tabla 44. Resultados de la presencia de aflatoxinas en el cuarto muestreo de tortillas.....	102

Lista de Figuras

Figura	Página
Figura 1. Algunas variedades de maíz mexicano	1
Figura 2. Ruta biosintética de la esterigmatocistina y aflatoxinas.....	7
Figura 3. Estructuras químicas de las principales aflatoxinas	8
Figura 4. Activación de AFB ₁ para formar el aducto 8,9-AFB ₁ epóxido	13
Figura 5. Localización de los 98 puntos de muestreo de tortillas en la Ciudad de México	21
Figura 6. Desarrollo de la cepa Wt y TA98 después de las 24 horas de incubación	31
Figura 7. Desarrollo de la cepa Wt y TA98 en el medio mínimo + histidina (en exceso), donde sólo se observa el desarrollo de la Wt no dependiente de la biotina	31
Figura 8. Desarrollo de las cepas Wt y TA98 en medio mínimo + histidina/ biotina (en exceso), después de 24 horas de incubación	32
Figura 9. Desarrollo de las cepas Wt y TA98 en medio completo, después de 24 horas de incubación se observan halos inhibición del crecimiento	32
Figura 10. Sensibilidad de la cepa TA98 al daño del ADN por radiación UV	33
Figura 11. Identificación del plásmido pKM101, la cepa TA98 puede desarrollarse en el medio con ampicilina por ser portadora de dicho plásmido	33
Figura 12. Reversión espontánea de TA98 después de 24 horas de la siembra	34
Figura 13. Venta de tortillas por delegación	41
Figura 14. Porcentaje de materia prima para elaboración de tortillas.....	42
Figura 15. Participación de las harineras en el mercado en épocas de secas y lluvias de 2006 y 2007.....	42
Figura 16. Origen de la masa en épocas de secas y de lluvias de los años 2006 y 2007	43
Figura 17. Tipo de maíz empleado para la elaboración de tortillas en el Distrito Federal	43
Figura 18. Procedencia del maíz para elaborar tortillas	44
Figura 19. Cromatograma de la mezcla de AF para la curva de calibración A) 200 ng mL ⁻¹ y B) 20 ng mL ⁻¹ de AF totales	45
Figura 20. Curva de calibración de AFB ₁	46
Figura 21. Curva de calibración de AFB ₂	47
Figura 22. Curva de calibración de AFG ₁	48
Figura 23. Curva de calibración de AFG ₂	49
Figura 24. Cromatograma correspondiente a una mezcla de AFG ₁ , AFB ₁ , AFG ₂ y AFB ₂ en concentración total de 120 ng mL ⁻¹	51
Figura 25. Placas correspondientes a los controles: A) Testigo negativo. B) Testigo positivo (2-aminofluoreno) sin activación metabólica. C) Testigo positivo (2- aminofluoreno) con activación metabólica S9. D) Testigo positivo (benzo(a)pireno) sin activación metabólica. E) Testigo positivo (benzo(a)pireno) con activación metabólica S9.....	66
Figura 26. Placas correspondientes a tratamientos directos: A) AFB ₁ (5 µg/placa) B) AFB ₁ (50 µg/placa) C) AFB ₁ (200 µg/placa), sin extracto microsomal S9. Placas correspondientes tratamientos con activación S9: D) AFB ₁ (5 µg/placa) E) AFB ₁ (50 µg/placa) F) AFB ₁ (200 µg/placa).....	67
Figura 27. Ensayo de Ames con las AF aisladas de: a) muestra S06-5 equivalente a 1 tortilla, b) muestra S06-5 equivalente a 5 tortillas.....	70
Figura 28. Vista al microscopio de colonias de <i>S. typhimurium</i> . A) con fondo de bacterias homogéneo, B) sin fondo de bacterias causado por posible efecto citotóxico y no mutágeno	73

Figura 29. Cromatogramas correspondientes a las muestras del primer muestreo A) 12.75 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB ₁ , B) 8.12 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB ₁ , C) 2.96 $\mu\text{g kg}^{-1}$ AFB ₁ , D) 12.80 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB ₁ , E) 4.84 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB ₁ , F) 2.21 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB ₁	103
Figura 30. Cromatogramas correspondientes a las muestras del primer muestreo A) 0.29 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB ₁ , B) 105.67 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB ₁ , C) 29.60 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB ₁ , D) 3.93 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFG ₁ , 3.78 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB ₁ , 5.25 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFG ₂ y 2.21 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB ₂ , E) 4.13 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFG ₁ , 4.81 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB ₁ , 2.38 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFG ₂ y 0.54 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB ₂ , F) 4.16 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFG ₁ y 1.73 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB ₂	104
Figura 31. Cromatogramas correspondientes a las muestras del segundo muestreo A) 1.88 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB ₁ , B) 4.58 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB ₁ , C) 1.63 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB ₁ , D) 1.41 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB ₁ , E) 0.78 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB ₁ y 2.03 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB ₂ , F) 1.20 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB ₁	105
Figura 32. Cromatogramas correspondientes a las muestras del segundo muestreo A) 1.71 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB ₁ y 0.68 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB ₂ , B) 1.57 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB ₁ , C) 2.10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB ₂ , D) 7.78 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB ₁ , E) 385.21 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFG ₁ , 1.17 21 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB ₁ , 3.89 21 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFG ₂ , y 4.20 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB ₂ , F) 4.96 21 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFG ₁ , 4.93 21 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB ₁ , 5.92 21 $\mu\text{g kg}^{-1}$ AFG ₂ , y 1.77 $\mu\text{g kg}^{-1}$ AFB ₂	106
Figura 33. Cromatograma correspondiente a la muestra L06-95 del segundo muestreo con 9.83 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB ₁	107
Figura 34. Cromatogramas correspondientes a las muestras del tercer muestreo A) 6.90 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB ₁ , B) 140.33 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB ₁ y 150.14 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFG ₁ , C) 2.54 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB ₁ , D) 6.22 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB ₁ , E) 5.63 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB ₁ , F) 4.72 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB ₂	108
Figura 35. Cromatogramas correspondientes a las muestras del tercer muestreo A) 8.24 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB ₁ , B) 0.29 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFG ₁ , C) 6.04 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB ₁ , D) 11.37 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB ₁ , E) 6.44 $\mu\text{g kg}^{-1}$ AFB ₁ , F) 7.79 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB ₁	109
Figura 36. Cromatogramas correspondientes a las muestras del tercer muestreo A) 2.43 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB ₂ , B) 1.92 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFG ₂ , C) 1.64 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFG ₂ , D) 2.57 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB ₁ , E) 5.37 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB ₁ , F) 3.95 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB ₁	110
Figura 37. Cromatogramas correspondientes a las muestras del tercer muestreo A) 4.96 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB ₁ , B) 3.48 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB ₁ , C) 16.61 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFG ₁ , 11.44 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB ₁ y 3.05 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB ₂ , D) 5.83 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFG ₁ y 0.90 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFG ₂ , E) 1.31 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB ₁ y 1.13 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB ₂ , F) 3.73 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB ₁	111
Figura 38. Cromatogramas correspondientes a las muestras del tercer muestreo A) 8.74 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB ₁ , B) 0.93 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB ₂	112

RESUMEN

Las aflatoxinas (AF) son una serie de metabolitos secundarios altamente tóxicos capaces de producir cáncer de hígado y provocar mutaciones en diferentes tipos de células. Estos metabolitos son producidos por los hongos *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* y *A. nomius*. Estas toxinas se encuentran contaminando el maíz, principal ingrediente para la elaboración de tortillas en México y otros países Latinoamericanos. Dada la importancia toxicológica de estos compuestos, los objetivos de esta investigación fueron identificar y cuantificar las AF (AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂) presentes en las tortillas de maíz de la Ciudad de México, por cromatografía de líquidos; así como evaluar la capacidad mutágena de las AF de las tortillas, con la prueba de Ames.

La presente investigación consistió en la obtención de 392 muestras de tortillas de 98 puntos de la Ciudad de México, durante los meses de abril y noviembre de los años 2006 y 2007. Cada muestra constó de 2 kg de tortillas. En cada lugar de muestreo se aplicó un cuestionario para conocer la materia prima usada en la elaboración de tortillas, el tipo de maíz, la venta de los expendios, etc. Las muestras de tortilla se secaron y homogeneizaron; se extrajeron, identificaron y cuantificaron las 4 aflatoxinas (AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂) a submuestras de 50 g y se obtuvieron las AF totales. Mediante un análisis estadístico con pruebas de análisis de varianza, se describieron los niveles de significancia y posteriormente se aplicó la prueba de Wilcoxon/ Kruskal-Wallis para poder comparar las medianas contra el límite de tolerancia de la legislación nacional (12 µg kg⁻¹) y los factores de variación: periodo de muestreo (abril = secas, noviembre = lluvias), tipo de expendio (tortillería y supermercado), materia prima (masa, harina o mezcla: masa-harina), marca de harina (Maseca, Minsa, Agroinsa) y la delegación política de muestreo.

Finalmente, para determinar el potencial mutágeno de las AF de las tortillas, se realizó un experimento en 2 partes, con 21 muestras de tortillas positivas a AF y 4 controles. A las 21 muestras se les extrajeron nuevamente las AF y se purificaron por cromatografía en capa fina (TLC), para evaluar su potencial mutágeno mediante la prueba de Ames. El primer experimento consistió en la extracción directa de las AF y su purificación por TLC. En el segundo experimento la extracción se acidificó y después de 12 horas se neutralizó y siguió el mismo tratamiento que el primer experimento. Los extractos de estos dos experimentos se llevaron a sequedad y se resuspendieron en DMSO en el momento que se realizó la prueba de Ames. Esta prueba consistió en adicionar el extracto de tortillas purificado a placas de cultivo de *Salmonella typhimurium* TA98. Previamente se confirmó la presencia de marcadores genéticos de la cepa *Salmonella typhimurium* TA98 y su dependencia a la histidina.

Se logró estandarizar y validar el método de extracción y análisis de AF en tortillas de maíz, a partir de modificar el método para maíz. Los porcentajes de recuperación de las AF variaron de un 86% a un 95%, AFB₁ (86.4 – 95.4 %), AFB₂ (85.8 - 91%), AFG₁ (87.5 – 91.5%), AFG₂ (87.8 – 91.5%). Los límites de detección basados en las curvas de calibración fueron: AFB₁ (0.5 µg kg⁻¹), AFB₂ (0.6 µg kg⁻¹), AFG₁ (0.4 µg kg⁻¹), AFG₂ (0.4 µg kg⁻¹) y los de cuantificación: AFB₁ (1.4 µg kg⁻¹), AFB₂ (1.9 µg kg⁻¹), AFG₁ (2.4 µg kg⁻¹), AFG₂ (2.0 µg kg⁻¹).

Los resultados indican que de un total de 392 muestras analizadas, el 13.8% de ellas tuvieron AF. De estas 54 muestras, el 16 % (9 muestras) rebasaron el límite máximo permisible establecido en la NOM-187-SSA1/SCFI-2002, y el 84% se encontraron por debajo del límite máximo de tolerancia. Las concentraciones promedio de AF en las 54 muestras contaminadas fueron: AFB₁ (12.3 µg kg⁻¹); AFB₂ (2.7 µg kg⁻¹); AFG₁ (71.9 µg kg⁻¹) y AFG₂ (4.3 µg kg⁻¹), y para AF totales (20.5 µg kg⁻¹).

Las AF totales de los 2 muestreos de tortillas del año 2006 fueron: del período de secas con 18.4 % (18/98), y de lluvias de 12.2 % (12/98), y para los 2 muestreos del año 2007: de secas de 10.2 % (10/98), y de lluvias de 14.3 % (14/98). Los rangos que presentaron las diferentes AF fueron: AFB₁ (1.4 a 140.3 µg kg⁻¹); AFB₂ (2 a 4.7 µg kg⁻¹); AFG₁ (3.9 a 385.2 µg kg⁻¹); AFG₂ (2.4 a 5.9 µg kg⁻¹) y AF totales (1.4 a 393.3 µg kg⁻¹).

Al realizar la prueba de Ames ninguno de los 21 extractos de tortillas fue mutagénico. Sin embargo, en algunos casos se observó un efecto citotóxico, lo cual indica que las cantidades de AF de las tortillas fueron suficientes para causar la muerte de las bacterias. No obstante que un 14% de tortillas de la Ciudad de México tienen AF, el grado de contaminación bajó con respecto a estudios de la década de los años ochenta. Los factores analizados (mes de muestreo, tipo de expendio, materia prima, delegación política), no tienen influencia sobre la concentración de AF en las tortillas. La prueba de Ames no mostró el poder mutagénico de las AF aisladas en los extractos de tortillas, quizá por el efecto citotóxico detectado en algunas cajas de cultivo o la posible protección brindada por compuestos del maíz.

ABSTRACT

Aflatoxins (AF) are secondary metabolites highly toxic with the capacity to produce liver cancer and mutations in different kinds of cells. These metabolites are produced by *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* and *A. nomius* fungi. These toxins contaminated the corn, which is the main raw material to make 'tortillas' in Mexico and other Latinamerican countries. Due to the toxicological importance of these compounds, the aims of the present research were to identify and quantify the AF (AFB₁, AFB₂, AFG₁ and AFG₂) present in maize tortillas of Mexico City by liquid chromatography; and to evaluate their mutagenic capacity by Ames Test.

The present research consisted on the chemical analysis of 392 tortillas samples from 98 sampling points of Mexico City, during the months of April and November of the years 2006 and 2007. Each sample had 2 kg of tortillas.

A questionnaire was applied to the persons in charge of each one of the 98 sampled places, to know the exact ingredients, type of maize, amount of sales, etc. The tortilla samples were dried and homogenized, and the 4 AF (AFB₁, AFB₂, AFG₁ and AFG₂) were extracted, identified and quantified from 50 g subsamples, finally total AF were obtained.

By a statistical analysis, using variance analytical tests, the levels of significancy were described and later the applicance of Wilcoxon/ Kruskal-Wallis test to compare the averages against the tolerance limit of the national legislation (12 µg kg⁻¹) and the variation factors: sampling period (April = dry season and November = wet period), kind of store (tortilla shop or supermarkets), ingredients (dough, flour or a mixture dough-flour), flour trademark (Maseca, Minsa, Agroinsa) and the sampled borough.

Finally, to determine the mutagenic potential of AF from tortillas, an experiment in two parts was done with 21 AF positive samples and 4 controls. The AF from the 21 samples were extracted and purified by Thin layer chromatography (TLC), to evaluate the mutagenic potential by Ames test. First the AF extraction and purification by TLC and in a second part the extracted AF were acidified and after 12 hours they were neutralized and the Ames test was followed. The extracts from both treatments, normal and acidified, were dried and resuspended in dimethyl sulfoxide (DMSO), then they were applied to the *S. typhimurium* TA 98 plates. Previously, the *S. typhimurium* TA 98 strain genetic markers were confirmed and its dependency to histidine.

The extraction and chemical method of AF in maize tortilla was validated, standardized from the modification of the AF in corn method. The AF recovery percentages changed from 86% to 95%, AFB₁ (86.4 – 95.4 %), AFB₂ (85.8 - 91%), AFG₁ (87.5 – 91.5%), AFG₂ (87.8 – 91.5%). The detection limits based on calibration curves were: AFB₁ (0.5 µg kg⁻¹), AFB₂ (0.6 µg kg⁻¹), AFG₁ (0.4 µg kg⁻¹), AFG₂ (0.4 µg kg⁻¹) and the quantification limits: AFB₁ (1.4 µg kg⁻¹), AFB₂ (1.9 µg kg⁻¹), AFG₁ (2.4 µg kg⁻¹), AFG₂ (2.0 µg kg⁻¹).

The results from 392 analyzed samples showed 13.8% with AF contamination. From these 54 samples, 16% (9 samples) traspassed the maximum permissible limit established in NOM-187-SSA1/SCFI-2002, and 84% were below the maximum tolerance limit. The average AF concentrations in the 4 contaminated samples were: AFB₁ (12.3 µg kg⁻¹);

AFB₂ (2.7 µg kg⁻¹); AFG₁ (71.9 µg kg⁻¹) and AFG₂ (4.3 µg kg⁻¹), and for total AF (20.5 µg kg⁻¹)

Total AF in the two sampling periods of 2006 were: the dry period with 18.4% (18/98), and the rainy period 12.2% (12/98), and for the two samplings of the year 2007: the dry period with 10.2% (10/98), and the rainy period 14.3% (14/98). The different AF ranges were: AFB₁ (1.4 to 140.3 µg kg⁻¹); AFB₂ (2 to 4.7 µg kg⁻¹); AFG₁ (3.9 to 385.2 µg kg⁻¹); AFG₂ (2.4 to 5.9 µg kg⁻¹) and total AF (1.4 to 393.3 µg kg⁻¹).

None of the 21 tortilla AF positive extracts were mutagenic in Ames test. In some cases a cytotoxic effect was detected, indicating that the high AF quantities from tortilla samples were enough to kill the bacteria. Nevertheless, 17% of the tortillas of Mexico City have AF, the contamination degree diminished in relation to the 80's decade. The analyzed factors (sampling month, kind of shop, raw material, borough), have no influence on the AF concentration in tortillas. The Ames test showed that the AF isolated from the tortilla extracts had no mutagenic power, the possible reason might have been the cytotoxic effect detected in some TA-98 strain replicates or the possible protection given by certain maize compounds.

I. INTRODUCCIÓN

1.1. Importancia del maíz y tortillas en México

Alrededor del cultivo del maíz se desarrollaron grandes culturas como la Azteca, la Maya, la Olmeca. El maíz se domesticó a partir de una variedad silvestre llamada Teocintle (del náhuatl *teocintli*), la domesticación ocurrió hace alrededor de 8,000 años, como resultado de la selección del hombre. Se encontraron unas mazorcas primitivas pequeñas en las cavernas de Tehuacán, Puebla, lo cual sugiere que el maíz fue domesticado al sur del centro de México (Doebley, 2006).

Actualmente existen variedades de maíz en México, con colores que van desde el blanco, amarillo, rojo, azul hasta el morado (**Figura 1**). El maíz es el cultivo más importante, cada año se siembran aproximadamente 8.5 millones de hectáreas, lo que representa 60% de la producción total de granos del país (Espinoza *et al.*, 2005). La producción nacional de este grano, para el ciclo 2007, fue de 23, 512, 751.85 toneladas con un rendimiento de 3.21 ton/ha (SAGARPA, 2007), sin considerar los 10,348,756.72 toneladas de maíz forrajero producidos en el mismo periodo. Sin embargo, México no produce todo el maíz que consume y cada año se recurre a fuertes importaciones.



Figura 1. Algunas variedades de maíz mexicano.

Los agricultores mexicanos producen principalmente maíz blanco para consumo humano, mientras que los estadounidenses producen maíz amarillo que en su mayoría es utilizado para alimentar ganado. En el comercio internacional el maíz amarillo y el blanco son considerados como dos productos distintos. Sin embargo, este cultivo fue incluido en el Tratado de Libre Comercio de América del Norte (TLCAN), en el cual el maíz amarillo y el blanco son considerados como un solo producto (Nadal, 2000). Aproximadamente 25% del maíz que se consume en México proviene de Estados Unidos de América, y generalmente se importan maíces quebrados de baja calidad destinados a la alimentación animal.

Desde principios de 1990 hubo mayores importaciones debido a la baja producción interna. En el Diario Oficial de la Federación (DOF, 2003a), se presenta la proyección de las cuotas mínimas de importación de maíz blanco y amarillo de Estados Unidos de América y Canadá para el periodo 2004-2007 (**Tabla 1**).

Tabla 1. Proyección de cuotas mínimas para la importación de maíz blanco y amarillo provenientes de Estados Unidos de América y Canadá (DOF, 2003a).

Descripción *	País de origen	Cupo mínimo ¹ (toneladas)	Año
		3,359,790.9	2004
Maíz amarillo	Estados Unidos	3,460,584.6	2005
Maíz blanco (harinero)	de América	3,564,402.2	2006
		3,671,334.2	2007
		1,344.1	2004
<i>Maíz amarillo</i>	Canadá	1,384.4	2005
<i>Maíz blanco (harinero)</i>		1,425.9	2006
		1,468.7	2007

* No se hace distinción entre los dos tipos de maíz.

El maíz se consume principalmente como tortillas, pero también como tamales, tostadas, esquites, atole, pozol, pozole, pinole, etc. Algunos factores como la política de liberación de precios, la desaparición de CONASUPO y de los subsidios a la tortilla, así como las facilidades para la importación de maíz, han modificado la organización de la cadena productiva maíz-tortilla provocando un crecimiento sin control y sin supervisión de las autoridades.

Según el registro del Sistema de Información Empresarial de la Secretaría de Economía, solamente existen registradas 2 mil 520 tortillerías y 520 molinos de nixtamal en todo el país, de las cuales 237 tortillerías y 22 molinos de nixtamal se encuentran en el Distrito Federal (SIEM, 2006). Sin embargo, la Cámara Nacional de Maíz Industrializado, tiene registradas a más de 45 mil tortillerías. Sólo en la zona metropolitana de la Ciudad de México se cuenta con alrededor de 14 mil expendios de tortillas y molinos de maíz (Ribeiro, 2005).

La tortilla de maíz ha sido, por siglos, uno de los alimentos básicos de México, representa la principal fuente de energía para la mayor parte de la población (Rosado *et al.*, 1999). Recientemente el consumo de tortillas de maíz se ha extendido a Estados Unidos de América, Canadá y algunos países de la Comunidad Europea (CE) (Fernández-Muñoz *et al.*, 2006; Islas-Hernández *et al.*, 2006). Fernández-Muñoz *et al.* (2006) mencionan que el consumo de tortillas per cápita en México es de 325 g por día. Por otra parte, Torres *et al.* (2001) y Plasencia (2004, 2005), señalan que en las zonas rurales el consumo de tortillas representa el 70% del aporte calórico y el 50% de proteínas de la dieta. La producción de tortillas en México, en 2001, fue de 11 millones de toneladas métricas, de las cuales el 11% de la producción utilizó harina de maíz nixtamalizada (cifra que va en aumento); el 89% restante de la producción de tortillas se realizó con masa de maíz fresca. Sin embargo, por investigaciones previas se sabe que

¹ Cupo mínimo es la cantidad mínima de maíz que México deberá importar de Estados Unidos de Norteamérica y Canadá según el TLCAN.

muchas de las tortillas que se consumen en el país están contaminadas con AF (Carvajal *et al.*, 1986; Juan-López *et al.*, 1995; Torreblanca *et al.*, 1986). Una de las grandes modificaciones que ha sufrido la industria maíz-tortilla es la incorporación, cada vez mayor, de la harina nixtamalizada a los sistemas de producción de tortilla debido a la consolidación de las industrias harineras (Maseca, Minsa, Agroinsa y Hamasa), y a los avances tecnológicos que ha tenido la industria de los productos de maíz nixtamalizado (Fernández-Muñoz *et al.*, 2006). Esta situación puede resultar benéfica, ya que las industrias tienen implementados programas de calidad y si ellas cumplen con la legislación nacional, el problema por AF en tortillas producidas con harina nixtamalizada deberá ser mínimo.

1.2. Diferentes mohos que contaminan el maíz y sus productos derivados

Las micotoxinas se pueden producir en el campo, transporte o almacén. Las condiciones climáticas son esenciales para el desarrollo de los hongos, así, *Fusarium*, *Aspergillus* y *Penicillium* son micromicetos de campo (Almeida *et al.*, 2002; Wyllie y Morehouse, 1978). Nesci *et al.* (2006), identificaron en el maíz de Argentina a los géneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Cladosporium* y *Alternaria*. La colonización de una cepa de hongo y dominio de un sustrato, se ve afectada por factores bióticos y abióticos. La producción de toxinas (por las cepas toxicogénicas), se inhibe o favorece por la presencia de otros hongos. La producción de fumonisinas se inhibe por el desarrollo de *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus ochraceus* y *Penicillium implicatum* (Sanchis *et al.*, 2000), por competencia de nutrimentos, la producción de metabolitos tóxicos o la destrucción de las toxinas de *Fusarium*. La **Tabla 2** presenta valores DL₅₀ para micotoxinas en aves y la **Tabla 3** un listado de diversos hongos, sus toxinas, del tipo de toxicidad y de los animales más sensibles a ellas.

Tabla 2. Valores de DL₅₀ para algunas micotoxinas en aves (Devegowda y Murthy, 2005).

Toxina	DL ₅₀ (mg kg ⁻¹)
Aflatoxinas	0.0065
Ocratoxinas	3.6
T-2	4.9-5.2
Moniliformina	5.4
Diacetoxiscirpenol	3.8-5.9
Citrinina	95
Deoxinivalenol	140
Fumonisina B ₁	300*
Ácido ciclopiazónico	100

DL₅₀= Dosis letal en la cual mueren el 50% de los animales de prueba.

* No es DL₅₀. En pájaros esta concentración produce postración, decaimiento, reducción en la ganancia de peso en 19% y hepatomegalia del 30%.

Tabla 3. Distintos hongos y sus toxinas (Bonifaz, 2002; Ehrlich, 2007; Goto, et al., 1996; Kutzman, et al., 1987).

Hongo	Toxina	Sustrato	Toxicidad	Animales afectados
Aspergillus				
<i>Aspergillus flavus</i>	Aflatoxinas (B ₁ , B ₂)	Cereales (maíz, arroz, mijo, etc.) Cacahuates	Hepatotóxica (cancerígena) Abortiva	Pavos, gallinas, cerdos, truchas, bovinos y hombre
<i>A. parasiticus</i>	AF(B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂)			
<i>A. nomius</i>	AF(B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂)			
<i>A. tamaritii</i>	AF (B ₁ , B ₂)			
<i>A. pseudotamarii</i>	AF (B ₁ , B ₂)			
<i>A. ochraceus</i>	Ocratoxinas	Cereales (maíz, centeno, trigo, etc.)	Hepatotóxica (abortiva)	Pollos, cerdos, ganado bovino
Penicillium				
<i>Penicillium islandicum</i>	Islandiotoxina	Granos y oleaginosas	Hepatotóxica	Aves de corral
<i>P. viridicatum</i>	Viridotoxina	Granos (trigo, arroz y centeno)	Necrosis renal Enteritis	Ganado bovino Aves de corral Hombre
<i>P. citrinum</i>	Citrinina	Granos y cereales	Nefrotóxica	Aves de corral
<i>P. rubrum</i>	Rubratoxina	Granos y cereales	Hemorragia (renal y hepática)	Pavos Hombre
<i>P. citreoviride</i>	Citreoviridina	Granos	Neurotóxica	Gallinas, pavos, patos
Fusarium				
<i>Fusarium roseum</i>	Fusarina	Frutos y verduras	Estrogénica, Abortiva e inmunodepresora	Ganados porcino y bovino
<i>F. tricinctum</i>	Fusarina T-2	Maíz, trigo, sorgo, arroz.	Aleucia tóxica, irritación y necrosis dérmica, gastrotóxica, neurotóxica, cancerígena	Ganado vacuno, hombre
<i>F. graminearum</i>	Zearalenona	Frutos y semillas	Estrogénica y abortiva	Ganados porcino y bovino
<i>F. nivale</i>	Butenolida	Avena y cereales	Neurotóxica y gastrotóxica	Caballos y hombre
Claviceps				
<i>Claviceps purpurea</i>	Ergotoxina Ergotamina Ergocristina	Centeno, cebada, trigo y mijo.	Vasoconstrictora. Estimulante del músculo liso. Abortiva. Vaso dilatación. Daño cerebral y gangrenas	Animales herbívoros. Hombre
Stachybotrys				
<i>Stachybotrys atra</i>	Estaquibotriotoxina	Paja y forraje	Faringitis y rinitis; irritación dérmica, leucocitopenia	Caballos

1.3. *Aspergillus spp.*, y la producción de aflatoxinas

Las aflatoxinas (AF) son un grupo de compuestos que se descubrieron, en Gran Bretaña en 1960, tras la muerte de 100,000 pavos que fueron alimentados con harina de cacahuete proveniente del Brasil. Dicha harina se hallaba contaminada con *Aspergillus flavus* (Asao, *et al.*, 1965; Bata y Lásztity, 1999; Blesa, *et al.*, 2004; Chiavaro, *et al.*, 2001; Holcomb, *et al.*, 1992; Jaimez, *et al.*, 2000; Kok, 1994; Kussak, *et al.*, 1995; Otta, *et al.*, 2000; Papp, *et al.*, 2002; Park, *et al.*, 2004; Rastogi, *et al.*, 2001; Shenashi, *et al.*, 2002; Simon, *et al.*, 1998; Steciow, 2003; Stroka, *et al.*, 2000). Diversos estudios permitieron determinar una serie de compuestos fluorescentes a los cuales se les denominó AF (Asao *et al.*, 1963). Se conocen casi 20 diferentes tipos de AF pero destacan cuatro de ellas B₁ (AFB₁), B₂ (AFB₂), G₁ (AFG₁) y G₂ (AFG₂), debido en gran parte, a su alta actividad cancerígena, mutagénica y teratogénica, son las más frecuentes, abundantes y todas ellas se derivan del metabolismo de la AFB₁ (Asao, *et al.*, 1963).

Actualmente se conoce que *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* y *Aspergillus nomius* sintetizan en su metabolismo a las AF (Manonmani, *et al.*, 2005). Estas especies fúngicas son capaces de colonizar y producir sus toxinas en diversos medios y de éstos pasar a los alimentos por ejemplo las semillas y pastas de oleaginosas como son cacahuete, nueces, avellanas, pistaches, semilla de girasol, algodón, soja o soya, sésamo o ajonjolí, almendras. (Blesa, *et al.*, 2004; Chan, *et al.*, 2004; Stroka, *et al.*, 2000; Williams y Wilson, 1999); cereales y sus derivados como maíz, arroz, trigo, avena, cereales para desayuno, sorgo, cebada y centeno (Chan, *et al.*, 2004; Otta, *et al.*, 2000; Park, *et al.*, 2004; Saleemullah, *et al.*, 2006); especias y chiles secos como la páprika, comino, chile en polvo. (Bircan, 2005; Stroka *et al.*, 2000); frutas secas (Shenasi, *et al.*, 2002); en leche y quesos (Carvajal, *et al.*, 2003a; 2003b; Cavalière, *et al.*, 2006; Manetta, *et al.*, 2005; Prandini, *et al.*, 2009; Rosi, *et al.*, 2007); cerveza (Scott, 1996) y en alimentos para animales (Sharman y Gilbert, 1991).

Los hongos *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* sintetizan de manera predominante AFB₁, que es el compuesto más tóxico del grupo (Steyn, 1980). *A. flavus* produce solamente AFB₁ y AFB₂, mientras *A. parasiticus*, presente en nueces y cacahuete, llega a producir las cuatro aflatoxinas (B₁, B₂, G₁ y G₂) (Chang, *et al.*, 2005). No todas las especies de *Aspergillus spp.*, son capaces de producir AF (Leeson, *et al.*, 1995). El genotipo de cada especie determina la aflatoxicidad, algunos factores biológicos, químicos y ambientales determinan la cantidad de AF, producidas por las cepas aflatoxicógenas de este hongo en un sustrato determinado. Por ejemplo, existen dos morfotipos de *A. flavus*, las cepas S y L. En general la cepa S produce mayor cantidad de AF que la cepa L. Los factores climáticos y geográficos tienen influencia sobre la capacidad de producir AF por la cepa S (Cotty y Jaime-García, 2007).

El desarrollo del hongo *Aspergillus spp.*, se estimula por factores físicos como son la temperatura y la humedad relativa de la atmósfera y del sustrato, o por factores biológicos, bioquímicos y ambientales (Cotty y Jaime-García, 2007; Pohland y Wood, 1987). La producción de AF en el sustrato se lleva a cabo en dos etapas. La primera relacionada con las prácticas agronómicas, los daños por insectos, la falta de agua y

nutrimentos para la planta. La segunda etapa se realiza en cualquier tiempo desde la maduración hasta el consumo. En esta etapa el cultivo se expone a climas calientes, humedad, durante la cosecha, el transporte y el almacenaje. El hongo produce AF si las condiciones de almacenamiento son inadecuadas es decir, entre 20 y 40 °C, con un 10 a 20% de humedad y un 70 a 90% de humedad relativa en el aire (Cotty y Jaime-García, 2007; Sendra y Carbonell, 2005).

Las AF son producidas por los hongos filamentosos cuando, bajo determinadas condiciones físicas, químicas y biológicas, se interrumpe la reducción de los grupos cetónicos y se favorecen reacciones de condensación en la ruta metabólica para la producción de ácidos grasos (Ehrlich, *et al.*, 2002). Este proceso trae como resultado la síntesis de compuestos policetónicos (aflatoxinas). La ruta bioquímica generalmente aceptada para la biosíntesis de las AF involucra aproximadamente 23 reacciones enzimáticas y la mayor parte de los genes involucrados ha sido aislado y caracterizado (Cleveland, *et al.*, 2005; Ehrlich, *et al.*, 2002; Scherm, *et al.*, 2005). Estudios recientes sugieren que la regulación transcripcional en la biosíntesis por *Aspergillus sp.*, envuelve un modelo complejo de acción positiva o negativa afectada por respuestas fisiológicas debido a estímulos internos y externos (Scherm, *et al.*, 2005). La síntesis de las AF inicia cuando una molécula de acetato y una de malonil CoA son transformados a una unidad inicial de hexanoil por la acción de la enzima ácido-graso sintetasa (Coran y Craig, 2002; Sweeney, *et al.*, 1999); luego esta unidad crece por la acción de la policétido sintetasa hasta la formación del ácido norsolorínico, el primer precursor estable de la ruta biosintética (**Figura 2**).

El policétido sufre posteriormente de 12 a 17 transformaciones enzimáticas hasta llegar a la formación de versicolorina A y B como lo muestra la **Figura 2**. De la versicolorina A se derivará la formación de AFB₁ y AFG₁ a partir de un intermediario llamado dimetil-esterigmatocistina y por su parte la versicolorina B producirá dihidro-dimetil-esterigmatocistina la cual lleva a la producción de las AFB₂ y AFG₂ (Scherm, *et al.*, 2005; Sweeney, *et al.*, 1999; Woloshuk y Prieto, 1998). Cabe mencionar que *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius* y otros ascomicetos y deuteromicetos incluyendo *A. nidulans* producen la micotoxina llamada esterigmatocistina que resulta ser el penúltimo intermediario en la ruta de la síntesis de las AF (Sweeney, *et al.*, 1999).

Gimeno y Martins (2004), sugieren que las micotoxinas se suelen formar al final de la fase exponencial o al principio de la fase estacionaria del crecimiento del moho. El desarrollo del hongo se ve favorecido si los granos están dañados por insectos o roedores. Pero, aun en ausencia de estas condiciones, si ya han germinado algunas esporas en el sustrato, se pueden formar "nichos ecológicos" que favorecen el desarrollo de sectores con micelios generadores de AF porque al respirar produce agua, aumentando la humedad de algunas semillas o granos (Steciow, 2003).

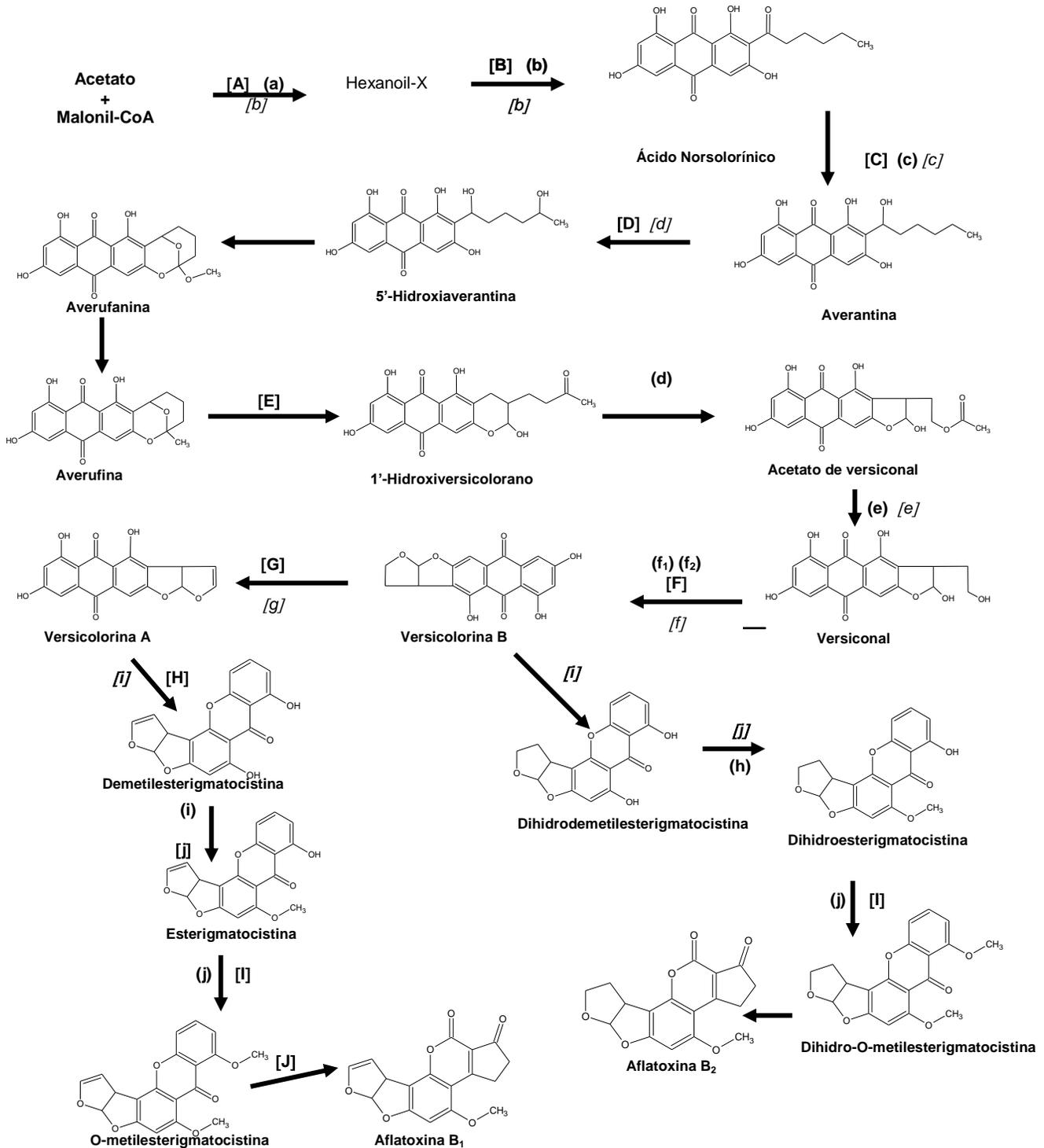


Figura 2. Ruta biosintética de la esterigmatocistina y aflatoxinas. Enzimas involucradas: (a) Ácido-graso sintetasa, (b) policétido sintetasa, (c) ácido norsolorínico reductasa, (d) versiconal hemiacetal acetato reductasa, (e) esterasa, (f₁) versicolorina B sintetasa, (f₂) versiconil ciclasa, (g) desaturasa, (h) O-metil-transferasa (MT-II), (i) O-metil-transferasa, (j) O-metil-transferasa (MT-I). Genes involucrados en la biosíntesis de las aflatoxinas: [A] fas1A y fas2A, [B] pksA, [C] nor1, norA, [D] avnA, [E] avf1 (afB and afW), [F] vbs, [G] verB, [H] ver1A, afS, [I] omtA y [J] ord1. Genes involucrados en la síntesis de la esterigmatocistina: [a] stcJ and stcK, [b] stcA, [c] stcE, [d] stcF, [e] stcI, [f] stcN, [g] stcL, [h] stcS, [i] stcU and [j] stcP (Sweeney, *et al.*, 1999).

1.3.1. Estructura química de las aflatoxinas

El término aflatoxina hace referencia a los policétidos del grupo de difurano-cumarinas que se dividen en dos subgrupos según su estructura química. Las difuro-cumaro-ciclopentanonas que abarcan a las AF de las series B, Q, P y M (AFB₁, AFB₂, AFB_{2a}, AFM₁, AFM₂, AFM_{2a}, AFQ₁, AFP₁ y al aflatoxicol), el segundo subgrupo corresponde a las difuro-cumaro-lactonas en las que se encuentran las AF de la serie G (AFG₁, AFG₂, AFG_{2a}), (Leeson, *et al.*, 1995; Nakai, *et al.*, 2008; Rastogi, *et al.*, 2001).

Como lo indican los nombres de los grupos, la estructura básica de las AF consiste en un dihidrodifurano o tetrahidrodifurano unido a una cumarina substituida por una ciclopentanona o una lactona (**Figura 3**), (Jaimez, *et al.*, 2000; Leeson, *et al.*, 1995; Palmgren y Hayes, 1987). Adicionalmente, otra diferencia estructural que distingue a las AFB₁ y AFG₁ es la presencia de un doble enlace en la posición 8,9 que forma el vinil éter en el anillo terminal del furano. Esta insaturación no se encuentra en las AFB₂ y AFG₂ (Proctor, *et al.*, 2004), lo cual tiene impacto sobre su toxicidad.

De las AF conocidas solamente AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂ son sintetizadas naturalmente por el hongo productor. Las otras AF (M₁, M₂, P₁, Q₁, G_{2a}, B_{2a} y aflatoxicol), son productos del metabolismo microbiano o de animales (Lindner, 1995; Palmgren y Hayes, 1987). Autores como Akiyama, *et al.* (2001); IARC, (1993 y 2002); Jaimez, *et al.* (2000); Otta, *et al.* (2000); Rastogi, *et al.* (2001); Williams y Wilson (1999) han reportado que la AF más peligrosa del grupo es la AFB₁, debido a que es un potente teratógeno, mutágeno y hepatocarcinógeno.

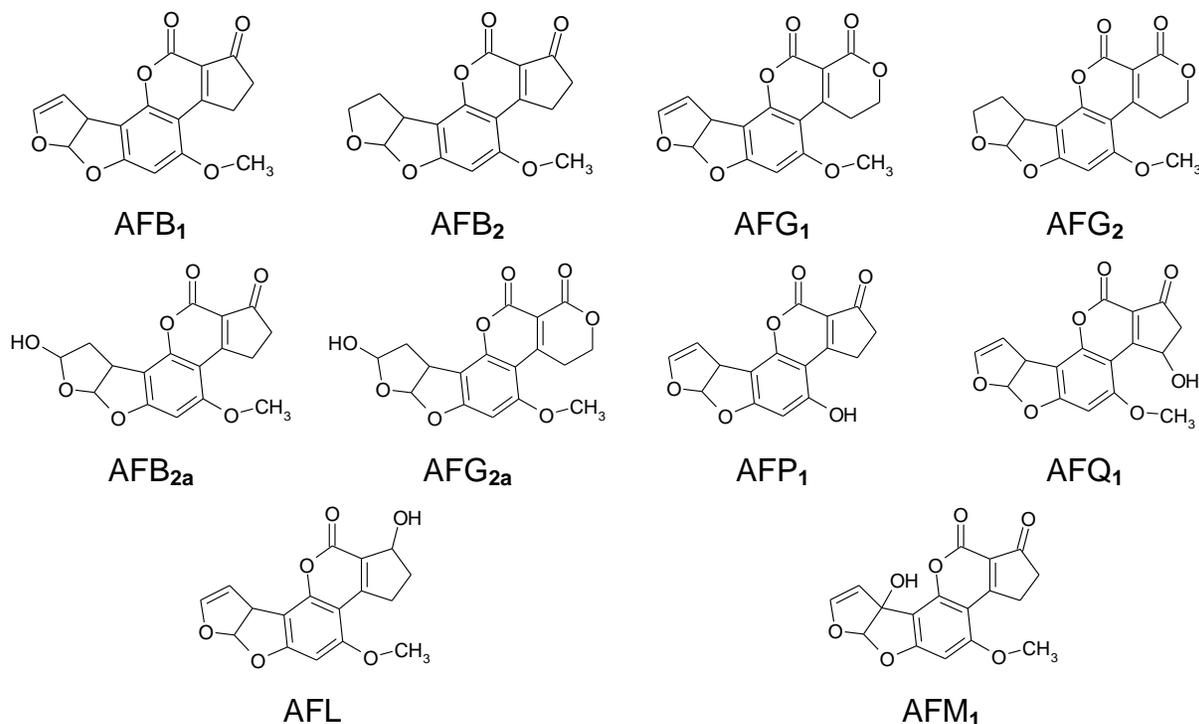


Figura 3. Estructuras químicas de las principales aflatoxinas (Juan, *et al.*, 2007).

1.3.2. Propiedades fisicoquímicas de las aflatoxinas

Las AF son sustancias extremadamente peligrosas, muestran un alto poder tóxico, cancerígeno y mutágeno de acuerdo con el siguiente orden $AFB_1 > AFG_1 > AFG_2 > AFB_2$. La estructura de las AF, descrita anteriormente, provoca que estos compuestos muestren importantes efectos sobre los sistemas biológicos (Moreno y Kang, 1999).

Las AF son sólidos cristalinos que van del color blanco pálido al amarillo, sin aroma, sin sabor y son solubles en disolventes orgánicos como el metanol, cloroformo, acetona, acetonitrilo, benceno; e insolubles en agua.

Una de las propiedades fisicoquímicas de mayor importancia para la identificación de las AF es que emiten luz fluorescente al ser excitadas por luz ultravioleta. El nombre de las AF se dio por el color de su fluorescencia, así las AF del grupo B emiten fluorescencia azul y las del grupo G emiten fluorescencia verde. Los subíndices 1 y 2 se asignaron según su corrimiento en cromatografía de capa fina, siendo el número 1 asignado a las de mayor corrimiento.

Estos compuestos pueden ingresar al organismo al ser ingeridos, absorbidos por la piel o inhalados causando diversos daños al organismo, en la **Tabla 4** se muestra la fórmula molecular, masa molecular y punto de fusión de las AF.

Tabla 4. Masa y fórmula molecular de las AF (Organización Panamericana de la Salud, 1983; Reddy y Farid, 2006).

Aflatoxina	Fórmula Molecular	Peso Molecular (UMA)	Punto de fusión (°C)
B₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	312	268-269
B₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	314	286-289
G₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328	244-246
G₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330	237-240
M₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328	299
M₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330	293
B_{2a}	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330	240
G_{2a}	C ₁₇ H ₁₄ O ₈	346	190

Como se aprecia en la Tabla 4 los puntos de fusión de las AF son muy altos, de modo que resisten las temperaturas de cocción de los alimentos, de pasteurización y ultrapasteurización sin descomponerse. La nixtamalización sólo las enmascara, no las elimina, y son resistentes a la fermentación, de modo que pueden estar presentes en bebidas y alimentos y sus productos derivados.

1.3.2.1. Susceptibilidad de las AF a medios físicos

a. A la temperatura

Las AF presentan temperaturas de descomposición muy elevadas en un intervalo de 237 °C (AFG₂) a más de 320 °C (AFP₁). La AFB₁ en cristales es muy estable al calor seco incluso a temperaturas elevadas cercanas al punto de descomposición de 267 °C. Bajo las condiciones normales de cocimiento casero se alcanzan temperaturas aproximadas a los 150 °C, por lo que la AFB₁ y AFG₁ no se destruyen. Sin embargo, la reducción de estas toxinas dependerá del nivel inicial de contaminación, la temperatura y tiempo de calentamiento así como el tipo de AF y al alimento (Rustom, 1997).

La destrucción de las AF está en función del contenido de humedad, el pH y la presencia de compuestos iónicos, o sea con carga eléctrica, en el alimento. El contenido de humedad del alimento es un factor crítico; en alimentos con mayor porcentaje de humedad la destrucción es más sencilla. La destrucción de las toxinas se puede realizar en alimentos o matrices contaminadas con un alto contenido de agua como semillas oleaginosas, cacahuates o en soluciones. El mecanismo de degradación y los productos derivados de él no se conocen completamente, sin embargo, se considera que el anillo de lactona se abre permitiendo la posterior descarboxilación a temperaturas elevadas (Reddy y Farid, 2006).

b. Al pH

En soluciones alcalinas se observa la hidrólisis lenta de anillo de lactona de las AF. Esta hidrólisis es reversible, con la consecuente formación del anillo por la acidificación del medio (Price y Jorgensen, 1985; Torres *et al.*, 2001). El rol que juega el pH en la inactivación de las AF se realiza junto con temperaturas superiores a 100 °C. Un estudio realizado por Rustom (1993), muestra los efectos del pH (5, 8 y 10.2), temperatura (121, 130 y 140 °C) y tiempos de calentamiento (entre 5 y 20 segundos y 15 minutos) sobre la actividad mutagénica de bebidas de cacahuate contaminados artificialmente con AFB₁. El tratamiento realizado con pH de 8.0, no tiene ningún efecto sobre la mutagenicidad, sin embargo, los tratamientos adicionales a pH 10.2 a 130 °C, por 20 segundos, y pH 10.2, 121 °C, por 15 minutos reducen a la AF en un 78 y 88% respectivamente. La disminución de la mutagenicidad se le atribuye a la transformación de AFB₁ a AFD₁ la cual resulta ser 450 veces menos mutagénica. El anillo de lactona se hidroliza por el NaOH adicionado para ajustar el pH. Los tratamientos que se realizaron con pH 5, a 130 °C, por 20 segundos, disminuyeron la mutagenicidad en un 76 % y con pH 5, a 121 °C por 15 min disminuyó en 73 %. La disminución del efecto mutágeno se atribuye a la hidratación parcial del anillo de lactona por la presencia del HCl adicionado para ajustar el pH. La AFB₁ es transformada a AFB_{2a} que es 1000 veces menos mutágena. El cambio de pH de 8 a 5 ó 10.2 no resulta ser significativo para la reducción de la mutagenicidad si no hay calentamiento (Rustom (1993). Sin embargo, para AF en tortillas de maíz los datos muestran un comportamiento contrario (Carvajal *et al.*, 2000).

De manera general el efecto de soluciones ácidas o básicas con calentamiento superior a 100 °C provocan la apertura del anillo de lactona con su consecuente descarboxilación y la reacción puede provocar la pérdida del grupo metoxilo del anillo aromático. Reacciones similares se observan con amonio y varias aminas (Reddy y Farid, 2006).

En presencia de ácidos inorgánicos, las AFB₁ y AFG₁ se transforman en las B_{2a} y G_{2a} (Holcomb *et al.*, 1992). El medio fuertemente ácido cataliza la adición de moléculas de agua al doble enlace del anillo de furano. Por otra parte, en presencia de ácido acético y de ácido clorhídrico, la reacción produce un derivado con un grupo acetoxi. Uniones similares de AFB₁ y AFG₁ se han sintetizado empleando ácido fórmico-cloruro de tionilo, ácido acético-cloruro de tionilo, ácido trifluoro acético (Reddy y Farid, 2006).

c. A los agentes oxidantes y reductores

Muchos agentes oxidantes como el hipoclorito de sodio, permanganato de potasio, peróxido de hidrógeno, ozono y perborato de sodio, reaccionan con las AF y cambian la estructura de la molécula de AF con pérdida de fluorescencia. Los mecanismos de reacción son inciertos y los productos derivados de estas reacciones no se conocen en muchos casos (Reddy y Farid, 2006).

La hidrogenación de AFB₁ y AFG₁ produce las AFB₂ y AFG₂. Una nueva reducción de AFB₁ con tres moles de hidrógeno produce tetrahidroaflatoxina. La reducción de AFB₁ y AFB₂ con borohidruro de sodio produce aflatoxina B₁ y B₂ reducidas (AFRB₁ y AFRB₂) respectivamente, como resultado de la apertura del anillo seguida de la reducción del grupo ácido y la reducción del grupo cetona en el anillo de ciclopentanona (Reddy y Farid, 2006).

1.3.3. Efectos tóxicos de las aflatoxinas en los seres vivos

Las AF son moléculas que se ligan a los ácidos nucleicos y por eso afectan todos los seres vivos incluyendo los virus.

a) Plantas

Las plantas también son afectadas por las AF, Wyllie y Morehouse (1978) reportan que semillas de mastuerzo (*Lepidium sativum*), tratadas con dosis de AF de 10 a 50 µg mL⁻¹ redujeron su porcentaje de germinación. Con dosis de 1 µg de AF por mL de extracto se reduce el desarrollo de la radícula y producen una elongación del hipocotilo, sin embargo, la germinación no se ve afectada.

La presencia de AFB₁ inhibe la formación de clorofila, la síntesis de proteínas, afectando la producción de algunas enzimas (α-amilasas), necesarias durante la

germinación. También se observan daños en la replicación del ADN mitocondrial, la incorporación de aminoácidos y la mitosis se ven inhibidos (Wyllie y Morehouse, 1978).

b) Animales

Todas las especies animales son sensibles a los daños por AF, la diferente susceptibilidad depende de la especie, edad, sexo, exposición a agentes infecciosos y estado nutricional (Bennett y Klich, 2003). La inducción de diferentes tipos de cáncer por estas toxinas ha sido muy estudiada. Hay reportes (Devegowda y Murthy, 2005) sobre las AF como hepatocancerígenos y esto baja la productividad en ganado bovino y aviar, causando una disminución en la producción de leche en vacas, reducción en el tamaño y peso del huevo, disminución en la talla y velocidad de crecimiento de pollos. También, existe gran susceptibilidad a las infecciones recurrentes (coccidiosis, colisepticemia y salmonelosis), debido a un estado de inmunodepresión (Pier *et al.*, 1977).

Otros efectos observados en los animales alimentados con piensos contaminados son: toxicidad embrionaria (dosis de AFB₁ bajas), disfunción gastrointestinal, reducción en la reproducción, reducción de la eficiencia de transformación del alimento en peso corporal, deficiencia en la asimilación de nutrientes, falta de apetito, incremento en la tasa de mortalidad, anemia e ictericia. Por otra parte, los animales lactantes pueden ser afectados por la transformación de la AFB₁ a AFM₁ que es excretada en la leche (Bennett y Klich, 2003; Devegowda y Murthy, 2005).

Los individuos jóvenes de todas las especies son más susceptibles, aunque todos los animales son afectados en mayor o menor medida. El efecto tóxico y cancerígeno de la AFB₁ requiere que se active por la acción enzimática del citocromo P₄₅₀ 3A4 (CYP₄₅₀), formando un metabolito altamente reactivo llamado AFB₁ 8,9-epóxido (AFBO). Este epóxido se forma en el furano terminal de la molécula de AFB₁ (Jeffrey y Williams, 2005; Phillips *et al.*, 1999).

En la **Figura 4** se esquematiza el proceso de activación de AFB₁ con los residuos de guanina y adenina. AFBO se une covalentemente a la molécula de ADN, ARN y otras proteínas constituyentes (McKean *et al.*, 2006). El AFBO forma un enlace con el ADN en la posición N-7 del residuo de guanina produciendo inicialmente el aducto 8,9-dihidro-8(N⁷-guanil)-9-hidroxi aflatoxina B₁ (AFB₁-N⁷-Gua) (Bennett y Klich, 2003). Estudios realizados con roedores *in vivo* reportan que la AFB₁-N⁷-Gua representa casi el 90% de los aductos unidos al ADN. Con el tiempo esta molécula es transformada a una forma más estable, la cual tiene el anillo de imidazol abierto 8, 9- dihidro- 8 (N⁵- 2', 5', 6'- triamino- 4'- oxo- N⁵- pirimidil) 9-hidroxi aflatoxina B₁ (AFB₁-FAPy). Los aductos de AFB₁. ADN se han detectado en los hígados de numerosas especies animales susceptibles a cáncer después de exposición aguda o crónica (McKean *et al.*, 2006; Phillips *et al.*, 1999).

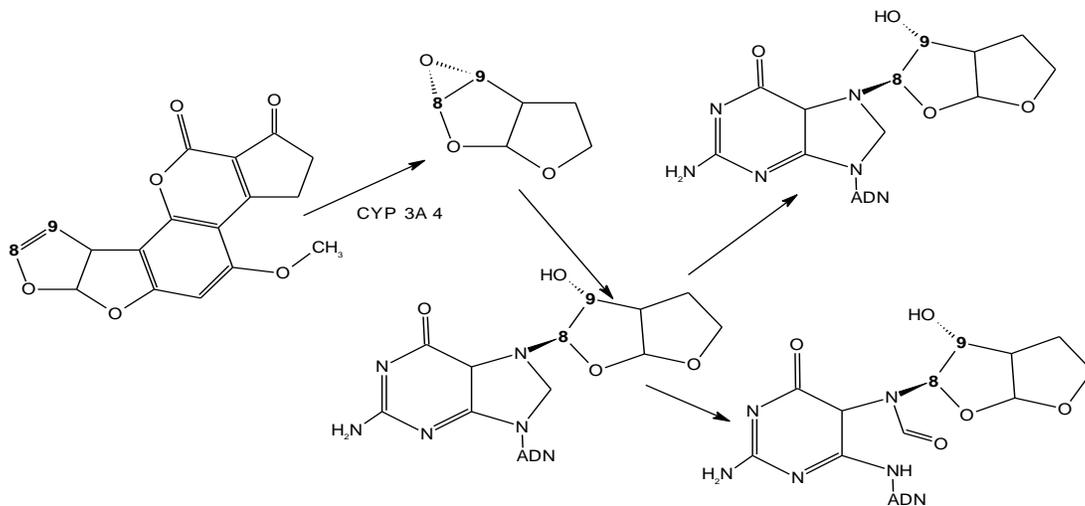


Figura 4. Activación de AFB₁ para formar el aducto 8,9-AFB₁ epóxido. Estructura (parcial) de los dos aductos más abundantes (Jeffrey y Williams, 2005)

c) Hombre

Los agentes cancerígenos y mutágenos se encuentran en diversos productos vegetales y animales contaminados con esporas de diversas especies de hongos. Las toxinas se producen durante el almacenamiento o preparación de los alimentos. Numerosas investigaciones correlacionan la presencia de diversos tipos de cáncer con las dosis de diferentes toxinas de la dieta humana (Knize *et al.*, 2003).

Las AF ingeridas se metabolizan y producen efectos adversos en la salud de los animales y del hombre. La enfermedad causada por la ingestión de las AF se llama aflatoxicosis. La aflatoxicosis aguda conlleva a la muerte, sin embargo, en niveles crónicos los resultados son cáncer hepático, inmunosupresión, daños nefrotóxicos, neurotóxicos y gastroentéricos entre otros (Bennet y Klich, 2003; Blesa *et al.*, 2004; Niedwetzki *et al.*, 1994; Leeson *et al.*, 1995; Shenasi *et al.*, 2002).

D'Mello y McDonald (1997), demostraron que empleando alimento contaminado, con 0.5 mg de AF por kg de alimento, se induce daño y se produce carcinoma en animales de laboratorio. Estudios epidemiológicos realizados en África y Asia muestran la susceptibilidad de los humanos hacia las AF, donde una de las principales causas de muerte es el cáncer de hígado (hepatocarcinoma). La tasa de mortalidad por hepatocarcinoma es de por lo menos 300,000 muertes por año Guzmán (2001). Los estudios epidemiológicos muestran un aumento de cáncer y de hepatocarcinomas en regiones donde ha aumentado la ingestión de alimentos contaminados con AF (Williams y Wilson, 1999). Investigaciones realizadas en 185,000 muestras de cacahuate provenientes de Brasil, Guatemala, Irlanda, México, Suiza, Reino Unido, Estados Unidos de América y Rusia indican que solamente el 1% del total de muestras en estudio presentan niveles de AF menores a 20 µg kg⁻¹, mientras que el resto supera este valor (Bhat y Miller, 1991; García *et al.*, 2001; Robledo *et al.*, 2001). Hay diversas micotoxinas en los alimentos como las AF, fumonisinas, zearalenona (Lindner, 1995). El maíz de la India presentó entre 6.25 y 15.6 mg de AF totales (AFt) por kg, que son

cantidades que provocan daño hepático agudo. En 1974, se documentaron 108 casos de cirrosis hepática en niños por ingerir maíz contaminado con AF, entre 0.25 y 15 mg de AFt por kg al día. La ingesta de AF por niños, se asocia también con el síndrome de Reye con encefalitis y degeneración grasa de vísceras (Nelson *et al.*, 1980).

Jaimez *et al.*, (2000) reporta que en Tailandia, la presencia de AF es un mal endémico y las AFB₁, AFG₁, AFB₂ y sus metabolitos AFP₁ y AFQ₁ se aislaron de hígado humano. Estos metabolitos de las AF se relacionan en forma directa con cáncer. Lippmann (2000) sugiere un riesgo a desarrollar cáncer hepático, en el sur de Guangxi, China, por la exposición a dosis diarias de AF en niveles de 16.9 a 20 mg de AF por kg de peso corporal, que es significativamente menor a lo observado en estudios con ratas macho. Adicionalmente, se correlacionó este riesgo a desarrollar hepatocarcinoma con la presencia de infecciones por VIH y hepatitis B (Proctor *et al.*, 2004).

Estudios epidemiológicos de Kenya reportan, en julio de 2004, la intoxicación de 317 individuos de los cuales 125 murieron por hepatotoxicidad aguda debido a la ingestión de maíz contaminado con AF (Lewis *et al.*, 2005). Se muestrearon 65 mercados y se analizaron 350 muestras de productos de maíz, donde el 55% sobrepasó el límite de 20 µg kg⁻¹; 121 muestras de maíz (35%) sobrepasaron 100 µg kg⁻¹ y 24 muestras (7%) tuvieron más de 1000 µg kg⁻¹, esto representa que la población consumidora en estos mercados está expuesta a altos niveles de AF con un alto riesgo a la salud.

Gimeno y Martins (2004), señalan que los principales factores que influyen sobre la toxicidad de las AF en los humanos son: a) biodisponibilidad, b) la toxicidad, c) la concentración de AF ingerida diariamente, d) la cantidad de alimento ingerido, e) la continuidad o intermitencia de ingestión del alimento contaminado, f) el peso, g) el estado fisiológico, h) la salud y i) la edad del individuo. Phillips *et al.* (1999), señalan que en el este de Estados Unidos de América se ingieren diariamente de 0.0002 a 0.11 µg kg⁻¹ de AF por día y en regiones con alta prevalencia de hepatocarcinoma como Guangxi, China, la ingesta de AF se estima de 1 a 2 µg kg⁻¹ por día.

La AFB₁, es la toxina predominante en maíz de Guangxi, China, región con alta incidencia de hepatocarcinoma humano. El maíz tuvo concentraciones de 9 a 2496 µg kg⁻¹ y una incidencia del 85%; la concentración promedio de AFB₁ en maíz de esta zona de alto riesgo fue de 184.1 µg y la ingesta probable por humanos se estimó en 3.68 µg kg⁻¹ de peso corporal por día que es 3.20 veces mayor que la DL₅₀ en ratas (Li *et al.*, 2001).

1.3.4. Aflatoxinas en maíz y tortillas

Actualmente se reconoce la presencia de micotoxinas en los cereales, especias, piensos y el maíz (Bhat y Miller, 1991). Numerosos estudios han demostrado la presencia las AF en los granos de maíz (Abbas *et al.*, 2002; De Arriola *et al.*, 1986 y 1988; Carvajal y Arroyo, 1997; García *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2006; Medina-Martínez y Martínez, 2000; Moreno y Kang, 1999; Nesci *et al.*, 2006; Plasencia, 2004 y 2005; Price y Jorgensen, 1985; Torreblanca *et al.*, 1986; Torres *et al.*, 2001; Trucksess *et al.*, 2002; Williams *et al.*, 2005). La incidencia de las AF ha sido documentada en México y otros países. Carvajal y Arroyo (1997), determinaron AF (15

a $1971 \mu\text{g kg}^{-1}$) en maíz proveniente del Estado de Tamaulipas, México, donde muchas muestras sobrepasaron $20 \mu\text{g}$ de AF totales kg^{-1} que es el límite máximo de las legislaciones nacional y de los Estados Unidos de América para maíz destinado a elaborar productos para consumo humano (Juan-López *et al.*, 1995). El gobierno mexicano implementó un programa de monitoreo de los cultivos de maíz y se encontró que el 87% de ellos presentaban concentraciones de AF muy altas. Aproximadamente 60,000 toneladas de maíz (con concentración promedio de $295 \mu\text{g AF kg}^{-1}$), fueron puestas en cuarentena y se probaron distintos métodos para reducir las AF pero no resultó económicamente viable (Juan-López *et al.*, 1995; Plasencia, 2005). En el Estado de Sonora se determinó la incidencia de AF en 133 muestras de maíz de las cosechas de 1996, 1997 y 1998, donde el 33% estuvieron contaminadas (1 a $18 \mu\text{g kg}^{-1}$), y los niveles más altos estuvieron debajo del límite de tolerancia legal (García *et al.*, 2001).

En Venezuela el 16.6 % de muestras de maíz amarillo tuvieron AFB_1 (5 a $50 \mu\text{g kg}^{-1}$), se encontró también fumonisina B_1 (Medina-Martínez y Martínez, 2000).

Por la importancia que representa el maíz y las tortillas para diversas poblaciones latinoamericanas, se ha estudiado el grado de retención de micotoxinas durante el procesamiento del grano (De Arriola *et al.*, 1988; Bhat y Miller, 1991), que se inicia con la cocción alcalina (con óxido de calcio, CaO) o nixtamalización. Por otro lado, Carvajal *et al.* (1986), hallaron diversas micotoxinas en muestras de maíz, de trigo y en sus tortillas e indicaron que las AF, la zearalenona y el deoxinivalenol (DON) no se destruyeron con el tratamiento alcalino (con cal al 2%), ni a temperaturas de cocimiento de 110°C .

En Guatemala se inoculó el hongo *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 en maíz variedad Nutricia se obtuvieron altos niveles de AF (1360 y $1896 \mu\text{g kg}^{-1}$) en grano para la elaboración de tortillas. Se elaboró masa nixtamalizada empleando 1 y 3 % masa/masa, de óxido de calcio (CaO). Las tortillas producidas con concentraciones alrededor de 10% de CaO no resultan tener buenas características organolépticas. Los niveles de cal probados, correspondientes a las concentraciones tradicionales (1 a 3%) empleadas en Guatemala, aparentemente disminuyen la concentración de AF en la masa en un 96.67% y en la tortilla en un 97.9%. De las cuatro AF analizadas, la G_1 y la G_2 resultaron ser las más susceptibles al tratamiento alcalino teniendo un 100% de degradación. Por otra parte, la AFB_1 resultó ser más resistente al tratamiento alcalino que la AFB_2 (De Arriola *et al.*, 1988).

Estos datos se refieren a la pérdida de la fluorescencia de las AF, pero al cambiar a un pH ácido, las AF se reactivan de modo que no se puede asegurar la inocuidad alimentaria. El límite de $20 \mu\text{g kg}^{-1}$ establecido por Estados Unidos de América y MERCOSUR es el doble de lo requerido para producir una mutación en prueba de Ames (Carvajal *et al.* 2004). Torreblanca *et al.* (1986), hallaron niveles relativamente elevados de AF en maíz y tortillas de México. Se encontró AFB_1 en el 72% de las muestras de tortillas de maíz y el 24% presentaron zearalenona.

Según Price y Jorgensen (1985), el proceso de cocción en agua con cal logra disminuir los niveles de AF de $127 \mu\text{g kg}^{-1}$ en el maíz puro a $68.6 \mu\text{g kg}^{-1}$ en las tortillas. La

reducción de AF fue baja (20 - 46%), y la concentración residual fue más alta que el límite de tolerancia ($20 \mu\text{g kg}^{-1}$). La baja eficiencia resultó de haber trabajado con maíz contaminado naturalmente, pues las AF dentro del grano se protegieron de la acción de la cal y del calor. La acidificación, debida al jugo gástrico, aumentó los niveles de AF que en un principio parecieron disminuidos con el tratamiento alcalino. Torres *et al.* (2001) analizaron el papel que juega el pH, la temperatura y el efecto del freído en la reducción de las AF en tortillas y totopos; sólo se reactivaron las AF de las muestras tratadas a un pH alcalino igual a 9.5. El tratamiento térmico y alcalino (nixtamalización) que recibe el maíz, produce la hidrólisis del anillo de lactona de las AF formando sales solubles que se pierden en el agua de nejayote. Sin embargo, el pH ácido cierra el anillo de lactona reconvirtiendo parte de las AF que originalmente se habían hidrolizado. El incremento de AF por acidificación fue del 0 al 18%, que es más bajo que el obtenido por Price y Jorgensen (1985).

Méndez-Albores *et al.* (2004) evaluaron la reducción de AF por dos procesos de nixtamalización, el tradicional (PNT), y ecológico (PNE). Los resultados obtenidos indicaron la nixtamalización tradicional es más efectiva que la ecológica. La reducción de AF alcanzada por el PNT en el nivel de $29 \mu\text{g kg}^{-1}$ fue de 92% y para el nivel de $93 \mu\text{g kg}^{-1}$ fue de 83%. En el caso del método ecológico, los porcentajes de reducción alcanzados para los dos niveles de AF fueron de 40 y 25% respectivamente. La reducción alcanzada por el PNT, permite tener un producto que satisface los límites de tolerancia alimentaria ($20 \mu\text{g kg}^{-1}$); sin embargo, el PNE sólo puede ser aplicado donde hay menos AF, ya que en el nivel de $93 \mu\text{g kg}^{-1}$ quedó un residuo de $69 \mu\text{g kg}^{-1}$.

1.4. Mutagenicidad y prueba de Ames

Diariamente nos exponemos a gran cantidad de compuestos químicos (naturales o sintéticos), que se encuentran en el ambiente y pueden tener actividad mutagénica (Aleem y Malik, 2005; Zeiger y Margolin, 2000). Un agente mutágeno causa daños al ADN, es decir, puede generar cambios puntuales en los genes, donde una sola base se modifica, inserta o borra. La eliminación de bases y re-arreglos del ADN pueden generar pérdidas en la función de la macromolécula (Mortelmans y Zeinger, 2000).

De acuerdo con Mortelmans y Zeinger (2000), las mutaciones de los genes se pueden medir en bacterias y otros sistemas celulares por un cambio en los requerimientos de crecimiento celular. Dentro de las pruebas *in vitro* la prueba de Ames, es la más precisa y emplea cepas mutantes, sin la capacidad de sintetizar el aminoácido histidina, por la bacteria *Salmonella typhimurium* y por tanto no crecen, ya que son dependientes de este aminoácido (His-). Para que la bacteria se reproduzca es necesario adicionar la histidina al medio de cultivo. Un agente químico mutágeno puede causar nuevos cambios y hacer que el gen de síntesis de histidina se exprese. Por lo tanto, la bacteria podrá crecer y formar colonias mutadas (revertidas) aún en ausencia del aminoácido, a este proceso se le denomina reversión. La prueba de Ames también se puede realizar con una fracción microsomal del hígado de la rata "S9" para transformar a un pre-mutágeno a mutágeno activo. Esta fracción microsomal hepática S9 es una mezcla que

contiene las enzimas del citocromo P450 involucradas en el metabolismo de agentes xenobióticos.

Debido a la relativa facilidad de la prueba y a la sensibilidad de la misma, el método del Dr. Ames, ha sido adoptado por laboratorios de investigación, agencias regulatorias y organismos internacionales (Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico OCDE, Agencia Central de Inteligencia CIA, Agencia Internacional de Investigación en Cáncer IARC) para evaluar el potencial mutagénico y cancerígeno de nuevas sustancias químicas, medicinas y biocidas. Este método se ha usado como un procedimiento para homogeneizar las pruebas de laboratorio de las agencias de reglamentación internacional para la aprobación de sustancias químicas (David Josephy *et al.*, 1997; Mortelmans y Zeinger, 2000).

La prueba de Ames puede evaluar la capacidad mutagénica, de muestras biológicas y ambientales complejas, y la cancerígena con pruebas en animales de laboratorio (Maron y Ames, 1983). El protocolo de Ames fue validado inicialmente por un estudio con 300 productos químicos (McCann *et al.*, 1975). Posteriormente se validó por las Industrias Imperial Química (Purchase *et al.*, 1976), Instituto de Investigación del Centro Nacional de Cáncer en Tokyo (NCCRI) (Sugimura *et al.*, 1976), y por la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (IARC) (Bartsch *et al.*, 1980).

El ensayo de Ames con *Salmonella typhimurium* ha determinado la mutagenicidad de las aminas de tintes para cabello (NCI Bioassays, 1978a, 1979a, 1979b; Weisburger *et al.*, 1978), del 1-nitropireno proveniente de las emisiones de diesel (Ohgake *et al.*, 1982), del tris (2,3-dinitropropil) fosfato empleado como retardante de flama (NCI Bioassay, 1978a, b), diversos productos de la pirólisis de proteínas por el efecto del cocimiento (Sugimura, 1982), terpenos (Gómez-Carniero *et al.*, 2005), compuestos químicos comerciales (Zeiger y Margolin, 2000), micotoxinas (Carvajal *et al.*, 2004; Nieminen *et al.*, 2002; Price y Jorgensen 1985), plaguicidas (Aleem y Malik, 2005), aminas (Knize *et al.*, 2003) y antimutágenos como el azafrán (Abdullaev *et al.*, 2003).

Zeiger y Margolin (2000), con la prueba de Ames, midieron la proporción de sustancias mutágenas en 100 productos químicos comerciales y encontraron que el 2% fueron mutágenos. Por otra lado, Abdullaev *et al.* (2003) emplearon la prueba de Ames para comprobar el potencial antigenotóxico y los efectos citotóxicos del azafrán, usado para dar color y sabor a los alimentos. La mezcla de carotenos del azafrán no afecta a las células normales pero tuvo efectos inhibitorios sobre las células malignas. El azafrán a ninguna dosis induce mutagénesis, pero en presencia de cancerígenos probados, como son el benzo(a) pireno y el 2-aminoantraceno, induce una co-mutación.

La prueba de Ames ha evaluado los efectos mutágenos provocados por compuestos poliaromáticos del ambiente como son los nitro-hidrocarburos aromáticos policíclicos (NHAP), y los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) (Du Fourt *et al.* 2004). Knize *et al.* (2003) evaluaron los efectos de tres aminas heterocíclicas de alimentos sometidos a calentamiento, reportan que hubo una diferencia marcada entre las tres aminas heterocíclicas de 2, 100 y 320 colonias revertidas de *Salmonella* TA-98. Las mascotas son un modelo adecuado para estimar los riesgos de desarrollar ciertos tipos de cáncer pues ingieren estas aminas en la dieta. Por otra parte, el ensayo de colonias revertidas

de *Salmonella*, fue empleado por Aleem y Malik, (2005), para determinar el efecto genotóxico del agua del río Yamuna, India, causado por la fracción orgánica de los contaminantes. Los extractos obtenidos del agua del río Yamuna contuvieron una mezcla de compuestos con actividad mutagénica y cancerígena.

La prueba de Ames también ha determinado la toxicidad y la nula capacidad mutágena de la gliotoxina, producida por *Aspergillus fumigatus* (Nieminen *et al.*, 2002), a concentraciones probadas de 0 a 2.5 μg / placa de cultivo.

Los estudios sobre el control de AF en tortillas muestran resultados contradictorios, a veces con reducciones parciales o bien con un control total. Para evaluar el riesgo de consumo de AF se consideran las AFt de las tortillas, y se ha propuesto que la nixtamalización tradicional podría ser un buen método de control y eliminación de las mismas, aunque los resultados son contradictorios. Algunos investigadores (Méndez-Albores *et al.*, 2004) han propuesto realizar la nixtamalización vía extrusión alcalina, sin embargo, los niveles de AF en las tortillas, su efecto en la salud por su alto consumo no han sido resueltos todavía. Los niveles de AF en tortillas, reportados con anterioridad, fueron elevados y para su control se aumentó la concentración de cal y el tiempo de cocción.

El maíz de temporal crece en condiciones desfavorables, esto predispone a las plantas a ser infectadas por el hongo *Aspergillus flavus*. Para controlar las AF hay que tener buenas prácticas agronómicas, control de insectos y otras plagas, y un buen sistema de almacenamiento. Estas estrategias resultan ser caras para los pequeños productores del centro y sur del país. En México se ha investigado la contaminación de alimentos por el hongo *Aspergillus* y sus AF, pero se requiere determinar la presencia y concentraciones de las AF en sus productos derivados.

Debido a reportes previos, surge la necesidad de realizar un estudio enfocado a identificar y cuantificar la presencia de AF en tortillas de maíz que se expenden en la Ciudad de México, y determinar si tienen un efecto mutágeno por su grave repercusión en la salud pública de México. La importancia de investigar las tortillas de la Ciudad de México es que aquí habitan cerca de 8, 720, 916 habitantes consumidores de ellas (INEGI, 2005). Se espera que este estudio proporcione las bases científicas para conocer el grado de contaminación por AF en tortillas de la Ciudad de México y la capacidad de producir mutaciones en el modelo de Ames.

II. OBJETIVOS

1. Identificar y cuantificar a las AF (AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂) por cromatografía de líquidos para conocer los niveles de contaminación de las tortillas de maíz de la Ciudad de México.
2. Evaluar con la prueba de Ames la capacidad mutágena de las AF presentes en las muestras de tortillas de la Ciudad de México a fin de conocer el posible riesgo a la salud por su consumo.

Actividades para el logro de los objetivos

1. Realizar un total de 4 muestreos de tortillas de la Ciudad de México durante 2 años con un total de 784 kg.
2. Determinar la significancia estadística del tipo de expendio (tortillería o de supermercado), la delegación, la estación del muestreo, tipo de materia prima, sobre la presencia y concentración de AF en tortillas.
3. Validación del método analítico de cromatografía de líquidos.
4. Adecuar la técnica de Ames para el análisis de AF en tortillas.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

NULA

Se espera que los niveles de contaminación por aflatoxinas en tortillas de la Ciudad de México se encuentren por debajo del valor normativo de 12 $\mu\text{g kg}^{-1}$ y que las AF presenten no sean mutágenas en estas concentraciones.

ALTERNA

Los niveles de contaminación por aflatoxinas en tortillas de la Ciudad de México superaran el valor normativo de 12 $\mu\text{g kg}^{-1}$ y las AF aisladas presentaran altos valores de mutagenicidad.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Muestreo y encuestas

Con el fin de tener una muestra representativa de tortillas del Distrito Federal (D.F.) se realizó un muestreo sistemático con arranque aleatorio. Se adquirieron 784 kg equivalentes a 392 muestras de 2 kg de tortillas cada una, durante dos periodos del año (secas y lluvias) durante los años 2006 y 2007. Los muestreos correspondientes a las estaciones de secas del 2006 y 2007 fueron durante los meses de abril y de lluvias en noviembre.

En cada una de las 16 Delegaciones del Distrito Federal, fueron asignados 6 puntos de muestreo de manera aleatoria, correspondientes a tres tortillerías y tres supermercados, donde se recolectaron 2 kg de tortillas, así, para cada Delegación la muestra total de tortillas fue de 12 kg. Seis correspondientes a tortillas elaboradas con nixtamal de maíz y seis correspondientes a tortillas elaboradas con harina nixtamalizada en las Delegaciones que cuentan con supermercados. Teniendo al final un total de 98 muestras representativas de la Ciudad por cada periodo de muestreo, **Figura 5**.

Aunque 16 Delegaciones por 6 puntos dan 96, se tomaron 2 muestras extra de Iztapalapa y de Venustiano Carranza, dada la población de estas Delegaciones, de modo que fueron 98 expendios y no 96. A cada vendedor de tortillas de cada uno de los 98 expendios muestreados se le solicitó que respondiera un cuestionario para conocer la materia prima usada en la elaboración de tortillas, el tipo de maíz, la venta de los expendios. Finalmente, los datos fueron graficados en Excel® para ver el comportamiento e identificar tendencias. Las preguntas aplicadas en la encuesta se muestran a continuación.

Encuesta aplicada a los encargados de los 98 expendios de tortillas

1. Las tortillas que vende son de:

Masa de nixtamal Harina de nixtamal comercial Mezcla de ambas

Observaciones de marca y proporción _____

2. La masa de las tortillas es de molino: _____ propio _____ comercial

3. Las tortillas que vende son de maíz:

Blanco Amarillo Otro especificar: _____

4. El maíz para sus tortillas se produce en:

la región los Estados de México. Estado: _____

5. Su venta diaria es de: _____ kg

A continuación en la **Figura 5**, se muestra el mapa del D.F., en el que se han localizado los 98 puntos de muestreo.

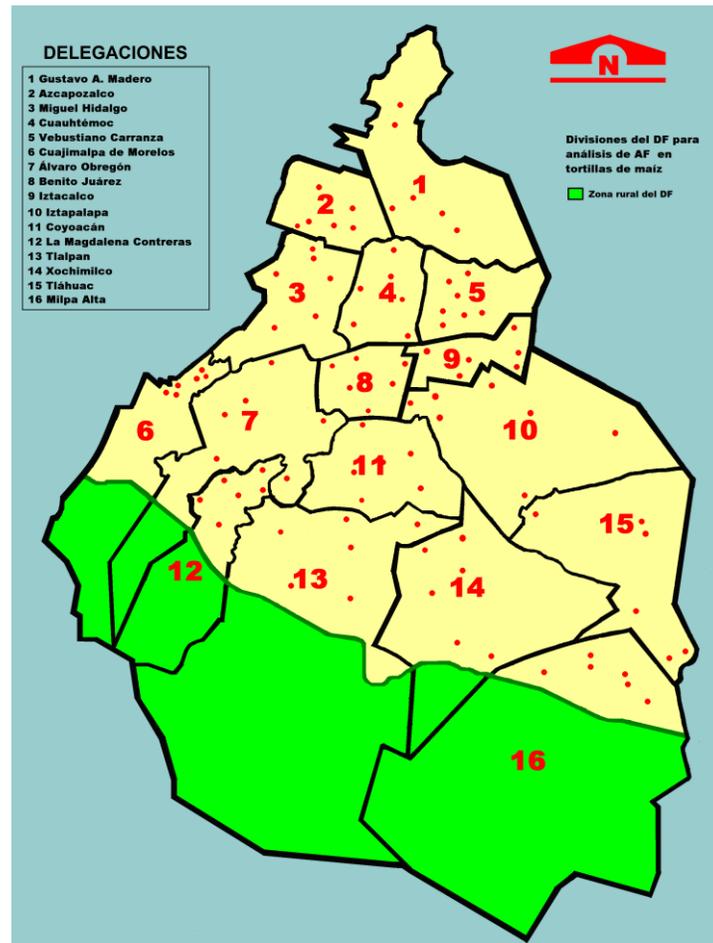


Figura 5. Localización de los 98 puntos de muestreo de tortillas en la Ciudad de México.

3.2. Secado y molienda de tortillas

Las muestras de dos kilogramos de tortillas, debidamente etiquetadas, se almacenaron en bolsas de plástico de 40 x 30 cm², directamente del expendio. Posteriormente se transportaron al laboratorio para su secado y análisis. Las muestras se deshidrataron a 70°C por 24 horas, en el cuarto de secado del Herbario Nacional del Instituto de Biología, de la Universidad Nacional Autónoma de México (IBUNAM), posteriormente se molieron en forma individual en una licuadora industrial (Cafeteras Internacionales, Li-5 057, Edo. Mex., México). Las tortillas del primer muestreo se secaron, se cortaron en pedazos y se molieron en un molino de discos (Romer Inc.), las del segundo al cuarto muestreos fueron procesadas en licuadoras industriales (Cafeteras Internacionales S.A.).

3.3. Análisis químico de las aflatoxinas

3.3.1. Criterios de pureza de los estándares de AF

La longitud de onda máxima de absorción para las AF (B_1 , B_2 , G_1 , G_2), se determinó empleando un espectrofotómetro UV-visible (Genesys 10uv, Termo Electron Corporation, Madison Wisconsin, EEUU), el cual se ajustó a 0 de absorbancia mediante un blanco de solución benceno: acetonitrilo (98:2 v/v). Posteriormente, se realizó un barrido de 300 a 400 nm de las soluciones de cada una de las AF. Los coeficientes de extinción molar se determinaron de acuerdo con la **Tabla 5** tomada del método 970.44 (AOAC, 2005).

Tabla 7 Valores de absorción molar para cada aflatoxina en benceno:ACN (AOAC, 2005).

Aflatoxina	Longitud de onda de Absorbancia λ (nm)	Coefficiente de extinción en benceno: ACN (98:2 v/v) ($M^{-1} cm^{-1}$)	Peso Molecular (g/mol)
B_1	350	19800	312
B_2	350	20900	314
G_1	350	17100	328
G_2	350	18200	330
M_1	350	18815	328

3.3.2. Cálculo del factor de corrección (FC) del equipo

Se preparó una solución con 250 mL de ácido sulfúrico, H_2SO_4 (J.T. Baker, Xalostoc, Mexico), 0.018N y 19.5 mg de dicromato de potasio, $K_2Cr_2O_7$ (J.T. Baker, Xalostoc, Mexico), (método 970.43 (B)) (AOAC, 2005). De la solución resultante (**0.25 mM $K_2Cr_2O_7$**) se tomaron alícuotas para preparar dos soluciones con concentraciones de 0.125 mM y 0.0625 mM respectivamente (AOAC, 2005; DOF, 2002b).

Posteriormente, se calibró el espectrofotómetro UV-vis a cero de absorbancia con una solución de H_2SO_4 0.018N como blanco de acuerdo con el método 970.44 (AOAC, 2005). A continuación se procedió a leer la absorbancia, a la longitud de onda de máxima absorbancia para cada AF, de las tres concentraciones de $K_2Cr_2O_7$ en orden ascendente. Con los valores obtenidos se procedió a calcular el coeficiente de extinción molar mediante la siguiente ecuación: $\epsilon = (Abs \times 1000 / [mM])$, donde ϵ es el coeficiente de extinción, Abs es absorbancia y mM es concentración milimolar. El valor del coeficiente de extinción molar sirvió para calcular el factor de corrección del equipo mediante la siguiente ecuación:

$$FC = 3160 / \epsilon_{\text{promedio}}$$

donde: 3160 es el coeficiente de extinción (ϵ) teórico reportado en AOAC (2005), para soluciones de dicromato de potasio y $\epsilon_{\text{promedio}}$ es el coeficiente de extinción experimental para las soluciones de dicromato de potasio. Se verificó que el valor de FC se encontrara

en el intervalo de aceptación de 0.95 a 1.05, para poder calcular la concentración real de cada una de las AF (método 971.22 (B) AOAC, 2005) mediante la ecuación que a continuación se detalla: $\mu\text{g de AF mL}^{-1} = (\text{Abs} \times \text{PM} \times 1000 \times \text{FC})/\varepsilon$

donde: Abs es Absorbancia; PM es Masa molecular de cada aflatoxina; FC es Factor de corrección del equipo; ε es Coeficiente de extinción molar para soluciones de AF en benceno:acetonitrilo (98:2 v/v).

3.3.3. Obtención de la solución estándar de un $\mu\text{g mL}^{-1}$

La preparación de las soluciones de los estándares de AF (B_1 , B_2 , G_1 , G_2 Sigma-Aldrich, St. Louis MO, EEUU), se realizó según lo descrito en el método 970.44 (A) AOAC (AOAC, 2005; DOF, 2002a). Para ello, se disolvieron los estándares con una mezcla benceno-acetonitrilo (98:2 v/v) (J.T. Baker, Xalostoc, México), para obtener una solución con concentración de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$, a partir de la lectura de la Absorbancia (nm) de cada AF, en un espectrofotómetro UV-vis. Las curvas de calibración se prepararon con las diferentes concentraciones (2, 5, 10, 20, 50, 100 and 200 ng de AF mL^{-1}) de las soluciones de cada AF.

3.3.4. Derivatización de AF

Los estándares de cada AF se evaporaron a sequedad y se resuspendieron con 200 μL de acetonitrilo (ACN), y con objeto de aumentar su fluorescencia se adicionaron 800 μL de solución derivatizante. La solución derivatizante consistió en 5 mL de ácido trifluoroacético (ATF) (Sigma-Aldrich, St. Louis MO, USA) + 2.5 mL ácido acético glacial (Merck, Naucalpan, Edo. Mex., México) + 17.5 mL de agua desionizada, se agitó la mezcla en un agitador orbital (Vortex G-560, Bohemia, N.Y., EEUU) por 30 segundos.

Los viales se mantuvieron en un baño María a 65 °C por 10 minutos según describen Akiyama *et al.* (2001) y Kok (1994). Posteriormente se llevaron a temperatura ambiente y se inyectaron 20 μL en el cromatógrafo de líquidos con loop de 20 μL para su análisis.

En el caso de las muestras, 1 mL del eluido se evaporó a sequedad, y se resuspendió en 100 μL de ACN, a este volumen se le adicionaron 400 μL de solución derivatizante, se agitó la mezcla por 30 segundos y se continuó calentando como se describió anteriormente.

3.3.5. Curva de calibración

Se inyectaron concentraciones de 200 ng mL^{-1} , de cada una de las 4 AF (B_1 , B_2 , G_1 , G_2) derivatizadas en forma individual, para conocer su tiempo de retención. Asimismo, se hizo una mezcla con las cuatro AF manteniendo una proporción de $G_1:B_1:G_2:B_2$ (1:1:1:1) para preparar la curva de calibración; se prepararon concentraciones inferiores y superiores a 12 $\mu\text{g kg}^{-1}$ que es el límite de tolerancia para tortillas establecido en la NOM-187-SSA1/SCFI-2002 (DOF, 2002a).

La **Tabla 6** muestra la relación de concentraciones individuales de cada AF en la mezcla para los distintos puntos de la curva de calibración.

Tabla 6.8 Concentración aportada por cada aflatoxina para hacer la concentración total de los cuatro estándares.

Concentración individual (ng mL ⁻¹) de B ₁	Concentración individual (ng mL ⁻¹) de B ₂	Concentración individual (ng mL ⁻¹) de G ₁	Concentración individual (ng mL ⁻¹) de G ₂	Concentración total (ng mL ⁻¹) G ₁ +B ₁ +G ₂ +B ₂
2	2	2	2	8
5	5	5	5	20
10	10	10	10	40
20	20	20	20	80
30	30	30	30	120
50	50	50	50	200
100	100	100	100	400
200	200	200	200	800

3.3.6. Extracción, purificación y concentración de AF

La extracción de las AF se realizó de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana 188-SSA1-2002 (DOF, 2002b) para maíz, a la cual se le hicieron algunas modificaciones para adaptarla a tortillas de maíz nixtamalizado. Se licuaron 50 g de tortilla molida (peso seco) con 100 mL de una mezcla de metanol: H₂O (80:20 v/v) y 1 g de NaCl a alta velocidad por 2 minutos. La muestra se filtró a través de papel filtro de poro cerrado (Filtrado 1); de éste se tomó un volumen de 2 mL, equivalente a un gramo de muestra, y se diluyó en 16 mL de solución amortiguadora de fosfatos (PBS). Nuevamente la dilución fue filtrada a través de papel filtro de fibra de vidrio (Filtrado 2).

La limpieza y concentración de las AF se realizaron mediante columnas de inmunoafinidad Easi-Extract (Cat N° RP71, R-Biopharm Rhône Ltd. Glasgow, Scotland) para AFt. Las columnas se activaron y acondicionaron con 20 mL de solución reguladora de fosfatos (PBS), a un pH de 7.4, posteriormente se hicieron pasar los 16 mL del Filtrado 2 a una velocidad de 2 gotas por segundo. Una vez agotada la muestra la columna de inmunoafinidad se lavó con 20 mL de agua destilada, y finalmente se secó haciendo pasar aire a través de ella. Posteriormente, las AF se eluyeron con 2 mL de ACN grado cromatográfico (J.T. Baker, Xalostoc, México).

3.3.7. Condiciones para el análisis por cromatografía de líquidos

La cuantificación de las AF se realizó por HPLC, con una bomba (Agilent Series 1100, EEUU), equipado con un inyector Rheodyne 7125-075 con un rizo o loop fijo de 20 µL (Cotati, CA, EEUU), un detector de fluorescencia (Perkin Elmer LC-10, EEUU), y un integrador de datos (Perkin Elmer LCI-100, EEUU). La separación se llevó a cabo

mediante una columna C₁₈ de fase reversa de 4.6 mm D.I. x 250 mm L x 5 µm de diámetro de partícula (Phenomenex, Prodigy ODS (2), Torrance, EEUU).

Todos los disolventes se desgasificaron por 30 minutos usando un equipo de filtración con vacío. El agua grado HPLC fue obtenida por filtración de agua destilada y desionizada mediante un sistema de microfiltración a través de membranas de nylon de 0.45 µm x 47mm (Millipore, Bedford, MA, EEUU).

La fase móvil tuvo la siguiente composición: agua:ACN:metanol (65:15:20 v/v/v). La columna cromatográfica se mantuvo a temperatura ambiente (25 °C), con un flujo de la fase móvil de 1.2 mL min⁻¹. Se ajustaron las longitudes de onda de excitación 362 nm y de emisión 450 nm del detector de fluorescencia. La identificación y cuantificación de las AF, en el extracto final, se realizó por comparación de los tiempos de retención de los estándares, de las áreas bajo la curva y los valores obtenidos para estos parámetros en las muestras.

3.3.8. Validación del sistema

Para la validación del método analítico se siguió el procedimiento descrito por García y Alcántara (2002). A continuación se describe cada paso seguido para dicho fin.

3.3.8.1. Precisión del sistema

Se prepararon quintuplicados de las soluciones de AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂ en concentración de 10 ng mL⁻¹ por medio de diluciones independientes, se derivatizaron de acuerdo con lo descrito en la sección 3.3.4., de este capítulo, y se midió la respuesta analítica bajo las condiciones de análisis por HPLC establecidas en la sección 3.3.7. Se procedió a determinar la desviación estándar (DE) y el porcentaje del coeficiente de variación (% CV).

3.3.8.2. Adecuabilidad del sistema

Se inyectó la solución de adecuabilidad consistente en una mezcla de las cuatro AF en la siguiente relación: AFG₁:AFB₁:AFG₂:AFB₂ (40:40:20:20 ng mL⁻¹) por triplicado, bajo las siguientes condiciones de elución (García y Alcántara, 2002):

Fase móvil de ACN:MeOH:H₂O (15:20:65 v/v/v), flujo 1.2 mL min⁻¹, detección por fluorescencia con una excitación de 362 nm y una emisión de 450 nm. Se determinó el %CV de la respuesta analítica y los siguientes parámetros:

K': factor de capacidad > 2

R: resolución > 2

α: selectividad, que es la independencia de picos cromatográficos.

N: número de platos teóricos, que sean cercanos a los referidos por el fabricante de la columna C₁₈. Entre más platos teóricos, más eficiente es la columna C₁₈.

3.3.8.3. Linealidad del sistema (curvas de calibración)

Se inyectaron cada una de las ocho concentraciones de cada AF y se graficó la respuesta de la señal analítica (área bajo la curva de cada pico cromatográfico) contra la concentración del analito, se obtuvo la ecuación de la curva y se calcularon los parámetros estadísticos. Se determinó el valor de la pendiente (b_1), la ordenada al origen (b_0), el coeficiente de correlación (R^2) y el intervalo de confianza para la pendiente ($IC(\beta_1)$), la DE, el % CV, se determinaron los límites de cuantificación (LC) y de detección (LD) utilizando Excel 2003.

3.3.8.4. Exactitud y repetibilidad del método

Se preparó una muestra de 50 g de tortillas molida y seca, por triplicado, a la cual se le adicionaron $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ de cada una de las AF. Se homogeneizaron y se dejaron reposar 24 horas, posteriormente se extrajeron de acuerdo a lo descrito en la sección 3.3.6. Y se analizaron bajo las condiciones descritas en 3.3.7. Con los valores de la señal analítica (área cromatográfica), se calculó el promedio aritmético (\bar{y}), la DE, el % CV y el intervalo de confianza para la media poblacional ($IC(\mu)$) del porcentaje de recuperación.

3.3.8.5. Linealidad del método

Se prepararon muestras de tortilla adicionadas con tres concentraciones de cada AF (10, 20 y $30 \mu\text{g kg}^{-1}$), se extrajeron con una solución de metanol:agua (80:20 v/v), se purificaron y concentraron con columnas de inmovilización, y se identificaron y cuantificaron por HPLC de acuerdo a las secciones 3.3.6 y 3.3.7.

Se trazó la gráfica de concentración contra señal analítica y se calcularon los siguientes parámetros: Relación de estándar adicionado vs. estándar recuperado, el valor de la pendiente (b_1), la ordenada al origen (b_0), el coeficiente de determinación (R^2) y el intervalo de confianza para la pendiente ($IC(\beta_1)$), intervalo de confianza para la ordenada al origen ($IC(\beta_0)$) y el coeficiente de variación de regresión ($CV_{y/x}$).

Se calculó el porcentaje de recuperación de cada muestra adicionada, al obtener el cociente de la cantidad recuperada con respecto a la adicionada. Se calculó el promedio aritmético (\bar{x}), la DE, el % CV y el intervalo de confianza para la media poblacional ($IC(\mu)$).

3.3.8.6. Límites de detección y de cuantificación

Los límites de detección y de cuantificación se determinaron con base en la curva de calibración y en la desviación estándar de regresión. Para tal fin, se prepararon tres concentraciones ($10, 20$ y $40 \mu\text{g kg}^{-1}$), se midió la respuesta analítica y se calcularon los siguientes parámetros: el valor de la pendiente (b_1), el coeficiente de correlación (R^2), la desviación estándar de regresión ($S_{y/x}$) y el intervalo de confianza para la pendiente ($IC(\beta_1)$).

En el caso del límite de detección se utilizó la siguiente ecuación:

$$LD = \frac{3.3xS_{(y/x)}}{b_1}$$

Donde: $S_{y/x}$ es la desviación estándar de regresión y b_1 es el valor de la pendiente.

Y en caso del límite de cuantificación se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$LC = \frac{10xS_{(y/x)}}{b_1}$$

Donde: $S_{y/x}$ es la desviación estándar de regresión y b_1 es el valor de la pendiente.

3.3.9. Análisis estadístico de los valores de AF contra las fuentes de variación

Un análisis estadístico se llevó a cabo comparando los valores de AF obtenidos en las muestras de tortilla de los cuatro muestreos que se realizaron los meses de abril y noviembre de los años 2006 y 2007.

El análisis estadístico consistió en las pruebas de análisis de varianza (Anova), como un método descriptivo de los niveles de significancia estadística. Debido a que la distribución de las AF fue muy dispersa y no se ajustó a una distribución normal, fue necesario correr la prueba de Wilcoxon/ Kruskal-Wallis (Wilcoxon, 1945; Kruskal y Wallis, 1952), que en sus supuestos no asume una distribución normal y que se ajusta a los datos obtenidos en esta investigación. Los resultados de la concentración de AF en las muestras fueron comparados contra el valor de tolerancia límite para tortillas ($12 \mu\text{g kg}^{-1}$), que establece la legislación mexicana. Se usaron tablas de contingencia con variables dependientes binarias si las concentraciones de AF totales eran superiores al límite de tolerancia. La prueba no paramétrica se usó para comparar las medias de las muestras e identificar las diferencias existentes entre las fuentes de variación y la concentración de cada AF.

Las fuentes de variación probadas en el experimento son el mes de muestreo abril y noviembre (que representan las estaciones de secas y lluvias), tipo de expendio (tortillería y supermercado), materia prima (masa, harina, ó mezcla: masa-harina), marca de harina (Maseca, Minsa, Agroinsa) y la Delegación de muestreo.

3.4. Prueba de Ames para muestras de tortilla

3.4.1. Extracción de AF de las tortillas para su análisis por la prueba de Ames

Para determinar el potencial mutágeno de las AF de las tortillas, se realizaron dos experimentos con las AF de las mismas 21 muestras de tortillas y 4 controles (S06 -33, LL06-24, S07-18 y LL07-32), **Tabla 7**. En el primer experimento no se acidificaron las muestras de tortilla con la finalidad de conocer el efecto de la nixtamalización que abre el anillo de lactona de las AF y las inactiva. Ya en el segundo experimento sí se acidificaron para cerrar el anillo de lactona.

Tabla 7. Muestras de tortillas, naturalmente contaminadas con aflatoxinas, usadas para el análisis de mutagenicidad mediante la prueba de Ames, en los dos experimentos con y sin acidificación.

Delegación	Identificación de muestras	AFB ₁ (µg kg ⁻¹)	AFB ₂ (µg kg ⁻¹)	AFG ₁ (µg kg ⁻¹)	AFG ₂ (µg kg ⁻¹)	Total de AF (µg kg ⁻¹) de tortilla
Iztapalapa	S06-5	12.80	ND	ND	ND	12.80
Iztapalapa	S06-6	4.84	ND	ND	ND	4.84
G. A. Madero	S06-9	0.29	ND	ND	ND	0.29
A.Obregón	S06-17	ND	ND	ND	<LC	<LC
Cuauhtémoc	S06-33	ND	ND	ND	ND	ND
Azcapotzalco	S06-48	3.78	2.21	3.93	5.25	15.17
B. Juárez	S06-68	4.81	<LD	4.12	2.39	11.1
Tláhuac	S06-76	ND	<LC	4.16	ND	4.16
M.Contreras	S06-81	105.7	<LC	ND	ND	105.7
Cuajimalpa	S06-90	29.6	<LC	ND	ND	29.6
Coyoacán	LL06-24	ND	ND	ND	ND	ND
M.Contreras	LL06-81	7.78	ND	ND	ND	7.78
M.Contreras	LL06-82	<LC	4.20	385.21	3.89	393.3
M.Contreras	LL06-85	4.93	<LC	5	5.92	15.8
A.Obregón	S07-18	ND	ND	ND	ND	ND
Tlalpan	S07-31	140.33	ND	150.14	ND	290.47
Azcapotzalco	S07-49	ND	4.7	ND	ND	4.72
Xochimilco	S07-61	ND	ND	<LD	ND	<LD
Cuauhtémoc	LL07-32	ND	ND	ND	ND	ND
V. Carranza	LL07-43	ND	2.4	ND	ND	2.4
Xochimilco	LL07-58	ND	ND	ND	<LC	<LC
M.Hidalgo	LL07-71	11.4	3.1	16.6	ND	31.1
M.Contreras	LL07-83	ND	ND	5.8	<LC	5.8
M.Contreras	LL07-84	<LC	<LC	ND	ND	<LC
Milpa Alta	LL07-98	ND	<LC	ND	ND	<LC

Para la obtención de las AF de las muestras del primer experimento sin acidificación de tortillas, se extrajeron 14.25 g (equivalente al peso seco promedio de una tortilla) y 71.25 g de muestra (equivalentes al promedio del peso seco de 5 tortillas), con una mezcla metanol:agua (80:20 v/v), y un gramo de cloruro de sodio. Los extractos se concentraron a 5 mL a una temperatura de 60 °C y se purificaron usando placas de aluminio cubiertas con gel de sílice 60 para cromatografía en capa fina (TLC) de 20 x 20 cm (Merck 1.05553, Darmstadt, Alemania). Los extractos de las muestras de una y cinco tortillas se colocaron sobre las placas usando una micropipeta de 10 µL a una distancia de 1.5 cm de la base de la placa. El corrimiento de la placa se realizó en una cámara cromatográfica previamente equilibrada con 100 mL de una mezcla de tolueno:acetona:acetato de etilo (60:20:40 v/v/v) como fase móvil. Se dejó correr la placa hasta que el frente del disolvente alcanzó 2 cm antes del final de la placa, se marcó el frente, se secaron las placas en una campana de extracción protegida de la luz. Posteriormente las bandas se revelaron colocando las cromatoplasmas bajo luz UV usando una lámpara UV (UVGL 58, UV 254/366 nm, 115V, 60Hz, 0.16 A. Upland, CA, EEUU), en una cámara oscura y se marcaron con lápiz las manchas de color verde y/o azul fluorescente usando guantes de protección. Se calculó el factor de retención (R_f) para cada una de las AF dividiendo la distancia recorrida por el analito (centro de la banda) entre el recorrido total o frente del disolvente. Se raspó cada banda fluorescente (azul ó verde) de la cromatoplasma, correspondiente a las AF de cada muestra, es decir las bandas que se encontraron entre el rango de $R_f = 0.3$ a 0.35 . Se colocaron los polvos de los raspados en un solo vial, que contuvo a las AF totales. Las AFt se recuperaron del gel de sílice mediante una mezcla de tolueno:ACN grado HPLC (98:2 v/v). Se secaron a 40 °C en una estufa de calentamiento, el extracto seco con las AFt fue resuspendido en 100 µL de dimetil sulfóxido (DMSO) para la prueba de mutagénesis.

En el segundo experimento, con acidificación de las muestras de tortillas contaminadas con AF, las muestras se extrajeron con una mezcla de metanol:agua (80:20 v/v), a la cual se le ajustó el pH a 2 por la adición de HCl 6M, y un gramo de cloruro de sodio. Y después de 12 horas de reposo a 5 °C se neutralizó cada muestra, con la adición de NaOH 3M, a pH 7.0 ± 0.2 con objeto de cerrar el anillo de lactona de las AF y reactivar su poder mutágeno.

Finalmente, se aplicó la misma metodología para los tratamientos de cada muestra y control.

3.4.2. Verificación de los marcadores genéticos de *Salmonella typhimurium* TA98

Antes de realizar el experimento de mutagénesis, fue necesario verificar los marcadores genéticos de la cepa bacteriana, para ello se prepararon los medios de cultivo necesarios que se describen en el **Anexo 1**. Se adicionaron las soluciones de histidina, biotina y del antibiótico Ampicilina correspondientes a cada medio de cultivo con 24 horas de anticipación.

Se empleó una cepa de *Salmonella typhimurium* TA98 (raza) [*hisD3052*, *gal*, (*chl*, *uvrB*, *bio*) *rfa*, pKM101 (MucA/B Amp)] la cual se recuperó de un cultivo conservado a -80°C donado por el M. en C. Israel Pérez López del laboratorio de Oncología Experimental del Instituto Nacional de Pediatría, SSA. La cepa se descongeló y se inoculó por agotamiento

en estría radial sobre placas con medio sólido (NB) de Oxoid N° 2 (Oxoid, Hampshire, Inglaterra). Se incubaron a 37 °C durante 24 y 48 horas. De estas cajas de Petri o placas se seleccionaron 5 colonias perfectamente aisladas, se sembraron en los tubos respectivos, con 5 mL de Oxoid N° 2 líquido (LB) + ampicilina como antibiótico. Los tubos Falcon® estériles, con tapa, se colocaron en forma inclinada sobre una gradilla para permitir una buena aireación del cultivo y se introdujeron en una incubadora con agitación suave a 120 rpm, la incubación se realizó por 16 horas a 37 °C.

El agar de superficie en los tubos se fundió en autoclave a 120 °C por 10 min, después los tubos se colocaron en un multiblock (New Brunswick Scientific) a 45 ± 2 °C para mantenerlos fundidos.

Una vez transcurridas las 16 horas de incubación del cultivo nocturno, se sacaron los tubos y se llevaron a temperatura ambiente antes de comenzar la siembra. Cada tubo se sembró, en un área estéril, con los siguientes medios, para verificar los marcadores genéticos de la cepa TA98 que se comparó contra la cepa silvestre (Wild type = **Wt**).

3.4.2.1. Medios de cultivo empleados para verificar los marcadores genéticos para la prueba de Ames (Anexo 4)

1. Reversión espontánea: Medio mínimo de glucosa.
2. Dependencia a histidina: Medio mínimo de glucosa + biotina (en exceso).
3. Dependencia a biotina: Medio mínimo de glucosa + histidina (en exceso).
4. Dependencia a histidina/biotina: Medio mínimo de glucosa + hist/biot (en exceso).
5. Sensibilidad a cristal violeta, marcador rfa: Medio sólido completo ó *nutrient broth* (NB).
6. Sensibilidad a luz UV (delección de genes *uvr-B-bio*): Medio sólido completo.
7. Verificación de la presencia del plásmido pKM101: Medio NB + ampicilina 2.5 mg/ 3 mL.
8. Agar de superficie (top).
9. Caldo nutritivo para cultivo nocturno (LB).
10. Placas patrón: Medio enriquecido para TA98 + ampicilina (8 mg mL^{-1}).
11. La solución de sales Vogel-Bonner (medio E 50X), se usó para preparar el medio mínimo de glucosa.

3.4.2.2. Prueba para determinar la dependencia a histidina (his-)

A partir del agar de cada tubo de cultivo nocturno se sembró, con un aplicador de madera estéril, la caja de prueba sin histidina (medio mínimo + biotina) y luego la caja testigo con histidina + biotina (en exceso). Se incubaron por 24 horas a 37 °C. **Figura 6.**

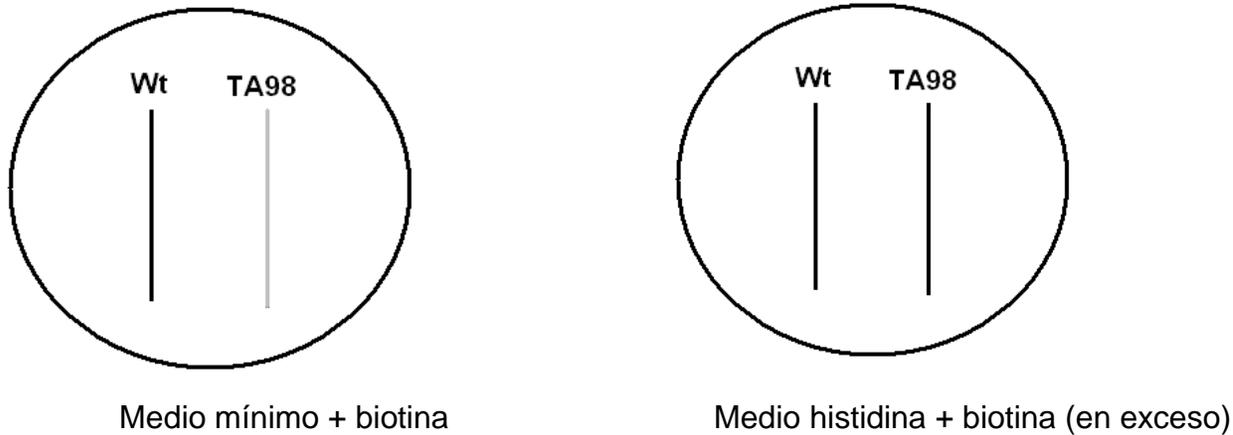


Figura 6. Desarrollo de la cepa Wt y TA98 después de las 24 horas de incubación. Se observa el crecimiento de la cepa wild type Wt en ambos medios de cultivo y la TA98 únicamente en el medio de cultivo con histidina + biotina.

3.4.2.3. Prueba para determinar la dependencia a biotina (bio-)

Para verificar este marcador, se sembró por estría recta cada una de las cepas del cultivo nocturno (Wt y TA98), sobre una placa de medio mínimo suplementada con un exceso de histidina (**Anexo 1**). Se incubó durante 24 horas a 37 °C. Sólo se debe observar el crecimiento de la cepa Wt pero no de la TA98. **Figura 7.**

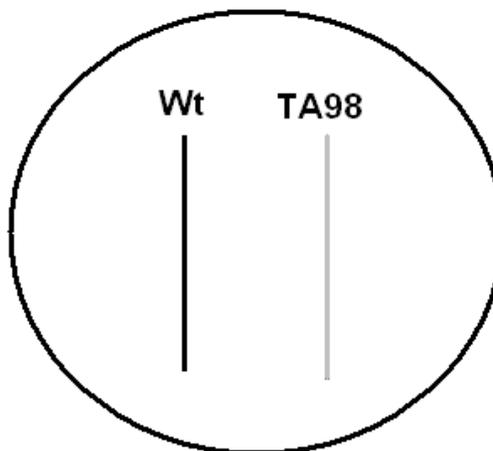


Figura 7. Desarrollo de la cepa Wt y TA98 en el medio mínimo + histidina (en exceso), donde sólo se observa el desarrollo de la Wt no dependiente de la biotina.

3.4.2.4. Prueba para determinar la dependencia a histidina-biotina (his-/bio-)

En una placa de agar mínimo suplementado con histidina/biotina se sembraron por estría recta el cultivo nocturno de Wt y TA98. Se incubaron por 24 horas a 37 °C y al final se debe observar crecimiento de las dos cepas. **Figura 8.**

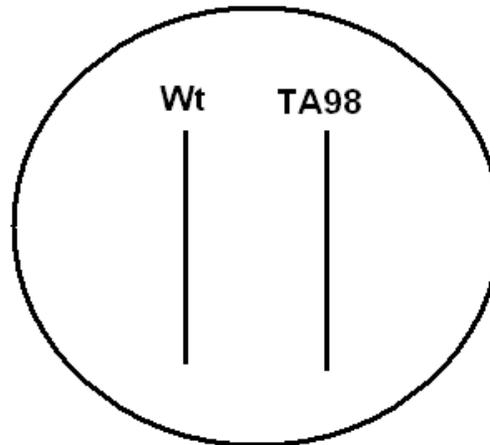


Figura 8. Desarrollo de las cepas Wt y TA98 en medio mínimo + histidina/ biotina (en exceso), después de 24 horas de incubación.

3.4.2.5. Prueba para determinar la sensibilidad al cristal violeta

Esta prueba se usa para verificar el marcador de la mutación rfa (modificación de lipopolisacáridos de la pared celular. Con un asa de madera estéril, y mediante estría recta se sembraron sobre una placa de medio completo las cepas Wt y TA98, se dejaron absorber y posteriormente se marcaron, en forma perpendicular, seis líneas con cristal violeta. Se incubaron por 24 horas a 37 °C. El halo de inhibición alrededor del cristal violeta indica la modificación de la pared celular y la presencia del marcador rfa. **Figura 9.**

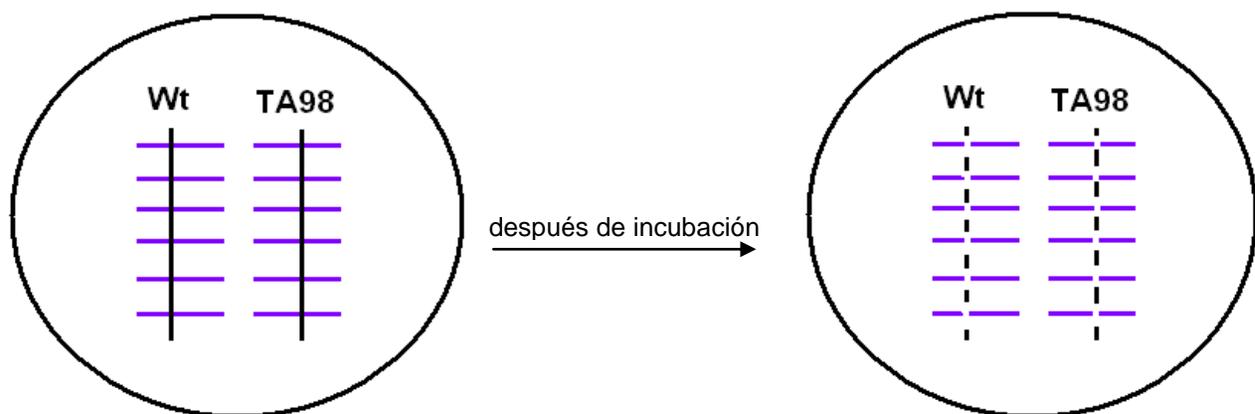


Figura 9. Desarrollo de las cepas Wt y TA98 en medio completo, después de 24 horas de incubación se observan halos inhibición del crecimiento.

3.4.2.6. Prueba de sensibilidad a la luz Ultravioleta

La determinación de la sensibilidad a la luz ultravioleta es una confirmación de la delección de gen *uvr-B-bio*. Se sembraron en una placa con medio completo las cepas TA98 y Wt. Se cubrió la mitad de la caja con papel aluminio y se irradió con una lámpara de luz UV (Mineralight, UVGL-58, Multiband UV 254/366 nm, 115 V, 60 Hz, 0.16 A, Upland CA., EEUU), a 10 cm de distancia durante 15 minutos; se incubó durante 24 hrs a 37 °C. Al término de la incubación se debe observar el crecimiento sobre toda la estría de la cepa Wt y solamente la mitad de la cepa TA98. **Figura 10.**

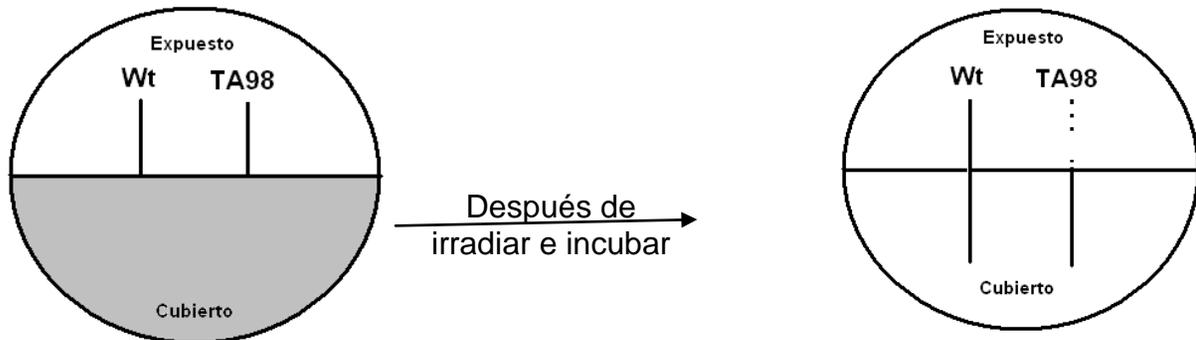


Figura 10. Sensibilidad de la cepa TA98 al daño del ADN por radiación UV.

3.4.2.7. Verificación de la presencia del plásmido pKM101.

El plásmido **pKM101** da resistencia a ampicilina y mayor sensibilidad a los mutágenos. A partir de cada tubo se sembraron las cepas del cultivo nocturno Wt y TA98 en estrías rectas. Primero se realizó la siembra sobre placas de medio completo y luego sobre placas de medio completo suplementado con ampicilina. Se incubaron por 24 horas a 37 °C, al término de la incubación se debe observar la inhibición de la cepa Wt y el desarrollo completo de la TA98 en el medio completo + ampicilina. **Figura 11.**

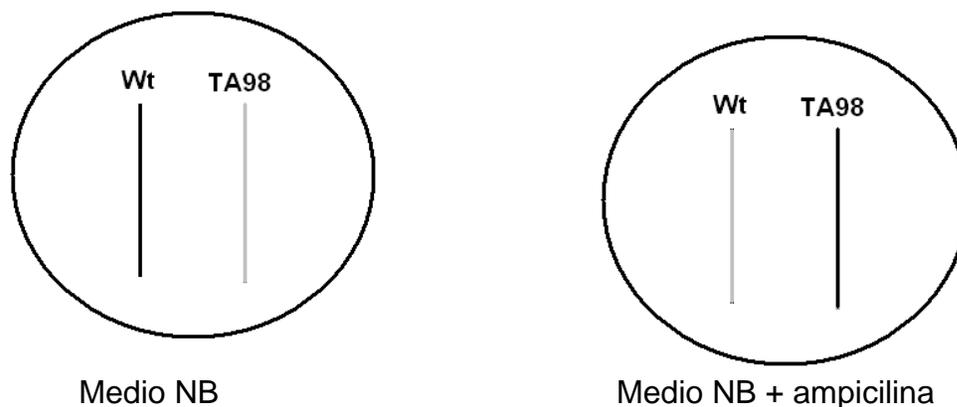


Figura 11. Identificación del plásmido pKM101, la cepa TA98 puede desarrollarse en el medio con ampicilina por ser portadora de dicho plásmido.

3.4.2.8. Reversión espontánea

Para esta prueba se utilizó una placa de medio mínimo de glucosa, a la cual se le adicionaron 2 mL de agar de superficie (Top), previamente mezclado con 100 μ L de la cepa Wt ó TA98 como lo muestra la **Figura 12**. Se incubaron por un periodo de 48 horas y al término se contaron las colonias revertidas usando un cuenta-colonias (New Brunswick Scientific) con contador electrónico. Los valores de reversión espontánea de referencia o control para la cepa TA98 sin la fracción S9 es de 20 a 50 colonias revertidas, estos valores se consideran como válidos en la literatura (McCann *et al.*, 1975; Mortelmans y Zeiger, 2000). En los laboratorios de Citogenética Vegetal y Humana del Centro de Ciencias de la Atmósfera se tienen registrados los valores históricos de 30 a 50 colonias revertidas por placa para la cepa TA98 y pueden considerarse como válidos (comunicación personal Dra. Josefina Cortés-Eslava, 2008).

Una vez verificadas las características genóticas de las cepas, se eligieron 3 colonias que mostraron la presencia de los marcadores genéticos. Con estas colonias se realizó la reserva en placas y en crioviales. Las placas se mantienen bajo refrigeración a 4 °C y los crioviales a -80 °C.

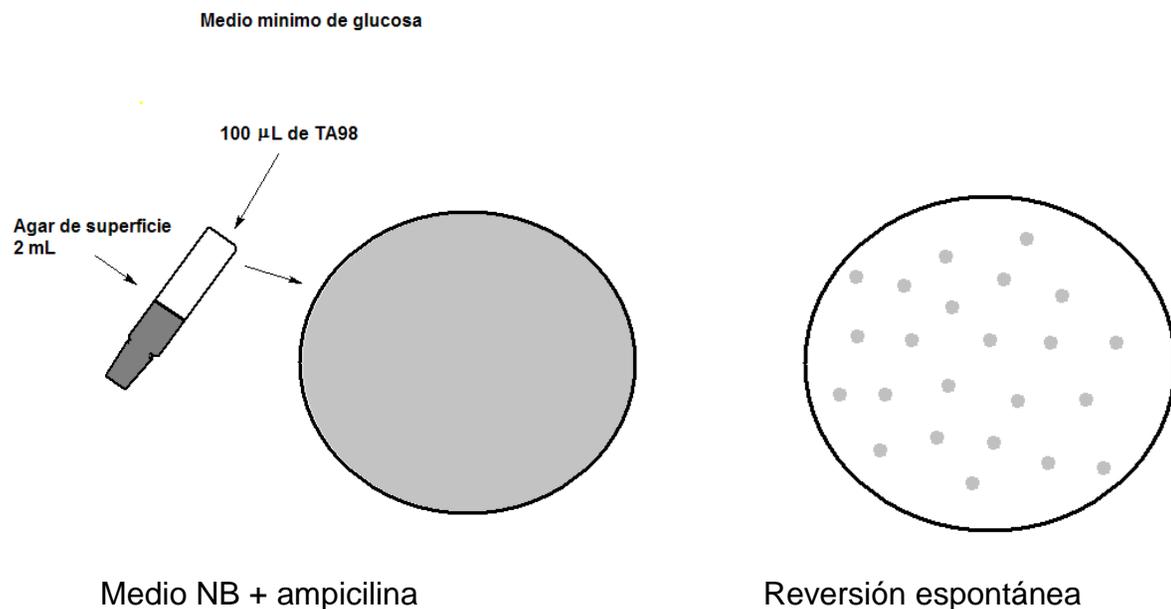


Figura 12. Reversión espontánea de TA98 después de 24 horas de la siembra.

3.4.3. Cultivos de reserva de la cepa TA98 una vez verificados los marcadores genéticos

3.4.3.1. Reserva en criovial

Se mezclaron 200 μL de cultivo nocturno de TA98 y 1800 μL de DMSO, se homogeneizaron suavemente y se guardaron en crioviales estériles (Nalgen, NY, EEUU). Se refrigeró primero a 4 °C por una hora y posteriormente se congeló a -20 °C para finalmente almacenarlos en un ultracongelador a -80 °C hasta su utilización.

Para el cultivo nocturno a partir del criovial, se raspó un fragmento de hielo e inoculó en el medio nutritivo (Oxoid No. 2). Nota: El criovial debe abrirse sólo en circunstancias necesarias. Cuando se ha abierto de 5 a 10 veces es preferible desecharlo y usar uno nuevo.

3.4.3.2. Reserva en placa o placa máster

A partir del cultivo nocturno, se inoculan las bacterias por estría en placas con agar enriquecido + ampicilina. Se incubaron a 37 °C, 48 h. Una vez fuera de la incubadora se dejaron enfriar, se voltearon las cajas para evitar la condensación del vapor de agua sobre el medio, y se almacenaron envueltas en aluminio bajo refrigeración.

3.4.4. Verificación de la cepa *Salmonella typhimurium* TA98

La verificación se realiza por medio de los controles positivos y AFB₁. Para verificar el comportamiento de la cepa TA98 se prepararon 108 placas de medio mínimo de glucosa, 30 tubos con 1.3 mL, 30 tubos con 1.8 mL y 3 tubos con 1.9 mL de top agar.

En el tubo que contenía agar de superficie se mezclaron 100 μL de la bacteria TA98, 100 μL del control mutágeno ó de la AFB₁, disueltos en DMSO y 500 μL del extracto microsomal S9. El tubo se homogeneizó en un vortex y se vertió sobre las placas de medio mínimo. Se dejaron solidificar, se invirtieron e incubaron por 48 horas a 37 °C. Posteriormente se contaron las colonias revertidas en cada caja. Cada experimento se realizó por triplicado. En la **Tabla 8** se muestran los controles usados para la prueba de mutagenicidad con la cepa de *Salmonella typhimurium* TA98.

Tabla 8. Verificación de la cepa TA98 con controles de mutagenicidad.

Controles
Testigo negativo de mutagenicidad: 1.9 mL de agar de superficie +100 μL del cultivo nocturno de TA98.
Testigo positivo de mutagenicidad sin activación metabólica: 1.8 mL de agar de superficie +100 μL 2-aminofluoreno +100 μL del cultivo nocturno de TA98.
Testigo positivo de mutagenicidad con activación metabólica: 1.3 mL de agar de superficie +100 μL 2-aminofluoreno +100 μL del cultivo nocturno de TA98 + 500 μL de S9.
Testigo positivo de mutagenicidad sin activación metabólica: 1.8 mL de agar de superficie +100 μL benzo(a)pireno +100 μL del cultivo nocturno de TA98.
Testigo positivo de mutagenicidad con activación metabólica: 1.3 mL de agar de superficie +100 μL benzo(a)pireno +100 μL del cultivo nocturno de TA98 + 500 μL de S9.
Tratamientos directos sin activación metabólica
Tratamiento directo sin activación metabólica: 1.8 mL de agar de superficie +100 μL AFB ₁ (10 $\mu\text{g mL}^{-1}$) + 100 μL TA98.
Tratamiento directo sin activación metabólica: 1.8 mL de agar de superficie +100 μL AFB ₁ (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) + 100 μL TA98.
Tratamiento directo sin activación metabólica: 1.8 mL de agar de superficie + 100 μL AFB ₁ (500 $\mu\text{g mL}^{-1}$) + 100 μL TA98.
Tratamientos con activación metabólica
Tratamiento con activación metabólica: 1.3 mL de agar de superficie +100 μL AFB ₁ (10 $\mu\text{g mL}^{-1}$) + 100 μL TA98+ 500 μL S9.
Tratamiento con activación metabólica: 1.3 mL de agar de superficie +100 μL AFB ₁ (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) + 100 μL TA98+ 500 μL S9.
Tratamiento con activación metabólica: 1.3 mL de agar de superficie +100 μL AFB ₁ (500 $\mu\text{g mL}^{-1}$) + 100 μL TA98+ 500 μL S9.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Muestreo y encuestas

Los resultados de los cuatro muestreos con un total de 784 kg de tortillas correspondientes a las 392 muestras se presentan a continuación. Primero se presentan los resúmenes de las encuestas de cada muestreo, la **Tabla 9** corresponde al resumen del primer muestreo (secas de 2006) y los datos completos están en el **Anexo 1**.

Tabla 9. Resumen de resultados de las encuestas del primer muestreo (secas 2006).

N° muestra / lugar	Masa /Harina/ Mezcla	Proporción de la mezcla	Masa propia /comprada	Color de maíz: blanco, amarillo, azul	Origen del maíz	Venta kg/día
1-7. Iztapalapa.	4 Harina Maseca; 2 masa y uno mezcla.	4 Sólo harina; uno sin datos; uno Maseca/ Masa 5:50 kg	4 Sin datos; 2 compradas; uno propia	3 Sin datos; 2 blancos; 2 amarillos	3 Sin datos; 2 Sin datos; de Estados; Sinaloa	3 Sin datos; 225; 250; 300; 500
8-13. G.A. Madero	3 Harina Maseca; 3 masa	3 Sólo harina; 3 sin datos	3 Sin datos; 2 compradas; una propia.	4 Blancos; uno amarillo; uno blanco/amarillo	6 Sin datos	130; 200; 200-250; 320; 420; 1120
14-19. A. Obregón.	2 Harina Maseca; una harina Minsa; 2 masa; 1 mezcla	5 Sin datos; masa/ Maseca 50:10 kg	3 Sin datos; 3 compradas	5 Blancos; 1 amarillo	5 Sin datos; uno Toluca	2 Sin datos; 80; 150-200; 400; 500-600
20-25. Coyoacán.	2 Mezcla; 2 Harina Maseca; 2 masa	4 Sin datos; Masa/ Minsa 3:1; ¼ Masa por ¼ Minsa	2 Sin datos; 2 compradas; 2 propias	4 Blancos; 2 amarillos	5 Sin datos; Fortimex, Puebla	100; 110; 150-250; dos 250-300; 600.
26-31. Tlalpan.	2 Harina Maseca; 3 mezcla; harina Minsa.	3 Sin datos; masa/ Maseca 50:10 kg; 2 masa/ Minsa 50:50 kg	3 Sin datos; 3 compradas	3 Blancos; 3 amarillos	6 Sin datos.	180; 180-200; dos 250; 300; 325
32-37. Cuauhtémoc	2 Harina Maseca; mezcla; 3 Masa.	100% Maseca; masa/ Maseca 25:10 kg; 4 sin datos.	2 Sin datos; 3 compradas; propia.	5 Blancos; Sin datos	6 Sin datos	Sin datos; 390; 250-300; 275; 350-400; 400; 750
38-44. V. Carranza	3 Harina Maseca; 4 masa	7 Sin datos	3 Sin datos; 4 compradas.	1 Amarillo; 6 blancos.	6 Sin datos, Estados.	Sin datos; 200; 200-300; 250; 270-350; 350
45-50. Azcapotzalco	3 Harina Maseca; 3 masa	6 Sin datos	3 Sin datos; 2 propias; una comprada	6 Blancos	4 Sin datos; Sinaloa; Tlanepantla	2 Sin datos; 100; 200; 250; 500-550
1-56. Iztacalco.	Harina Maseca; harina Minsa; 3 mezcla; masa	3 Sin datos; masa/ Maseca 75:25 kg; masa/ Maseca 50:5 kg; masa/ Agroinsa 50:25 kg.	2 Sin datos; 3 compradas; una propia.	3 Amarillos; 3 blancos.	6 Sin datos	2 Sin datos; tres 200; 250.
57-62. Xochimilco.	6 Masa	6 Sin datos	4 Compradas; 2 propias.	2 Sin datos; 3 blancos; blanco, amarillo	4 Sin datos; Edo. México; Sinaloa	Sin datos; 50; 150-170; 250; 300; 350-400
63-68. B. Juárez.	3 Harina Maseca; 3 masa	6 Sin datos.	3 Sin datos; 3 compradas.	Sin datos; 4 blancos; blanco, amarillo	5 Sin datos; Tlanepantla	150; 200; 250-300; 300-350; 450-500; 800.
69-74. M.Hidalgo	2 Harina Minsa; harina Maseca; mezcla; 2 masa	5 sin datos 1 mezcla Masa/ Minsa 25:3 kg	2 Compradas; propia; 3 sin datos.	3 Sin datos; 3 blancos	4 Sin datos; Oaxaca; Sinaloa	Sin datos; 150; dos 500; 672; 1500
75-80. Tláhuac.	5 Masa; sin datos.	6 No dieron datos	3 Compradas; 2 propias; sin datos.	Sin datos; 3 blanco; 2 amarillo.	2 Sin datos; sin datos; 2 Sinaloa; Bajío	Sin datos; 100-150; 280; 300-350; dos 500.
81-86. La Contreras	M Harina Maseca; 4 masa; mezcla	5 Sin datos; Masa/Minsa 2:1 kg	Sin datos; 3 compradas; 2 propias.	5 Blancos; 1 amarillo	4 Sin datos Portimex; Cargill Gto/ Sinaloa	Sin datos; 150; 250; 250-300; 350; 600
87-92. Cuajimalpa.	Harina Maseca; 2 harina Minsa; 2 masa; mezcla	5 Sin datos; Masa/ Maseca 90:10 kg	3 Sin datos; 3 compradas.	6 Blancos	5 Sin datos; sin datos	Sin datos; dos 350; 350-370; 470; 700.
93-98. Milpa Alta	5 Masa; mezcla	5 Sin datos; 1 mezcla Masa/ Maseca 50:10 kg	3 Propias; 3 compradas.	Criollo; 4 blancos; azul	2 De la región; Sonora; Sin datos; Morelos; sin datos.	2 Sin datos; 80-200; 200; 450; 800

El resumen de los resultados de los cuestionarios aplicados al segundo muestreo (lluvias de 2006) se presentan en la **Tabla 10**, los datos completos están en el **Anexo 1**.

Tabla 10. Resumen de resultados de las encuestas del segundo muestreo (lluvias 2006).

N° de Muestra, lugar	Masa /Harina/ Mezcla	Proporción de la mezcla	Masa propia / comprada	Color de maíz=blanco, amarillo, azul	Origen del maíz	Venta kg/día
1-7. Iztapalapa	4 Harina Maseca; 2 masa; mezcla.	6 Sin datos; masa/ Agroinsa 50:6kg	5 Sin datos; comprada; propia	4 Amarillas;3 Blancos.	3 Sin datos; 3 de Estados; Guanajuato	450-500; 550; 500-600; 600; 650-675; 690;750.
8-13. Gustavo Madero. A.	3 Harina Maseca; 3 masa.	6 Sin datos.	3 Sin datos; 3 compradas.	3 Sin datos; 2 blancos; amarillo	2 Sin datos; 4 Sin datos.	Sin datos;125; 200; 300; 450; 1500.
14-19. Álvaro. Obregón	2 Harina Maseca; harina Minsa;3 masa.	6 Sin datos.	3 Sin datos; 2 compradas; propia.	4 Blancos; 2 amarillos.	4 Sin datos; Sonora;Sinaloa.	2 Sin datos; 250; 320-350;400;450.
20-25. Coyoacán.	Harina Minsa; 2 harina Maseca; 2 masa;mezcla.	5 Sin datos;masa/ Minsa 50:10 kg	3 Sin datos; 2 propias; comprada.	4 Blancos; 2 amarillos.	6 Sin datos.	175-250; 300; 370; 380; 450; 680
26-31. Tlalpan	2 Harina Maseca; harina Minsa;2 mezcla; masa.	4 Sin datos; masa/ Minsa 25:5 kg; masa/ Maseca 50:5 kg	3 Sin datos; 3 compradas.	5 Amarillos; blanco.	6 Sin datos.	175-200;250; 300; dos 350;350-375.
32-37. Cuauhtémoc.	3 Harina Maseca; mezcla; 2 masa	6 Sin datos.	3 Sin datos; 2 compradas; propia.	2 Sin datos; 4 blancos.	3 Sin datos; 3 Sin datos.	2 Sin datos; Tres 300; 600
38-44. Venustiano Carranza	Sin datos; 2 harina Maseca; 3 masa; mezcla.	7 Sin datos.	5 Sin datos; 3 compradas.	5 Sin datos; 3 blancos.	7 Sin datos.	7 Sin datos
45-50. Azcapotzalco.	2 Harina Maseca; harina Minsa; 2 masa;mezcla.	5 Sin datos; 70 kg masa por 5 kg de harina	3 Sin datos; 2 compradas; propia.	3 Sin datos; amarillo; 2 blancos.	3 Sin datos; 3 Sin datos.	5 Sin datos; 150-200
51-56. Iztacalco.	2 Harina Maseca; 4 mezcla.	2 Sin datos; 3 masa/Maseca 50:5 kg; masa/ Minsa.	2 Sin datos; 4 compradas.	4 amarillos; 2 blancos.	6 Sin datos.	Sin datos; 300; 350-375;380; 350-400;450.
57-62. Xochimilco.	6 Masa	6 Sin datos.	5 Compradas; propia.	3 Blancos; 3 amarillos.	5 Sin datos; Sinaloa	Sin datos; 270; 270-300; dos 350;370.
63-68. Benito Juárez.	3 Harina Maseca; 3 masa.	6 Sin datos.	3 Sin datos; 3 compradas.	3 Amarillos; 2 blancos;Sin datos.	5 Sin datos; Edo. Mex	250; 250-300; 320-380; 360; 800; 900.
69-74. Miguel Hidalgo.	2 Harina Minsa; harina Maseca; mezcla; 2 masa.	5 Sin datos; masa/ Maseca 50:20 kg.	3 Sin datos; comprada; 2 propias.	5 Blancos; sin datos.	4 Sin datos; sin datos; Sonora.	Sin datos;245;400; 440;500; 600.
75-80. Tláhuac	4 Masa; 2 mezcla.	4 Sin datos; masa/Maseca 50:5 kg; masa/ Maseca sin datos	5 Compradas; propia.	4 Blancos; 2 amarillos.	3 Sin datos; 2 Cargill; Sinaloa.	270;300;350; 400; 600;1500.
81-86. La Magdalena Contreras.	Harina Maseca; 3 masa; 2 mezcla.	4 Sin datos; 2 Masa/Maseca 50:5 kg.	2 Sin datos; 3 compradas; propia.	4 blancos; 2 amarillos.	4 Sin datos; Cargill; Sinaloa/ Gto.	250; 280-300; 350-370;380; 350-450;1000.
87-92. Cuajimalpa	3 Harina Maseca; 2 masa;mezcla.	5 Sin datos; masa/Maseca sin datos.	3 Sin datos; 3 compradas.	3 Blancos; 3 amarillos.	5 Sin datos; Cargill.	350-400; 350-450;dos 400; 750;750-800.
93-98. Milpa Alta.	4 Masa; 2 mezcla.	4 Sin datos; masa/Maseca 50:10 kg; masa/ Maseca 50:7 kg.	3 Propias; 3 compradas.	4 Blanco; Amarillo;azul.	3 Sin datos; sin datos;Sonora; Morelos.	Sin datos; 150; 350-400; dos 450; 750.

El resumen de los resultados de los cuestionarios aplicados al tercer muestreo (secas de 2007) se presentan en la **Tabla 11**, los datos completos están en el **Anexo 1**.

Tabla 11. Resumen de resultados de las encuestas del tercer muestreo (secas 2007).

N° de Muestra, lugar	Masa /Harina/ Mezcla	Proporción de la mezcla	Masa propia / comprada	Color de maíz=blanco, amarillo, azul	Origen del maíz	Venta kg/día
1 - 7. Iztapalapa.	4 Harina Maseca; 2 masa y 1 mezcla	6 Sin datos; 1 de Masa/ Agroinsa 50:5 kg.	4 Sin datos; 1 propia; 2 compradas.	4 de Blanco;3 Amarillos	6 de Estados; 1 de Sinaloa	650-750; 630; 670; 500; 400-450; 380; 350.
8- 13. Gustavo A. Madero	3 Harina Maseca; 3 masa.	6 Sin datos.	3 Sin datos; 3 compradas.	3 Amarillos; 3 blancos.	3 de Estados; 3 Sin datos.	650; 250;350;170; 150; 390-400.
14-19. Alvaro Obregón	2 Harina Maseca; 4 masa.	6 Sin datos.	5 Sin datos; 1 propia.	3 Blancos; 3 sin datos.	1 de Estados; 4 Sin datos; 1 Sinaloa	2 de 350; 4 sin datos.
20-25. Coyoacán.	1 de Harina Minsa; 2 harina Maseca; 2 masa; 1 mezcla.	5 Sin datos; 1 masa/Minsa 50:10 kg.	3 Sin datos; 1 propia; 2 compradas.	1 Sin datos; 4 blancos; 1 amarillo.	1 Sin datos; 5 Estados.	Sin datos; 430;670; 550;370;450-500.
26-31. Tlalpan	2 Harina Maseca; 1 harina sin datos; 3 mezcla.	4 Sin datos; 2 masa/ Maseca 50:5 kg.	3 Sin datos; 3 compradas.	3 Blancos; 1 sin datos; 2 amarillos.	5 Estados; 1 sin datos.	450; sin datos; 2 de 470; 370; 630.
32-37. Cuauhtémoc.	3 Harina Maseca; 3 masa.	6 Sin datos.	6 Sin datos.	6 Sin datos.	6 Sin datos	6 Sin datos
38-44. Venustiano Carranza	3 Harina Maseca; 3 masa; 1 mezcla.	6 Sin datos; masa/ Maseca 50:3 kg.	3 Sin datos; 4 compradas.	4 Blancos; 1 sin datos; 2 amarillos.	4 de Estados; 3 sin datos.	550; 500-550; sin datos; 390; 270-300; 370-400; 350.
45-50. Azcapotzalco.	3 Harina Maseca; 3 masa.	6 Sin datos.	3 Sin datos; 3 compradas.	4 Blancos; 2 amarillos.	5 Estados; 1 Sin datos.	250; 650; 450; 300-350; 380; 300-370.
51-56. Iztacalco.	1 Harina Maseca; 1 harina Minsa; 4 mezcla.	2 Sin datos; masa/ Maseca 50:7 kg; masa/Maseca 50:5 kg; masa/Agroinsa 50:5 kg; masa/ Minsa	2 Sin datos; 4 compradas.	3 Amarillos; 3 blancos.	3 Estados; 3 Sin datos.	370; 450-500; 260; 450; 350-400; sin datos.
57-62. Xochimilco.	6 Masa.	6 Sin datos.	5 Compradas; 1propia.	3 Blancos; 4 amarillos.	5 Sin datos; 1 Sinaloa	350; 270-300; 270; 350; 370; sin datos
63-68. Benito Juárez.	3 Harina Maseca; 3 masa.	6 Sin datos.	3 Sin datos; 3 comprada.	3 Amarillo; 2 Blanco; Sin datos.	5 Sin datos; 1 Edo. Mex	900; 800; 360; 250-300; 320-380; 250.
69-74. Miguel Hidalgo.	2 Harina Minsa; 1 harina Maseca; 1 mezcla; 2 masa.	5 Sin datos; Masa/ Maseca 50:20 kg.	3 Sin datos; 1 comprada; 2 propias.	5 Blancos; 1 sin datos.	4 Sin datos; 1 sin datos; 1 Sonora.	440; sin datos; 245; 400; 500; 600.
75 - 80. Tláhuac	4 Masa; 2 mezcla.	4 Sin datos; masa/Maseca 50:5 kg; masa/ Maseca sin datos.	5 Compradas 1 propia.	4 Blancos; 2 amarillos.	3 Sin datos; 2 Cargill; 1 Sinaloa.	600; 400; 270; 350; 1500; 300.
81-86. La Magdalena Contreras	1 Harina Maseca; 3 masa; 2 mezcla.	4 Sin datos; 2 masa/Maseca 50:5 kg.	2 Sin datos; 3 compradas; 1 propia.	4 Blancos; 2 amarillos.	4 Sin datos; 1 Cargill; sin datos/ Guanajuato.	250; 350-370; 280-300; 350-450; 1000; 380.
87-92. Cuajimalpa	3 Harina Maseca; 2 masa; 1 mezcla.	5 Sin datos; masa/Maseca.	3 Sin datos; 3 compradas.	3 Blancos; 3 amarillos.	5 Sin datos; 1 Cargill.	350-400; 750; 350-450; 750-800; 2 de 400.
93-98. Milpa Alta.	4 Masa; 2 mezcla.	4 Sin datos; 1 masa/Maseca 50:10 kg; 1 masa/Maseca 50:7 kg.	3 propias; 3 compradas.	4 Blancos; 1 amarillo; 1 azul.	4 Sin datos; 1 Sonora; 1 Morelos.	Sin datos; 750; 2 de 450;150; 350-400.

El resumen de los resultados de los cuestionarios aplicados al cuarto muestreo (lluvias de 2007) se presentan en la **Tabla 12**, los datos completos están en el **Anexo 1**.

Tabla 12. Resumen de las encuestas del cuarto muestreo (lluvias 2007).

N° de Muestra, lugar	Masa /Harina/ Mezcla	Proporción de la mezcla	Masa propia/ Comprada	Color de maíz=blanco amarillo, azul	Origen del maíz	Venta kg/día
1-7. Iztapalapa	4 Harina Maseca; 2 masa; 1 mezcla.	6 Sin datos; 1 a masa/Agroinsa 50:6 kg.	4 Sin datos; 2 compradas; 1 propia.	4 Blanco; 2 amarillos; 1 sin datos.	4 Sin datos; 1 sin datos; 1 Estados; 1 Sinaloa	200; 2 sin datos; 700; 2 de 250; 350.
8-13. Gustavo A. Madero	2 Harina Maseca; 1 harina Minsa; 3 masa.	6 Sin datos.	3 Sin datos; 3 compradas.	2 Blanco; 4 amarillos.	5 Estados; 1 Edo. Mex.	200; 300; 2 de 250; 450; 600.
14-19. Álvaro Obregón	1 Harina Minsa; 2 harina Maseca; 3 masa.	6 Sin datos.	3 Sin datos; 3 propias.	2 Sin datos; 2 amarillos; 2 blancos.	2 Sin datos; 2 Estados; Michoacán; Sinaloa.	150; 2 sin datos; 2 de 300; 350.
20-25. Coyoacán.	Harina Minsa; 2 harina Maseca; 2 masa; mezcla	5 Sin datos; masa/Minsa 50:5.	3 Sin datos; 2 propias y compradas.	Sin datos; 3 blancos; azul; amarillo.	Sin datos; 4 de Estados; Puebla.	Sin datos; 2 de 150; 300; 375; 600.
26-31 Tlalpan	Harina Maseca; harina sin datos; harina Maseca Premium; 2 mezcla; masa.	4 Sin datos; masa/Maseca 50:5; masa/ Minsa 50:7 kg.	3 Sin datos; propia; 2 compradas.	3 Sin datos; 3 amarillos.	3 Sin datos; 3 Estados	3 Sin datos; 100; 200; 300
32-37. Cuauhtémoc.	3 Harina Maseca; 3 masa.	6 Sin datos.	3 Sin datos; 2 comprada; 1 propia.	4 Blancos; 2 amarillos.	5 Estados; 1 Sin datos.	6 Sin datos.
38-44. Venustiano Carranza	3 Harina Maseca; 3 masa; 1 mezcla.	6 Sin datos; 1 masa/Maseca 50:5 kg	3 Sin datos; 3 compradas; 1 propia.	4 Blancos; 3 amarillos.	5 Estados; 1 Guanajuato; 1 Sinaloa.	2 Sin datos; 100; 120; 250; 270; 350.
45-50. Azcapotzalco.	3 Harina; 3 masa Maseca (Premium)	6 Sin datos	4 Sin datos; 2 propias.	3 Blancos; 1 amarillo; sin datos; Sin datos.	4 Estados; sin datos; Puebla.	2 Sin datos; 150; 200; 290; 600
51-56. Iztacalco.	2 Harina Minsa; 3 mezcla, 1 masa.	3 Sin datos; masa/ Maseca 50:7; masa/ Agroinsa; masa/Minsa	2 Sin datos; 3 compradas, 1 propia.	4 Amarillos; 2 blancos.	3 Estados; 3 Sin datos.	350, 170; 300; 350; sin dato; Sin datos.
57-62. Xochimilco.	6 Masa	6 Sin datos.	5 Compradas; 1 propia.	1 Amarillo y blanco; 3 blancos; 2 amarillos.	4 Estados; 2 Sin datos.	2 de 200; 120; 130; 250; 300.
63-68. Benito Juárez.	3 Harina Maseca; 3 masa.	6 Sin datos.	3 Sin datos; 3 compradas.	2 Blanco; 1 Sin datos; 1 sin datos; 2 amarillos.	4 Estados; 1 sin datos; 1 Sin datos;	250; 270; 600; 650; sin datos; Sin datos.
69-74. Miguel Hidalgo.	2 Harina Minsa; harina (Maseca Premium); mezcla; 2 masa.	5 Sin datos; masa/Maseca 50:6.	3 Sin datos; 3 compradas.	2 amarillos; 3 blancos; amarillo/blanco	3 Estados; Sin datos; Jalisco; Puebla.	150; 200; 300; 400; 500; 600.
75-80. Tláhuac	6 Masa.	6 Sin datos.	2 Propias; 3 compradas; 1 sin datos.	4 Amarillos; 1 blanco; 1 sin datos.	2 Sin datos; 1 Sin datos; 1 Estados; 1 Sinaloa; 1 Zapotitlán.	Sin datos; sin datos; 250; 300; 320; 500.
81-86. La Magdalena Contreras.	Harina (Maseca Premium); 4 masa; mezcla.	5 Sin datos; masa/Maseca 50:5	Sin datos; 4 propias; comprada.	Sin datos; 3 blanco; 2 amarillo.	Sin datos; 3 Sin datos; Importimex; Sinaloa y Guanajuato.	Sin datos; 100; 300; 600; dos de 1000.
87-92. Cuajimalpa	2 Harina Maseca; 1 harina Minsa; 3 masa.	6 Sin datos.	3 Sin datos; 3 compradas.	4 Amarillos; 1 blanco; 1 sin datos.	3 Sin datos; 1 sin datos; 2 Estados.	2 Sin datos; 1 sin datos; 150; 170; 250.
93-98. Milpa Alta	6 Masa.	6 Sin datos.	5 Propias; 1 comprada.	4 Blanco; 1 amarillo; 1 azul.	2 Sin datos; 1 Estado; 1 Jalisco; 1 Morelos; 1 Sinaloa.	2 de 120; 2 de 200; 250; 700.

Las siguientes figuras muestran los resultados de las encuestas aplicadas a la venta (**Figura 13**), materia prima (**Figura 14**), participación de las principales harineras (**Figura 15**), origen de la masa (**Figura 16**), tipo de maíz usado (**Figura 17**) y la procedencia del maíz (**Figura 18**) de las tortillas en los cuatro muestreos (secas y lluvias 2006, secas y lluvias 2007).

La **Figura 13**, muestra la venta de tortillas por cada Delegación según las encuestas aplicadas. La gráfica muestra el comparativo de los cuatro muestreos y una tendencia a una menor venta de tortillas en los dos muestreos de 2007.

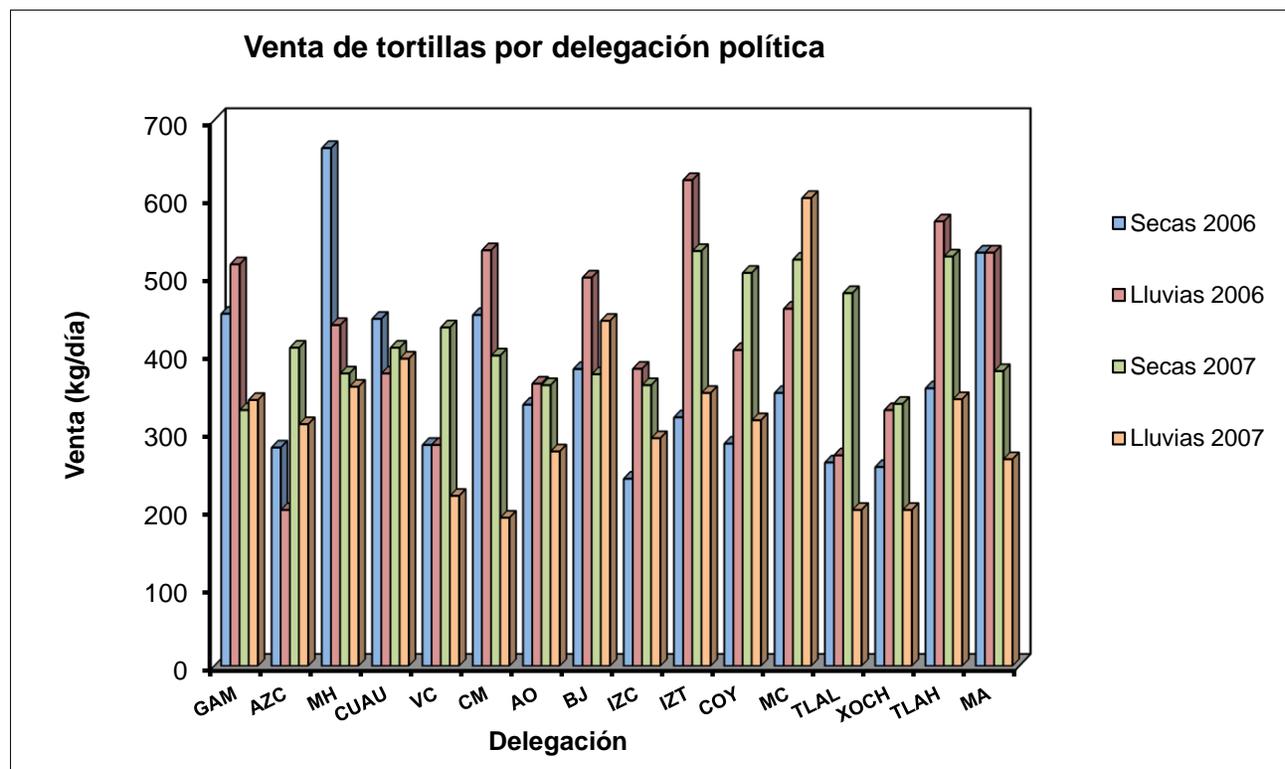


Figura 13. Venta de tortillas por delegación.

GAM = Gustavo A. Madero; AO = Álvaro Obregón; COY = Coyoacán; Tlal =Tlalpan; CUAU = Cuauhtémoc; VC = Venustiano Carranza; AZC = Azcapotzalco; IZC = Iztacalco; XOCH = Xochimilco; BJ = Benito Juárez; MH = Miguel Hidalgo; TLAH = Tláhuac; MC = La Magdalena Contreras; MA = Milpa Alta; IZT = Iztapalapa.

En la **Figura 14** se muestra que la materia prima “masa” es más utilizada para la elaboración de las tortillas. Sin embargo, muchas de las tortillerías que declararon que las tortillas eran de masa, tenían en el local sacos de harina nixtamalizada. La harina más empleada para la producción de tortillas es Maseca. Esta harina se utiliza en los supermercados en donde las tortillas se producen exclusivamente de harina nixtamalizada. Pero también, se emplea en mezcla con la masa en las tortillerías. A decir de los encargados de los expendios, se utiliza la harina para mejorar la textura de la tortilla y para reducir los costos de producción.

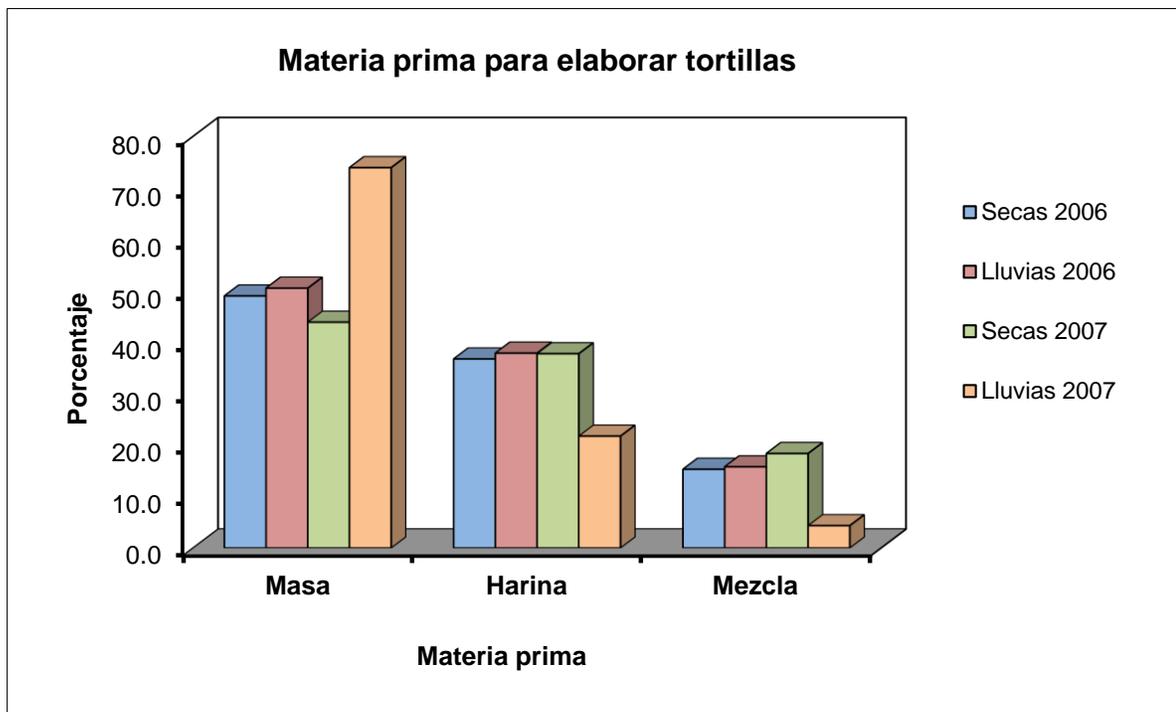


Figura 14. Porcentaje de materia prima para elaboración de tortillas.

La participación de la harina Maseca en el mercado fue de casi el 80% (**Figura 15**), esta es la marca de la harina utilizada en los supermercados de las cadenas Comercial Mexicana y Walmart.

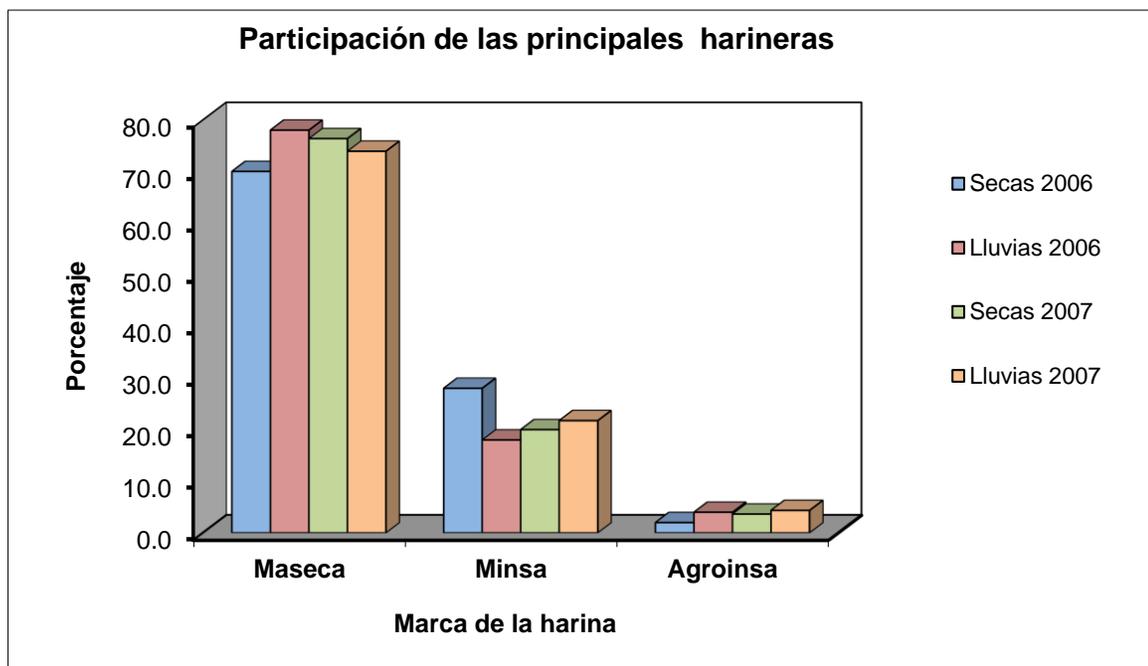


Figura 15. Participación de las harineras en el mercado en épocas de secas y lluvias de 2006 y 2007.

En cuanto al origen de la masa (**Figura 16**), casi el 60% de los tortilleros adquieren la masa en molinos comerciales y sólo un 40% cuentan con molino propio.

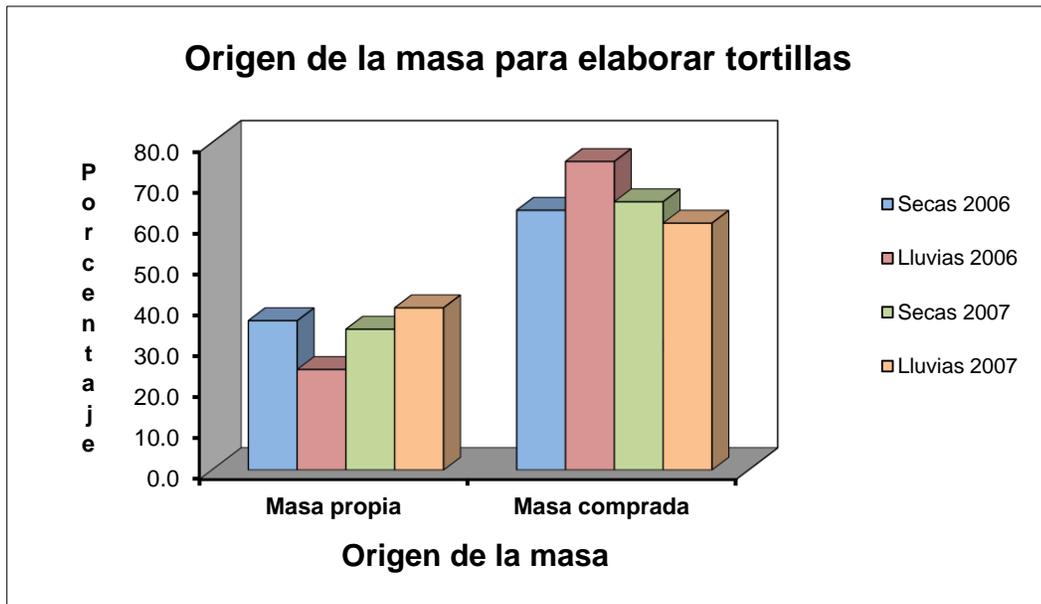


Figura 16. Origen de la masa en épocas de secas y de lluvias de los años 2006 y 2007.

Respecto al tipo de maíz usado para la manufactura de tortillas y el color del maíz, entre el 65 y 70% de los encuestados identifican al maíz blanco como el tipo más frecuente; un 35% dice que su masa es de maíz amarillo y solamente 1% utiliza maíz azul, el resto no sabe qué tipo de maíz se utiliza para la elaboración de masa o harina (**Figura 17**).

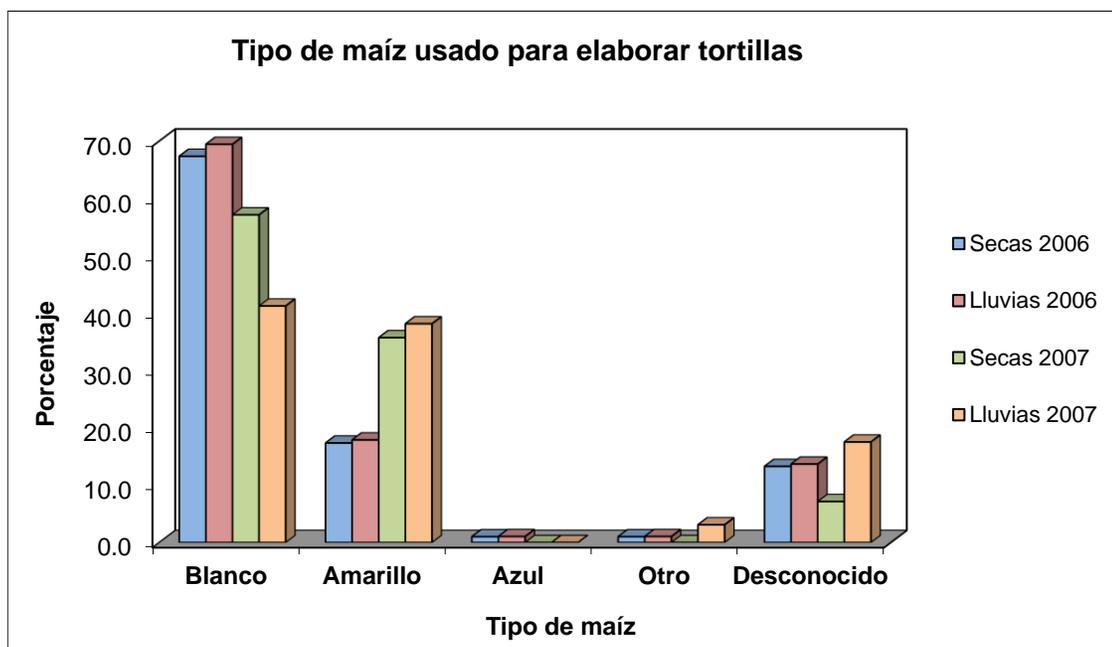


Figura 17. Tipo de maíz empleado para la elaboración de tortillas en el Distrito Federal.

La **Figura 18** muestra la procedencia del maíz para elaborar tortillas. La mayor parte de los encargados de las tortillerías indicaron que el maíz provenía de los Estados, sin embargo, sólo algunos conocían la procedencia del maíz. Los Estados citados fueron Sinaloa, Sonora, Guanajuato y Estado de México.

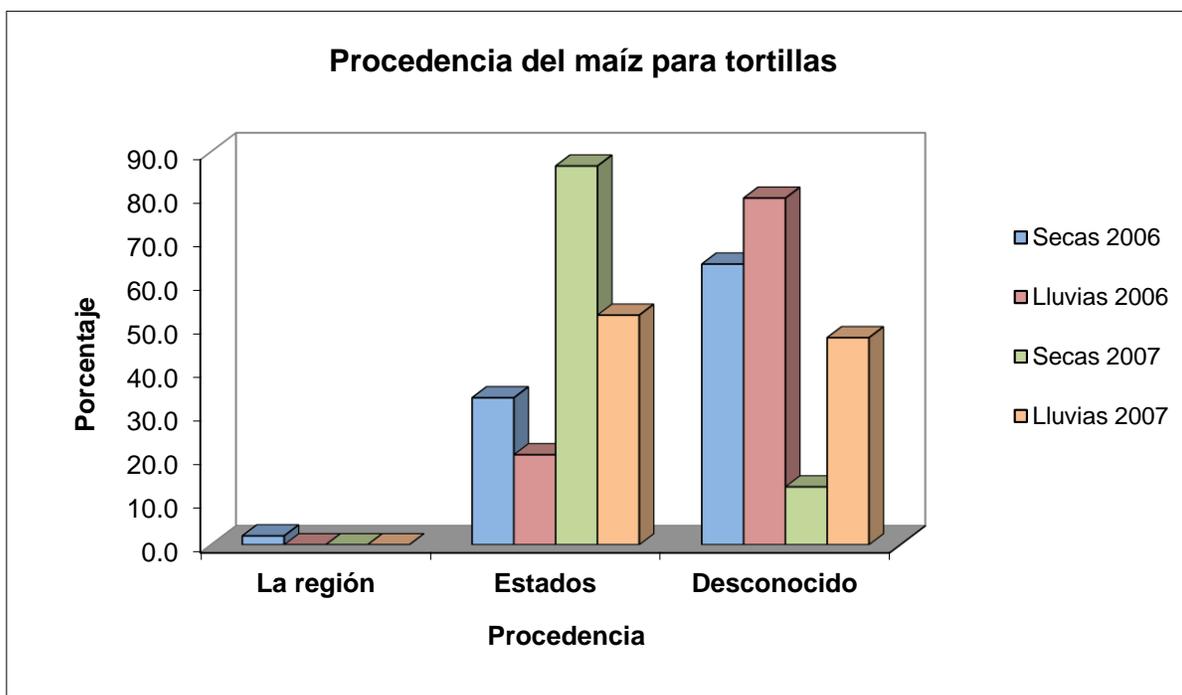


Figura 18. Procedencia del maíz para elaborar tortillas.

4.2. Cálculo del factor de corrección

El factor de corrección obtenido para el espectrofotómetro UV/Vis fue 1.020 y, se calculó como sigue: $FC = [3160/3044.49] = 1.020$. En la **Tabla 13** se muestran los resultados del cálculo del coeficiente de extinción molar obtenido para las disoluciones de $K_2Cr_2O_7$ empleadas para determinar el FC.

Tabla 13. Cálculo del factor de corrección con base en la absorción en UV para soluciones de $K_2Cr_2O_7$.

Solución de dicromato de potasio (mM)	Absorbancia promedio a λ máx (350 nm)	$\epsilon = (Ax1000)/[mM]$
0.0625	0.1898	3037.12
0.125	0.3884	3107.12
0.25	0.7793	3117.24
		ϵ promedio = 3044.49 ± 43.63
		CV= 1.41

Con el valor del FC y el valor del coeficiente de extinción molar (en Benceno:ACN 98:2) para cada una de las AF, se procedió a determinar la concentración real de AF en cada una de las soluciones patrón. La concentración se determinó como sigue:

$$C (\mu\text{g AF mL}^{-1}) = (\text{Abs} \times \text{PM} \times 1000 \times \text{FC})/\varepsilon$$

Para AFB₁

$$(0.60526 \times 312 \text{ mg/mmol} \times 1000 \mu\text{g/mg} \times 1.020)/19800 \text{ mM}^{-1} = 9.76 \mu\text{g AFB}_1 \text{ mL}^{-1}$$

Para AFB₂

$$(0.505 \times 314 \text{ mg/mmol} \times 1000 \mu\text{g/mg} \times 1.020)/20900 \text{ mM}^{-1} = 7.73 \mu\text{g AFB}_2 \text{ mL}^{-1}$$

Para AFG₁

$$(0.155 \times 328 \text{ mg/mmol} \times 1000 \mu\text{g/mg} \times 1.020)/17100 \text{ mM}^{-1} = 3.04 \mu\text{g AFG}_1 \text{ mL}^{-1}$$

Para AFG₂

$$(0.547 \times 330 \text{ mg/mmol} \times 1000 \mu\text{g/mg} \times 1.020)/18200 \text{ mM}^{-1} = 10.11 \mu\text{g AFG}_2 \text{ mL}^{-1}$$

4.3. Curvas de calibración

Las curvas de calibración son la base para toda la cuantificación de las AF y se realizan a partir de concentraciones de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ de las 4 soluciones estándar (AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂) se prepararon las diluciones para obtener la curvas de calibración (2, 5, 10, 20, 30, 50, 100 y 200 ng de cada AF mL⁻¹ en ACN). Las **Figuras 19 A** y **B** muestran dos cromatogramas correspondientes a dos concentraciones de la curva de calibración, las **Figuras 20** a **23** muestran las curvas de calibración de cada AF.

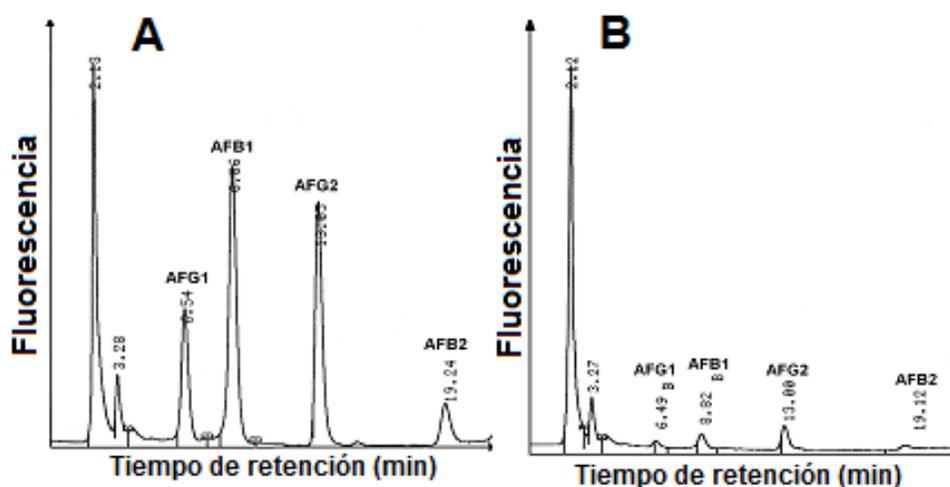


Figura 19. Cromatograma de la mezcla de AF para la curva de calibración A) 200 ng mL^{-1} y B) 20 ng mL^{-1} de AF totales.

Los datos y la curva de calibración de la AFB₁ están en la **Tabla 14** y **Figura 20**.

Tabla 14. Datos de la curva de calibración de AFB₁.

Parámetros	AFB ₁ Concentración (µg kg ⁻¹)						
	2	5	10	20	30	50	100
	4.7	19.6	42.0	84.0	128.0	213.8	430.3
	4.7	19.3	40.1	84.1	128.2	216.7	438.4
	4.6	19.4	41.6	86.2	128.8	215.8	432.6
*Promedio	4.7	19.4	41.2	84.8	128.3	215.4	433.8
Desviación estándar	0.3	0.8	1.0	1.2	0.4	1.5	4.2
% CV **	5.7	3.9	2.4	1.5	0.3	0.7	1.0
Intervalo de confianza	IC(β ₁) = (4.35, 4.39)						
Pendiente	4.37 ± 0.02						
Ordenada al origen	-2.9 ± 0.8						
R ²	0.9999						

** % CV = Desviación estándar / Promedio x 100.

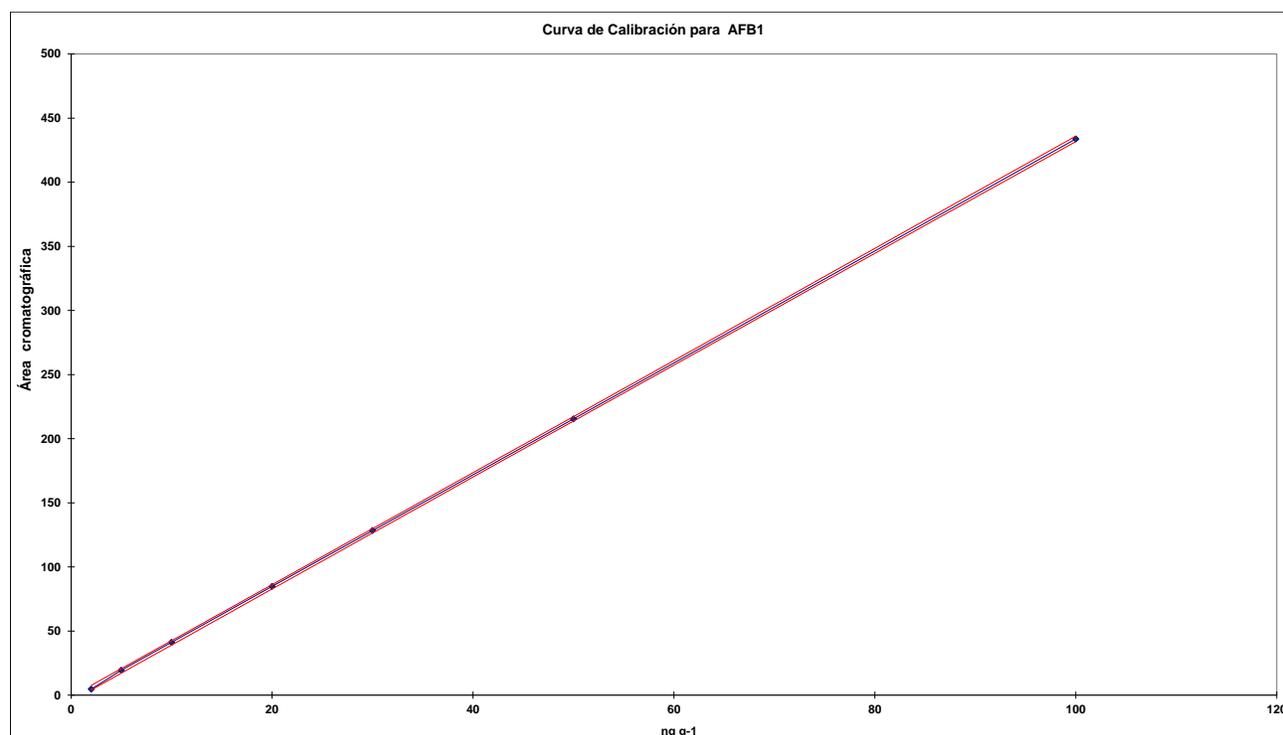


Figura 20. Curva de calibración de AFB₁

Los datos y la curva de calibración de la AFB₂ están en la **Tabla 15** y **Figura 21**.

Tabla 15. Datos de la curva de calibración de AFB₂.

Parámetros	AFB ₂ Concentración (µg kg ⁻¹)						
	2	5	10	20	30	50	100
	21.7	42.6	84.1	166.9	246.8	406.3	805.0
	19.9	42.0	84.0	167.0	247.5	408.0	813.3
	21.1	44.1	82.1	168.1	247.7	419.5	824.0
*Promedio	20.9	42.9	83.4	167.4	247.3	411.3	814.1
Desviación estándar	0.9	1.1	1.1	0.6	0.5	7.2	9.6
% CV	4.5	2.6	1.3	0.4	0.2	1.8	1.2
Intervalo de confianza	IC(β ₁) = (8.07, 8.16)						
Pendiente	8.11245262 ± 0.04						
Ordenada al origen	3.84089722 ± 2.0						
R ²	0.9999						

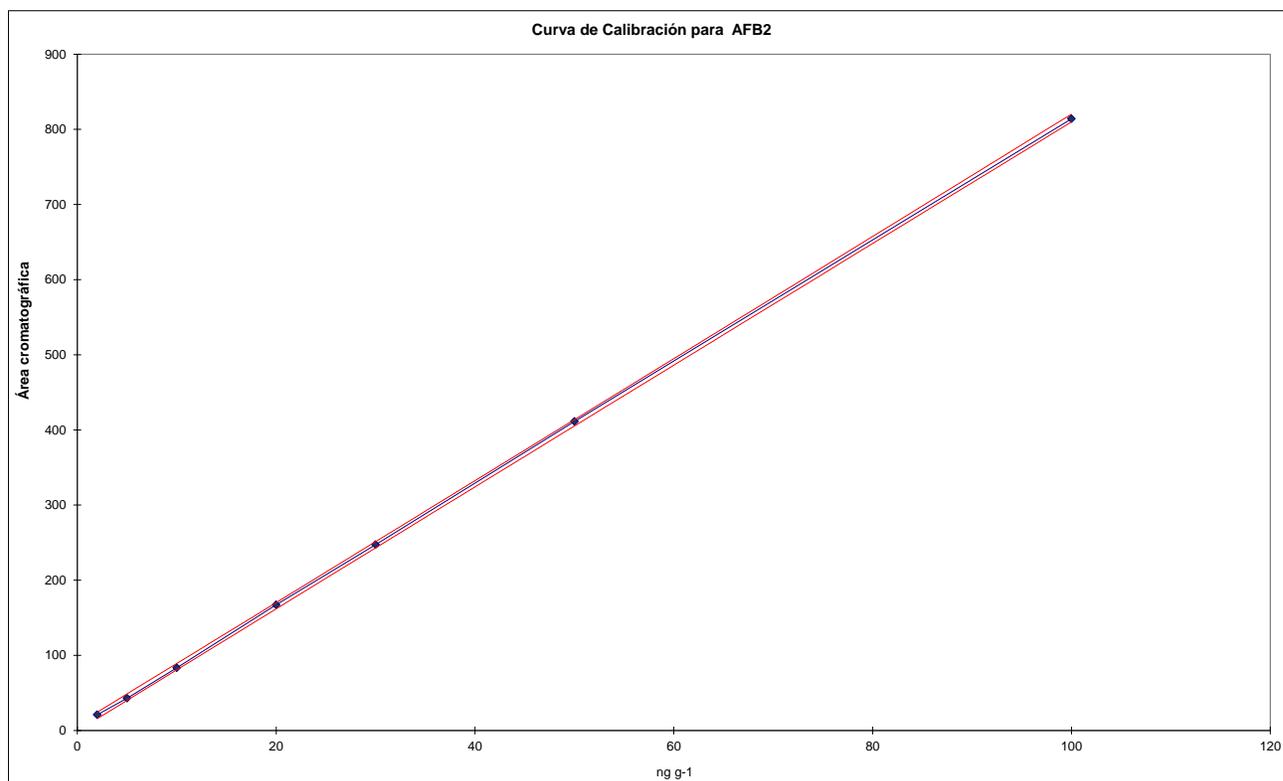


Figura 21. Curva de calibración de AFB₂

Los datos y la curva de calibración de la AFG₁ están en la **Tabla 16** y **Figura 22**.

Tabla 16. Datos de la curva de calibración de AFG₁.

Parámetros	AFG ₁ Concentración (µg kg ⁻¹)						
	2	5	10	20	30	50	100
Área	6.5	19.2	43.8	92.9	145.3	235.7	486.9
	6.0	21.1	47.8	92.7	141.8	240.0	483.1
	6.6	20.4	44.3	96.1	140.6	240.8	482.0
*Promedio	6.4	20.2	45.3	93.9	142.6	238.8	484.0
Desviación estándar	0.3	0.9	2.2	1.9	2.4	2.8	2.6
% CV	5.4	4.6	4.9	2.1	1.7	1.2	0.5
Intervalo de confianza	IC(β ₁) = (4.85, 4.89)						
Pendiente	4.87 ± 0.02						
Ordenada al origen	-3.76 ± 0.82						
R ²	0.9999						

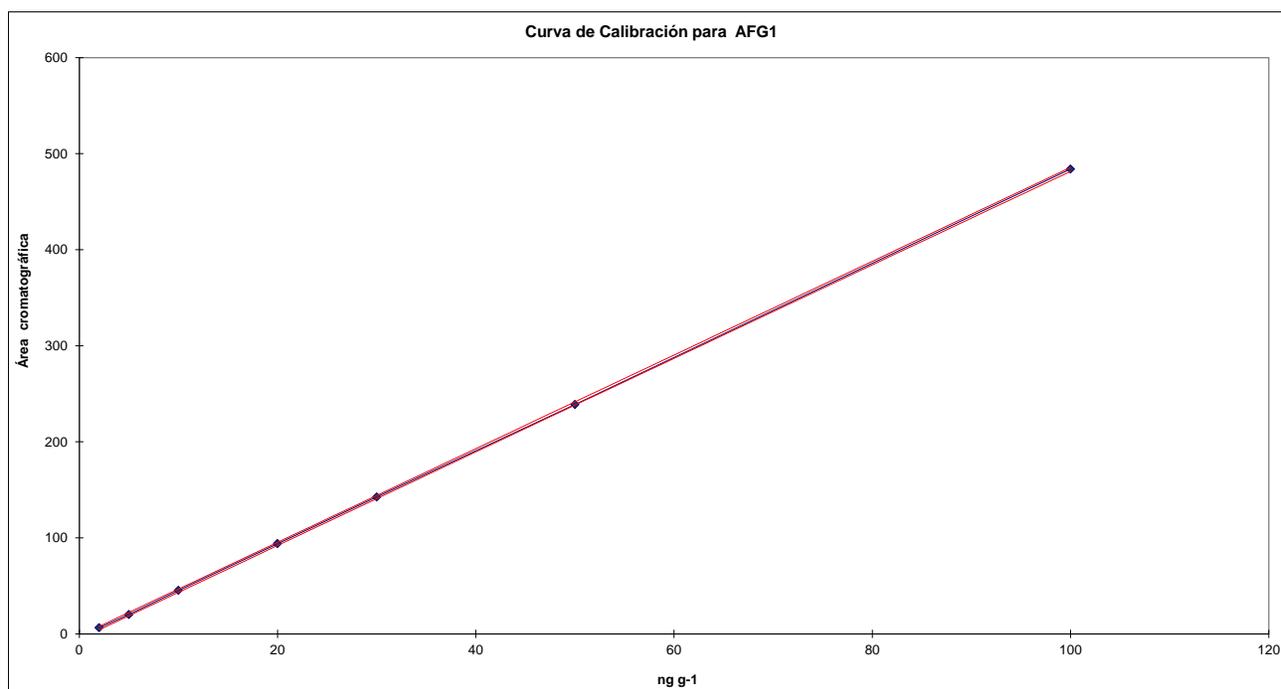


Figura 22. Curva de calibración de AFG₁

Los datos y la curva de calibración de la AFG₂ están en la **Tabla 17** y **Figura 23**.

Tabla 17. Datos de la curva de calibración de AFG₂.

Parámetros	AFG ₂ Concentración (µg kg ⁻¹)						
	2	5	10	20	30	50	100
1	10.8	24.0	46.9	93.0	136.0	224.9	450.9
2	11.3	23.8	47.2	93.0	135.7	227.7	451.4
3	11.9	26.3	49.3	93.3	139.4	231.1	452.2
*Promedio	11.4	24.7	47.8	93.1	137.0	227.9	451.5
Desviación estándar	0.6	1.4	1.3	0.2	2.1	3.1	0.6
% CV	5.1	5.7	2.7	0.2	1.5	1.4	0.1
Intervalo de confianza	IC(β ₁) = (4.48, 4.51)						
Pendiente	4.49 ± 1.02						
Ordenada al origen	2.69 ± 0.7						
R ²	0.9999						

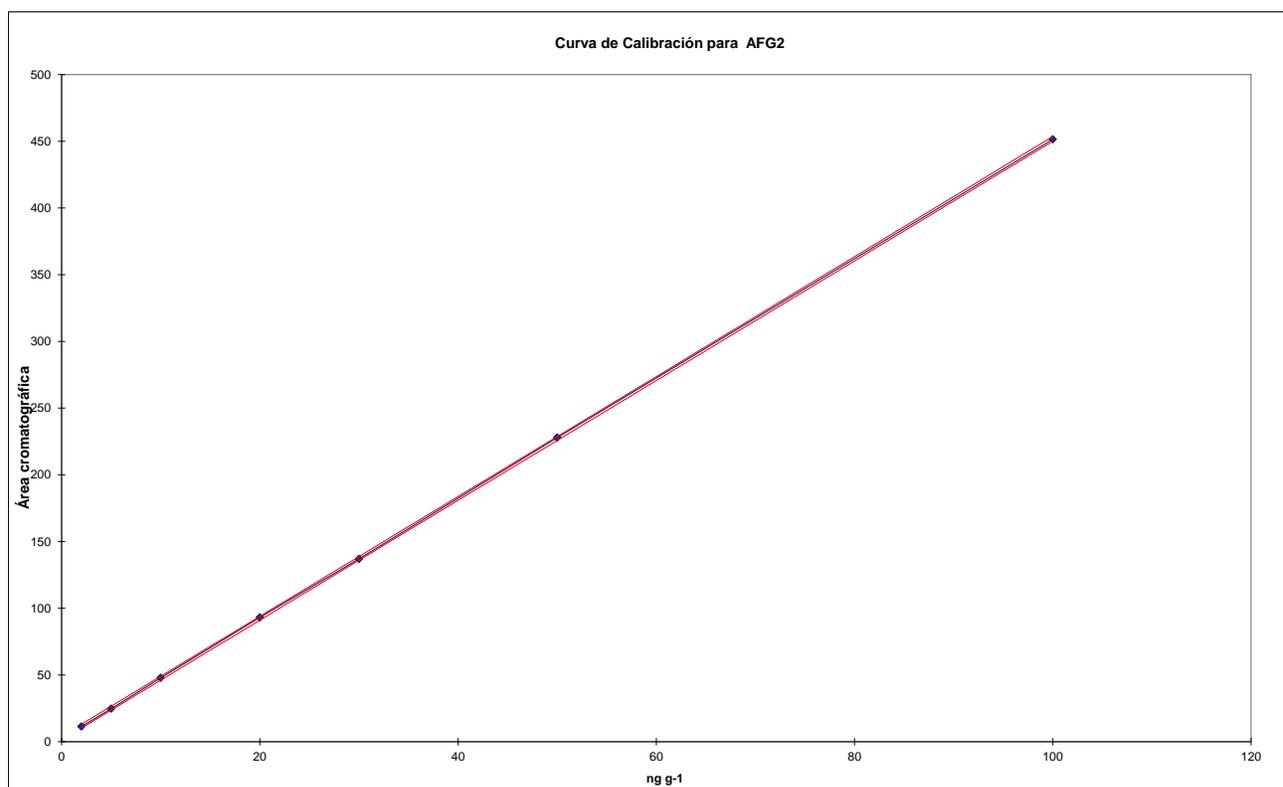


Figura 23. Curva de calibración de AFG₂

4.4. Validación del método

La validación del método es un criterio importante para realizar mediciones confiables y, como se dijo en Materiales y Métodos, se divide en varios parámetros del sistema como son: precisión, linealidad, exactitud y repetibilidad, límites de detección y de cuantificación, cuyos resultados se presentan a continuación.

4.4.1. Precisión del sistema

La precisión del sistema se muestra en la **Tabla 18** a partir de los valores de las áreas cromatográficas obtenidas. Se puede observar que el valor del % CV de los 4 tipos de AF varía de 1.4 a 4.0 que es un rango de valor aceptable, según Horwitz (1982), de acuerdo con las concentraciones que se trabajaron.

Tabla 18. Precisión del sistema.

	Tipos de Aflatoxinas			
	AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂
	Respuesta analítica (Área cromatográfica)			
*Promedio	2.032 ± 0.027	0.728 ± 0.021	0.500 ± 0.018	13.686 ± 0.542
% CV	1.345	2.833	3.510	3.958

4.4.2. Adecuabilidad del sistema

Se calculó el valor del % CV de la respuesta analítica que debe ser ≤ a 2%, se determinaron los parámetros del factor de capacidad (k'), selectividad (α), platos teóricos (N) y resolución (R), para cada una de las inyecciones realizadas. A continuación en la **Tabla 19**, se muestran los datos con los cuales se calculó el coeficiente de variación.

Tabla 19. Porcentaje del coeficiente de variación de la señal analítica para cada una de las aflatoxinas.

No. de repetición	Tipos de Aflatoxinas			
	AFG ₁	AFB ₁	AFG ₂	AFB ₂
	Área cromatográfica			
Promedio	187323 ± 1729	426912 ± 4290	671349 ± 937	124717 ± 2479
% CV	0.92	1.00	0.14	1.99

*Promedio de 5 determinaciones para cada AF

En la **Tabla 20** se muestran los valores obtenidos para los parámetros cromatográficos de cada una de las repeticiones de acuerdo al protocolo de García y Alcántara (2002).

Tabla 20. Valores de los parámetros de adecuabilidad del sistema

Pico	*Tr	Tr'	K'	α	N	R
1	2.05 ± 0.02					
2	3.22 ± 0.01					
AFG ₁	6.69 ± 0.01	4.64 ± 0.02	2.27 ± 0.03	1.53 ± 0.0	1548.13 ± 2.66	16.99 ± 0.07
AFB ₁	9.15 ± 0.01	7.10 ± 0.02	3.80 ± 0.61	1.61 ± 0.01	2896.78 ± 3.65	15.17 ± 3.51
AFG ₂	13.51 ± 0.02	11.46 ± 0.02	5.60 ± 0.05	1.57 ± 0.01	6319.76 ± 16.21	9.21 ± 0.33
AFB ₂	20.02 ± 0.06	17.97 ± 0.07	8.78 ± 0.09		6165 ± 37.13	

*Promedio de 3 ensayos Tr = tiempo de retención; Tr' = tiempo de retención corregido; K' = Factor de capacidad; α = Selectividad; N = número de platos teóricos; R = Resolución

Los picos que se usaron para calcular los parámetros mencionados anteriormente son los que corresponden a las cuatro AF. En la **Figura 24** se muestra el cromatograma de las AF totales en concentración de 120 $\mu\text{g L}^{-1}$ los picos se indican por el nombre de cada toxina. Como puede observarse se cumplieron los criterios de los parámetros cromatográficos K', α y R con un valor superior a 2.

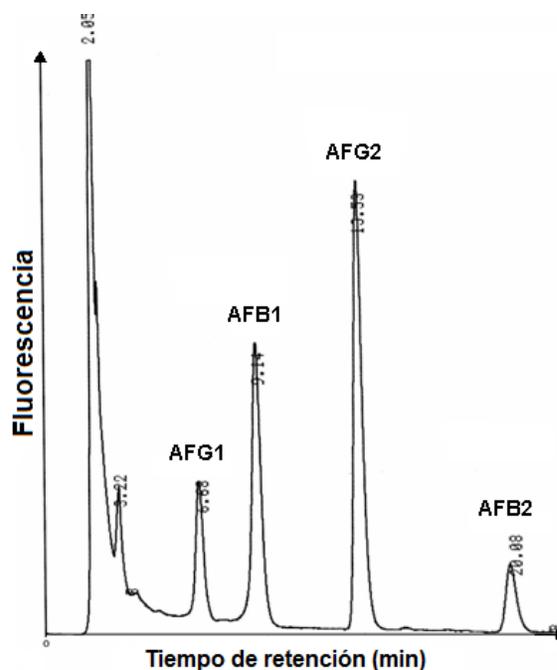


Figura 24. Cromatograma correspondiente a una mezcla de AFG₁, AFB₁, AFG₂ y AFB₂ en concentración total de 120 ng mL^{-1}

4.4.3. Linealidad del sistema

Se presentan los resultados de porcentaje de recuperación y linealidad del método, **Tabla 21**

Tabla 21. Cálculo del porcentaje de recuperación y linealidad del método.

AF	AF adicionada ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	AF recuperada ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Porcentaje de Recuperación \pm DE (% CV)	Pendiente	Ordenada	R ²	Intervalos de confianza		
							IC(β_1)	IC(β_0)	IC(μ)
AFB ₁	9.9	8.6	86.9	1.00	-1.77	0.993	(0.927, 1.072)	(-3.327, -0.211)	(87.77, 91.23)
	9.9	8.4	84.8						
	9.9	8.7	87.9						
	19.9	17.1	85.9						
	19.9	17.4	87.4						
	19.9	17.2	86.4						
	29.7	28.4	95.6						
	29.7	28.7	96.6						
Promedio \pm DE, (% CV)			89.5 \pm 4.6, (5.1 %)						
AFB ₂	9.9	8.5	85.9	0.937	-1.026	0.997	(0.895, 0.979)	(-1.926, -0.126)	(86.07, 89.53)
	9.9	8.4	84.8						
	9.9	8.6	86.9						
	19.9	16.9	84.9						
	19.9	17.3	86.9						
	19.9	17.2	86.4						
	29.7	27	90.9						
	29.7	26.9	90.6						
Promedio \pm DE, (% CV)			85.9 \pm 4.3, (5.0%)						
AFG ₁	9.9	8.9	89.9	0.936	-0.739	0.989	(0.89, 0.98)	(-1.65, 0.17)	(87.47, 90.93)
	9.9	8.5	85.9						
	9.9	8.6	86.9						
	19.9	17.3	86.9						
	19.9	18.1	91.0						
	19.9	17.4	87.4						
	29.7	27.2	91.6						
	29.7	26.7	89.9						
Promedio \pm DE, (% CV)			89.2 \pm 2.5 (2.8%)						
AFG ₂	9.9	8.9	89.9	0.934	-0.836	0.996	(0.88, 0.99)	(-1.94, 0.27)	(86.85, 90.31)
	9.9	8.6	86.9						
	9.9	8.6	86.9						
	19.9	16.9	84.9						
	19.9	17.3	86.9						
	19.9	17.3	86.9						
	29.7	26.8	90.2						
	29.7	27.5	92.6						
Promedio \pm DE, (% CV)			88.58 \pm 2.7,(3.0 %)						

DE= Desviación estándar; % CV = Coeficiente de variación en porcentaje; IC(β_1)= Intervalo de confianza para la pendiente; IC(β_0)= Intervalo de confianza para la ordenada; IC(μ) = Intervalo de confianza para el porcentaje de recuperación.

Al obtener las curvas de calibración, se obtuvo el valor del área bajo la curva de cada pico cromatográfico. Se construyó la gráfica correspondiente a concentración vs señal analítica y se determinó el valor de la pendiente (b_1), la ordenada al origen (b_0), el coeficiente de correlación (R^2) y el intervalo de confianza para la pendiente ($IC(\beta_1)$), **Tablas 14 a 17**.

4.4.4. Exactitud y repetibilidad del método.

Los datos para el cálculo de porcentaje de recuperación se utilizan para determinar la exactitud y repetibilidad del método que se muestran en la **Tabla 22**.

Tabla 22. Cálculo de porcentaje de recuperación para determinar la exactitud del método.

Aflatoxinas	*Cantidad de AF adicionada ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	*Cantidad de AF recuperada ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Porcentaje de recuperación (%)	Desviación estándar (DE)	Porcentaje del coeficiente de variación (% CV)	Intervalo de confianza
AFB₁	9.9	8.6	86.4	± 1.5	1.8 %	(82.6, 90.3)
AFB₂	9.9	8.5	85.8	± 1.0	1.2 %	(83.3, 88.3)
AFG₁	9.9	8.7	87.5	± 2.1	2.4 %	(82.2, 92.7)
AFG₂	9.9	8.7	87.8	± 1.7	2.0 %	(83.4, 92.1)
AFB₁	19.9	17.2	86.5	± 0.8	0.9%	(84.6, 88.4)
AFB₂	19.9	17.1	86	± 1.0	1.2 %	(83.4, 88.6)
AFG₁	19.9	17.6	88.4	± 2.2	2.5 %	(82.9, 93.8)
AFG₂	19.9	17.2	86.2	± 1.2	1.3 %	(83.3, 89.1)
AFB₁	29.7	28.4	95.4	± 1.2	1.2 %	(92.5, 98.3)
AFB₂	29.7	27.1	91.0	± 0.7	0.8 %	(89.3, 92.8)
AFG₁	29.7	27.2	91.5	± 1.7	1.8 %	(87.3, 95.7)
AFG₂	29.7	27.2	91.5	± 1.2	1.3 %	(88.5, 94.5)

*Promedio de tres repeticiones ($n = 3$), **DE**= Desviación estándar, **% CV**= Porcentaje del Coeficiente de variación.

Para matrices complejas, como es la tortilla, se acepta un 70% de recuperación por que los analitos se encuentran como trazas a nivel de ppb, de modo que los porcentajes de recuperación obtenidos se encuentran dentro de los rangos aceptables según Horwitz (1982).

4.4.5. Límites de detección y de cuantificación

Los límites de detección (LD) y cuantificación (LC) se determinaron con la desviación estándar de la regresión lineal de cada curva de calibración de AF. En la **Tabla 23** se presentan las ecuaciones de cada curva de calibración, LD, LC y el coeficiente de variación obtenidas.

Tabla 23. Datos de curvas de calibración.

Aflatoxina	Ecuación de regresión	R ²	Límite de Detección (µg kg ⁻¹)	Límite de Cuantificación (µg kg ⁻¹)	Repetibilidad CV (%)
AFB ₁	y = 4.367x - 2.874	0.9999	0.5	1.4	1.8
AFB ₂	y = 8.112x + 3.841	0.9999	0.6	1.9	1.2
AFG ₁	y = 4.873x - 3.760	0.9999	0.4	1.2	2.4
AFG ₂	y = 4.491x + 2.685	0.9999	0.4	1.5	2

4.5. Identificación y cuantificación de aflatoxinas en tortillas

4.5.1. Primer muestreo de tortillas de secas del 2006 (S06)

Se determinó el valor de la humedad promedio de las muestras de tortilla que fue de 42.4 ± 5.2 %. Los resultados correspondientes al análisis de AF de las muestras del primer muestreo (del 20 de marzo al 12 de abril del 2006) se presentan en la **Tabla 24**. El 22.5 % (22/98) de las muestras de la estación de secas analizadas se encuentran contaminadas con una o varias de las AF, el 19.2 % con menos de 12 µg kg⁻¹ y solamente el 3% rebasó el valor de la norma (12 µg kg⁻¹) (DOF, 2002a).

Lo interesante fue encontrar que la muestra N.- 81 (**Tabla 24**), tuvo 105.67 µg de AFB₁ kg⁻¹ de tortilla en peso seco, lo cual es una contaminación alta. La AFB₁ es la más mutágena, teratógena y cancerígena de todas las AF (Richard, 2007), y es la que se encontró con más frecuencia en tortillas. De acuerdo con Cai *et al.* (2008), las concentraciones de AF en sustratos naturales siguen el siguiente patrón: AFB₁ > AFB₂ > AFG₁ > AFG₂.

La biosíntesis de las AF está regulada por una serie de genes (Yu *et al.*, 1998; Yabe *et al.*, 1999; Ehrlich *et al.*, 2004) que son comunes en *A. flavus* y *A. parasiticus*. Ambas especies son capaces de producir AFB₁ y AFB₂, sin embargo, sólo *A. parasiticus* produce AFG₁ y AFG₂. Muchos científicos mantenían la hipótesis de que las AF de la serie G se producían a partir de la serie B por interconversión (Dutton, 1988; Watanabe y Townsend, 1996). Actualmente se ha demostrado que la biosíntesis de las AFG₁ y AFG₂ esta mediada por el gen nadA y las enzimas del citosol.

La biosíntesis de estas AF se produce a partir de ortometil esterigmatocistina (OMST). Recientemente se ha encontrado un intermediario final dentro de la conversión de OMST a AFG₁ este intermediario es un pigmento amarillo fluorescente que recibió el nombre de NADA (Cai *et al.*, 2008).

El problema es que aunque muchas muestras no rebasen los límites de tolerancia legales en México, las AF se unen y producen aductos con el ADN, ARN y proteínas y, causan mutaciones y cáncer (Wang y Groopman, 1999).

Se sabe que *Aspergillus nomius* (Kutzman *et al.*, 1987), *Aspergillus tamaritii* (Goto *et al.*, 1996), *Aspergillus pseudotamaritii* (Erlich *et al.*, 2007), *Aspergillus bombycis* y *Aspergillus ochraceoroseus* (Cary *et al.* 2009) son capaces de producir AF. Sin embargo, *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* son los únicos de importancia agronómica (Payne y Brown, 1998) y son los hongos reconocidos como capaces de producir AF en maíz.

Hesseltine *et al.* (1970), y Davies *et al.* (1983), encontraron que las cepas toxicogénicas de *Aspergillus flavus* producen sólo AFB₁ y AFB₂ y las de *A. parasiticus* producen generalmente B₁, B₂, G₁ y G₂. Sin embargo, ambas especies eventualmente pueden producir AFM₁ (Dutton, 1988). También se sabe que algunas especies de *A. flavus* producen solamente AFB₂ (Dutton, 1988), por lo que no es extraño encontrar muestras contaminadas solamente con esta toxina como se observa en la **Tabla 24**.

En los cuatro muestreos realizados en la presente investigación, se identificaron las cuatro AF y concluimos que ese maíz fue invadido también por *A. parasiticus*. Esto coincide con Angle (1986) quien reportó que *A. flavus* y *A. parasiticus* infectan el maíz durante el desarrollo, en pre y postcosecha.

Hay varios estudios de AF en maíz y en tortillas como son los de Etcheverry *et al.* (1999), Torreblanca *et al.* (1986), Carvajal *et al.* (1986), Carvajal y Arroyo (1997) y Juan-López *et al.* (1995), que coinciden con el presente estudio, a continuación los detallamos.

En el trabajo de Etcheverry *et al.* (1999), se mostró la presencia de AF en diversos genotipos de maíz y harinas comerciales de maíz de Argentina. El estudio micológico mostró que *Aspergillus* tuvo una frecuencia del 69%. Las especies predominantes fueron *A. flavus* (78%) y *A. parasiticus* (21%). Sin embargo, en harina de maíz se encontraron *Fusarium*, *Aspergillus* y *Penicillium*. No hubo diferencias entre la harina precocida y sin cocimiento. Coincidimos con este trabajo dado que encontramos las 4 AF y esto muestra la presencia de ambos *Aspergillus* (*A. flavus* y *A. parasiticus*).

Torreblanca *et al.* (1986), hallaron niveles elevados de AF en maíz y tortillas de México (AFB₁ en el 72 %), con concentraciones de AFB₁ de 5 a 500 µg kg⁻¹ en la muestra de 50 molinos y tortillerías de las Delegaciones de Coyoacán e Iztapalapa. En este trabajo se encontraron menores concentraciones de AF y esto señala que ha habido más calidad en el manejo de maíz y tortillas, quizá relacionado con la implementación de las normas mexicanas NOM-187-SSA1/SCFI-2002 (DOF, 2002a), NOM-188-SSA1-2002 (DOF, 2002b) y buenas prácticas de manufactura.

Carvajal *et al.* (1986), hallaron diversas micotoxinas en muestras de maíz, tortillas de maíz y de trigo, e indicaron que las AF, la zearalenona y el desoxinivalenol (DON) no se destruían con el tratamiento alcalino al 2%, ni a temperaturas de cocimiento de 110°C. Además, se determinaron AF totales en maíz del Estado de Tamaulipas, México en un rango de 15 a 1971 µg kg⁻¹ (Carvajal y Arroyo, 1997; Juan-López *et al.*, 1995). Con este

trabajo coincidimos en que las temperaturas de las máquinas tortilladoras y la nixtamalización no eliminan las AF.

En las **Figuras 29 y 30 del Anexo 3** se muestran los cromatogramas correspondientes a algunas de las muestras contaminadas del primer muestreo.

Tabla 24. Concentraciones de Aflatoxinas ($\mu\text{g kg}^{-1}$) por muestra de tortilla en peso seco. Primer muestreo de secas de 2006 (S06).

Delegación	Muestra	AFB ₁ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	AFB ₂ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	AFG ₁ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	AFG ₂ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Total de AF ($\mu\text{g kg}^{-1}$) de tortilla
Iztapalapa	S06-1	12.8	ND	ND	ND	12.8
Iztapalapa	S06-2	8.1	ND	ND	ND	8.1
Iztapalapa	S06-3	3.0	ND	ND	ND	3.0
Iztapalapa	S06-5	12.8	ND	ND	ND	12.8
Iztapalapa	S06-6	4.8	ND	ND	ND	4.8
GA Madero	S06-8	2.2	ND	ND	ND	2.2
GA Madero	S06-10	2.3	ND	ND	ND	2.3
A.Obregón	S06-15	ND	2.6	ND	ND	2.6
Coyoacán	S06-20	ND	2.2	<LC	ND	2.2
Tlalpan	S06-26	ND	3.2	ND	ND	3.2
Tlalpan	S06-27	ND	2.2	ND	ND	2.2
Tlalpan	S06-28	ND	2.2	ND	ND	2.2
Tlalpan	S06-29	ND	2.5	ND	ND	2.5
Azcapotzalco	S06-48	3.8	2.2	3.9	5.3	15.2
B. Juárez	S06-68	4.8	<LD	4.1	2.4	11.1
Tláhuac	S06-76	ND	<LC	4.2	ND	4.2
M.Contreras	S06-81	105.6	<LC	ND	ND	105.6
Cuajimalpa	S06-90	29.6	<LC	ND	ND	29.6

<LD = Por debajo del límite de detección; <LC = Por debajo del límite de cuantificación; ND = No detectado; $\mu\text{g kg}^{-1}$ = microgramos por kilogramo.

4.5.2. Segundo muestreo de tortillas de lluvias del 2006 (LL06)

El segundo muestreo, estación de lluvias, se realizó del 16 de octubre al 30 de noviembre del 2006 y se muestran los resultados en la **Tabla 25**. En este muestreo hubo 13 muestras de tortilla contaminadas de un total de 99 analizadas, esto equivale a 13.13% de tortillas contaminadas. En este segundo muestreo 11 muestras (84.6%) tuvieron niveles menores de $12 \mu\text{g kg}^{-1}$ y dos (15.4%) estuvieron fuera de norma.

Es interesante observar que la muestra N° 82 tuvo $393.3 \mu\text{g kg}^{-1}$ de AF totales según la **Tabla 25** y $385.21 \mu\text{g kg}^{-1}$ de AFG₁ (**Figura 32E**), lo cual representa niveles de contaminación muy altos. Otra muestra muy contaminada fue la N° 85 (**Figura 32F**), con $15.8 \mu\text{g kg}^{-1}$ de AFt, ambas muestras de la delegación Magdalena Contreras.

Como podemos observar en la **Tabla 25**, la contaminación en estación de lluvias de 2006 es menor que en la estación de secas de ese año. Es conocido que los maíces de temporal que sufren de sequía se contaminan más de AF, pues los hongos *Aspergillus*

flavus y *A. parasiticus* que son saprófitos y se encuentran en el medio ambiente, invaden los cultivos de maíz, y al estar restringidos del agua, producen más AF (Davis *et al.*, 1983). Incluso se ha dicho que los riegos de apoyo en estación de sequía pueden ayudar a la planta a protegerse contra la formación de AF.

Harrison *et al.*, (1987), analizaron muestras de maíz destinadas a uso industrial y encontraron que el 55% de las muestras contenían conidios de *A. flavus/A. parasiticus*, lo cual fue confirmado por aislamiento selectivo. Posteriormente, el 32% de hongos aislados fueron identificados como *A. flavus/A. parasiticus* y presentaron la capacidad de producir AFB₁ y en algunos casos AFB₁ + AFB₂.

El hecho de que aparezca muy alta la AFG₁ puede explicarse tomando en cuenta la ruta biosintética de AF (Steyn *et al.*, 1980), realizadas con C¹⁴, estudios cristalográficos y de resonancia magnética, que indican que la AFB₁ puede formar a la AFG₁, cosa que se especifica en las publicaciones de Trail *et al.* (1995), de Minto y Townsend (1997) y de Bennett *et al.* (1997), también puede ser producida a partir de un metabolito intermediario llamado dimetil esterigmatocistina.

La presencia de AFG₁ indica que su origen puede ser el hongo *A. parasiticus* quien la puede formar simultáneamente con la AFB₁. Ambas AF representan un alto riesgo para la salud humana. La AFG₁ es un potente cancerígeno para riñón de rata. De acuerdo con Molyneaux *et al.* (2007), el doble enlace entre los carbonos C⁸=C⁹ del furano terminal, se oxida por las enzimas microsomales del citocromo P₄₅₀ del hígado o riñón. Esta oxidación produce el 8,9 epóxido, que se une a moléculas como ADN, ARN y proteínas. Por lo que el doble enlace en el furano es el responsable de la toxicidad de las AFB₁ y AFG₁. Sin embargo, en las AFB₂ y AFG₂, se presentan la saturación entre los carbonos C⁸=C⁹. La oxidación del enlace saturado y su posterior formación del epóxido es hipotética. Debido a la saturación, su reactividad y toxicidad son mucho más bajas por lo que representan ser una amenaza menor comparada con las AFB₁ y AFG₁.

Tabla 25. Concentraciones de Aflatoxinas (µg kg⁻¹) por muestra de tortilla en peso seco. Segundo muestreo de lluvias de 2006 (LL06).

DELEGACIÓN	MUESTRA	AFB ₁ (µg kg ⁻¹)	AFB ₂ (µg kg ⁻¹)	AFG ₁ (µg kg ⁻¹)	AFG ₂ (µg kg ⁻¹)	Total de AF (µg kg ⁻¹) de tortilla
Iztapalapa	LL06-2	1.9	ND	ND	ND	1.9
GA.Madero	LL06-9	4.6	ND	ND	ND	4.6
GA.Madero	LL06-10	1.6	ND	ND	ND	1.6
Tlalpan	LL06-30	1.4	ND	ND	ND	1.4
Cuauhtémoc	LL06-33	<LC	2.0	ND	ND	2.0
Cuauhtémoc	LL06-34	1.6	0	ND	ND	1.6
Azcapotzalco	LL06-45	1.7	<LC	ND	ND	1.7
Azcapotzalco	LL06-49	ND	2.1	ND	ND	2.1
M.Contreras	LL06-81	7.8	ND	ND	ND	7.8
M.Contreras	LL06-82	<LC	4.2	385.2	3.9	393.3
M.Contreras	LL06-85	4.9	<LC	5.0	5.9	15.8
Milpa Alta	LL06-95	9.8	ND	ND	ND	9.8

<LD = Por debajo del límite de detección; <LC = Por debajo del límite de cuantificación; ND = No detectado; µg kg⁻¹ = microgramos por kilogramo.

Debido a la relación estrecha que posee AFG₁ con AFB₁ se realizó una investigación (Garner *et al.*, 1972), sobre la toxicidad de AFG₁ *in vitro* para conocer la potencia cancerígena de esta AF en mamíferos y animales. La unión de la AFB₁ y de la AFG₁ al ADN es mayor que su unión al ARN ribosomal de hígado y riñones de rata, y la AFB₁ forma la mayor cantidad de aductos. En estudios de distribución de AFB₁ y AFG₁ sobre diversos modelos de membrana celular, se mostró que la AFB₁ es más lipofílica que la AFG₁. La AFG₁ se une menos al ADN y es menos cancerígena que la AFB₁. La menor potencia cancerígena de la AFG₁ se ha probado en microsomas de hígado y bacterias en un ensayo de suspensión líquida, donde AFG₁ resultó ser cuatro veces menos tóxica que la AFB₁ (Garner *et al.*, 1972). Por otro lado, se reportó que la toxicidad de AFG₁ es 70% menor que la de AFB₁ en ensayos con *Salmonella* (Wong y Hsieh, 1976). Los datos sobre la toxicidad de AFG₁ *in vitro* contribuyen al conocimiento de su poder cancerígeno en mamíferos y otros animales.

La caracterización de aductos (que son los cancerígenos activos) de AFG₁-ADN (trans-9,10-dihidro-9-(7-guanil)-10-hidroxi-AFG₁), formados por activación *in vivo*, *in vitro* y por oxidación perácida, indica que la mayoría de estos aductos poseen la misma estructura química que los aductos de AFB₁. El aducto de AFG₁-ADN se forma al unirse con el N⁷ de la guanina. Hay una buena correlación entre las uniones AFG₁-ADN *in vivo* en el hígado y la susceptibilidad a desarrollar cáncer, también se ha observado que esta AF es un cancerígeno muy potente para riñón (Garner *et al.*, 1979).

La membrana nuclear de los hepatocitos tiene un papel importante en la unión de la AFG₁ y AFB₁ al ADN, mientras que el retículo endoplásmico une las AF al ARN ribosomal (Neal y Godoy, 1976). Además del hígado, es posible que otros órganos tengan la capacidad de activar a las AF y así producir diferentes tipos de tumores malignos. Garner *et al.* (1979) proponen la existencia de un metabolito que transporte las AF a otros órganos y reactive los metabolitos hidrolizados.

Las **Figuras 31 a 33 del Anexo 5** muestran los cromatogramas de muestras contaminadas del segundo muestreo de lluvias 2006.

4.5.3. Tercer muestreo de tortillas de estación de secas de 2007 (S07)

En el tercer muestreo correspondiente a la estación de secas del 2007 se realizó del 13 de abril al 9 de mayo de 2007, los resultados se presentan en la **Tabla 26**. En este caso se encontraron 11 muestras de tortilla contaminadas de un total de 98 analizadas, esto da 11.2% de tortillas contaminadas. En este tercer muestreo 10 muestras (tuvieron niveles menores de 12 µg kg⁻¹, y 1 estuvo fuera de norma. Es interesante observar que la muestra N° 31 (**Figura 34B**), de la Delegación Tlalpan tuvo 290.4 µg kg⁻¹ de AF totales, es decir, 140.33 µg kg⁻¹ de AFB₁ y 150.14 µg kg⁻¹ de AFG₁ lo cual representa niveles de contaminación muy altos.

La contaminación en estación de secas de 2007 es menor que en la estación de secas de 2006. La contaminación del maíz por *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus* varía según las condiciones ambientales favorables para el aumento de los hongos.

Se han reportado diversos brotes fúngicos en EEUU., en el oeste, la contaminación por AF del maíz trae pérdidas económicas, del grano y en su procesamiento (McGee *et al.*, 1996). El incremento de las poblaciones de *Aspergillus* y la producción de AF se presenta en los meses de julio y agosto de los años con baja precipitación pluvial y estrés por sequía. Se observó el comportamiento de *A. flavus* en campos de maíz en Iowa, en años no favorables para la contaminación del maíz por AF. Se midieron las poblaciones de *A. flavus*, de junio a septiembre en rastrojo y tejidos de maíz, suelo y aire durante dos periodos de 1979 a 1980 y de 1991 a 1993. La rotación de cultivos no tiene gran influencia sobre las poblaciones de *A. flavus*, aunque en julio del periodo de 1991 a 1993 se incrementó sustancialmente con respecto a los otros meses. *A. flavus* no desaparece sino que persiste en el ecosistema del maíz, y en años de sequía y calor causa pérdidas en el cultivo.

En 1998 se detectaron AF en maíz de Texas, Louisiana, Mississippi, Arkansas y el sureste de Missouri. En Missouri la incidencia fue severa, de 20 a 1500 $\mu\text{g kg}^{-1}$, y se rechazó del 10 al 30% del maíz con AF. Durante junio y julio, hubieron estrés por sequía y calor inusuales que favorecieron el desarrollo de *A. flavus*. En los Estados de Arkansas, Mississippi, Texas y Louisiana el rechazo por contaminación de AF en maíz fue superior al 50% (Wrather y Sweets, 2005).

Tabla 26. Concentraciones de Aflatoxinas ($\mu\text{g kg}^{-1}$) por muestra de tortilla en peso seco. Tercer muestreo de secas de 2007 (S07).

DELEGACIÓN	MUESTRA	AFB ₁ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	AFB ₂ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	AFG ₁ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	AFG ₂ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Total de AF ($\mu\text{g kg}^{-1}$) de tortilla
Tlalpan	S07-29	6.9	ND	ND	ND	6.9
Tlalpan	S07-31	140.3	ND	150.1	ND	290.4
Cuauhtémoc	S07-32	2.5	ND	ND	ND	2.5
V. Carranza	S07-42	6.2	ND	ND	ND	6.2
V. Carranza	S07-43	5.6	ND	ND	ND	5.6
Azcapotzalco	S07-49	ND	4.7	ND	ND	4.7
Azcapotzalco	S07- 50	8.2	ND	ND	ND	8.2
B.Juárez	S07-65	6.0	ND	ND	ND	6.0
Tláhuac	S07-76	11.4	ND	ND	ND	11.4
M.Contreras	S07-81A	6.4	ND	ND	ND	6.4
Cuajimalpa	S07-88	7.8	ND	ND	ND	7.8

<LD = Por debajo del límite de detección; <LC = Por debajo del límite de cuantificación; ND = No detectado; $\mu\text{g kg}^{-1}$ = microgramos por kilogramo.

En las Figuras 34 y 35 se presentan los cromatogramas correspondientes a las muestras positivas a AF del tercer muestreo de secas 2007.

4.5.4. Cuarto muestreo de tortillas de lluvias de 2007 (LL07)

El cuarto muestreo, lluvias 2007, se realizó del 18 de octubre al 9 de noviembre del 2007, **Tabla 27**. Hubo 14 muestras de tortilla contaminadas de un total de 98 analizadas, esto da 14.3 % muestras contaminadas. En este cuarto muestreo, de las muestras contaminadas, 13 de ellas (92.9 %) tuvieron niveles menores de $12 \mu\text{g kg}^{-1}$ que es el límite de tolerancia legal en México para tortilla, y solamente 1 muestras (7.1%) estuvo fuera de norma. Es interesante observar que la muestra N° 71 (**Figura 37C**) tuvo $31 \mu\text{g kg}^{-1}$ de AF totales y 11.44 de AFB₁, 3.05 de AFB₂ y 16.61 de AFG₁ lo cual representa niveles de contaminación altos, considerando que las AFB₁ y AFG₁ son las más tóxicas de las cuatro (Molyneaux *et al.*, 2007; Richard, 2007), y que la AFB₁ es la que se encontró con más frecuencia en tortillas.

La contaminación en estación de lluvias de 2007 fue más frecuente que en la misma estación del año anterior. Sin embargo, las concentraciones de AF determinadas son inferiores a las observadas en lluvias de 2006. No obstante, si se considera que el peso seco promedio de una tortilla de 14.34 g y el valor más bajo de contaminación de este muestreo es de $0.93 \mu\text{g}$ de AFB₂/kg de tortilla en peso seco; se tendría una contaminación de $13.33 \mu\text{g}$ de AFB₂/tortilla. Con lo cual se rebasa el valor de la NOM-187-SSA1/SCFI-2002 (DOF, 2002a). Por otra parte, la dieta del mexicano no incluye una tortilla sino varias, de ahí que Fernández-Muñoz *et al.*, (2006) mencionan que el consumo *per capita* de tortillas en México es de 325 g por día.

Tabla 27. Concentraciones de Aflatoxinas ($\mu\text{g kg}^{-1}$) por muestra de tortilla en peso seco. Cuarto muestreo de lluvias de 2007 (LL07).

Delegación	Muestra	AFB ₁ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	AFB ₂ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	AFG ₁ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	AFG ₂ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Total de AF ($\mu\text{g kg}^{-1}$) de tortilla
Iztapalapa	LL07-3	ND	ND	ND	4.2	4.2
A.Obregón	LL07-17	ND	2.8	ND	ND	2.8
Coyoacán	LL07-22	2.0	ND	ND	ND	2.0
V. Carranza	LL07-43	ND	2.4	ND	ND	2.4
Xochimilco	LL07-62	2.6	ND	ND	ND	2.6
B. Juárez	LL07-64	5.4	ND	ND	ND	5.4
B. Juárez	LL07-66	4.0	ND	ND	ND	4.0
B. Juárez	LL07-68	5.0	ND	ND	ND	5.0
M.Hidalgo	LL07-70	3.5	ND	ND	ND	3.5
M.Hidalgo	LL07-71	11.4	3.1	16.6	ND	31.1
M.Contreras	LL07-83	ND	ND	5.8	<LC	5.8
Cuajimalpa	LL07-87	3.7	ND	ND	ND	3.7
Milpa Alta	LL07-95	8.7	ND	ND	ND	8.7
Milpa Alta	LL07-96	ND	ND	ND	4.3	4.3

<LD = Por debajo del límite de detección; <LC = Por debajo del límite de cuantificación; ND = No detectado; $\mu\text{g kg}^{-1}$ = microgramos por kilogramo.

En las **Figuras 36 a 38 del Anexo 3** se presentan algunos de los cromatogramas correspondientes a las muestras positivas a AF del cuarto muestreo de lluvias de 2007.

4.6. Análisis estadístico de la contaminación de AF en tortillas

Se realizaron las pruebas de análisis de varianza (Anova), como un método descriptivo de los niveles significativos. Debido a que la distribución de las AF fue muy dispersa y no se ajusta a una distribución normal se corrió la prueba de Wilcoxon/ Kruskal-Wallis (Wilcoxon, 1945; Kruskal y Wallis, 1952), que no asume una distribución normal y que se ajusta a los datos obtenidos en esta investigación. La prueba no paramétrica permitió comparar las medianas de las muestras y se identificaron las diferencias existentes entre las fuentes de variación y la concentración de cada una de las AF.

Las fuentes de variación probadas en el experimento son la estación de muestreo (secas y lluvias), tipo de expendio (tortillería y supermercado), materia prima (masa, harina ó mezcla: masa-harina), marca de harina (Maseca, Minsa, Agroinsa) y la delegación de muestreo. A continuación se muestran los resultados de los análisis con diferencias significativas.

Para identificar diferencias por las estaciones de muestreo y el tipo de aflatoxinas se realizó el análisis de varianza y la prueba de Wilcoxon/ Kruskal-Wallis, está última prueba estadística permitió determinar la influencia de la estación de muestreo sobre el contenido y tipo de AF, no se encontraron diferencias significativas para ninguna de las AF ni en forma individual ni como el total de ellas ($AFB_1 + AFB_2 + AFG_1 + AFG_2$). Esto significa que las tortillas que se consumen durante la estación de secas son iguales a las tortillas que se consumen durante la estación de lluvias. Puesto que las diferencias en la concentración de las AF no son estadísticamente significativas.

Respecto al tipo del expendio si se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones de AFB_1 y AFG_2 . En las concentraciones de AFB_2 y AFG_1 y AF totales (AFt), no hubo diferencias significativas. La prueba de aproximación normal para dos muestras se obtuvieron valores de Z ($p = 0.0320$) y en la prueba de una vía para χ^2 ($p = 0.0320$) para AFB_1 por lo que las muestras provenientes de tortillerías presentaron mayor contaminación de AFB_1 , para el caso de AFG_2 los valores de Z ($p = 0.0465$) y χ^2 ($p = 0.0463$) también muestran que las tortillas de tortillería están más contaminadas con respecto a las adquiridas en supermercados.

La prueba de Wilcoxon permitió determinar diferencias significativas entre el tipo de materia prima empleado para la elaboración de tortillas (masa, mezcla, Maseca, Minsa), según el tipo de AF. Las diferencias encontradas fueron para AFB_1 $p = 0.0208$ y AFG_2 $p = 0.030$. La harina Maseca es la más contaminada. Para las AFB_2 , AFG_1 y AFt no hubo diferencias significativas.

También la prueba no paramétrica mostro que no existen diferencias significativas entre el tipo de harina empleado para la elaboración de tortillas (Maseca, Minsa), según el tipo de AF. El valor de $p = 0.0536$ para AFB_1 se encuentra muy cercano a $p = 0.0500$, que es

necesario para asegurar que si existen diferencias. Dados estos resultados la harina Maseca es la que muestra mayor contaminación. Para las otras AF (AFB₂, AFG₁, AFG₂ y AFt), no se encontraron diferencias significativas entre el contenido de AF y el tipo de harina empleado para la elaboración de tortillas.

En el caso del sitio de muestreo, no se encontraron diferencias significativas ya que el valor de $p = 0.0858$, es superior a 0.050, sin embargo el análisis estadístico de una vía de Wilcoxon para cada una de las AF por delegación permitió determinar diferencias significativas al comparar las delegaciones y los niveles de AF. En virtud de este resultado se realizaron las pruebas de pares y se identificaron las diferencias significativas entre algunas delegaciones. Los resultados muestran que las tortillas de las delegaciones Azcapozalco, Magdalena Contreras y Tlalpan presentan mayor concentración de AF al compararse con las delegaciones de la **Tabla 28**.

Tabla 28. Diferencias significativas para la concentración de AFB₂ por delegación de muestreo.

Delegación contrastada	Azcapotzalco	Magdalena Contreras	Tlalpan
	Valor de p	Valor de p	Valor de p
Iztapalapa	0.0083	0.0342	0.0109
Iztacalco	0.0110	0.0414	0.0142
Gustavo A. Madero	0.0110	0.0414	0.0142
Xochimilco	0.0110	0.0414	0.0142
Benito Juárez	0.0163	-----	0.0210
Cuajimalpa	0.0214	-----	0.0275
Milpa Alta	0.0214	-----	0.0275
Tláhuac	0.0364	-----	0.0464
Cuauhtémoc	0.0440	-----	-----
Venustiano Carranza	0.0379	-----	0.0486

4.7. Prueba de mutagenicidad de las tortillas por el método de Ames

A continuación se presentan los resultados de los ocho ensayos para determinar los marcadores genéticos y la viabilidad de la cepa para su empleo en la prueba de mutagénesis.

4.7.1. Recuperación de la cepa criogénica

Se descongeló la cepa de *Salmonella typhimurium* TA98 (raza) [*hisD3052*, *gal*, (*chl*, *uvrB*, *bio*) *rfa*, pKM101 (MucA/B Amp)] la cual se recuperó de un cultivo conservado a -80°C donado por el M. en C. Israel Pérez López del laboratorio de Oncología Experimental del Instituto Nacional de Pediatría.

4.7.2. Dependencia a histidina (his-)

En el medio libre de histidina sólo se observó el desarrollo de la cepa Wt, pero en el medio con histidina se verificó el crecimiento de las dos cepas tanto la Wt como la TA98. Lo que indica que las cepas TA98 CCA, INP A y INP B son dependientes de este aminoácido y que aún conservan la mutación en el gen *hisD3052* que afecta el marco de lectura de la secuencia repetitiva -C-G-C-G-C- \ -G-C-G-C-G-, esto impidió a la bacteria sintetizar el aminoácido histidina por lo que no puede crecer en un medio auxotrófico es decir un medio que no aporta los nutrimentos.

4.7.3. Dependencia a biotina (bio-)

Nuestros resultados muestran que debido a esta mutación sólo creció la cepa silvestre que no requiere la presencia de la biotina.

Una explicación de lo sucedido es que otra de las mutaciones que presenta la cepa TA98 es (*uvrB*) es una delección del gen que codifica el sistema de reparación por escisión del DNA, resultando una mayor sensibilidad en la detección de varios mutágenos (Ames, *et al.*, 1971, 1972, 1973a, b). Por razones técnicas, la delección del gen *uvrB* de escisión se extiende a través del gen *bio* y como consecuencia, estas bacterias también requieren biotina para su crecimiento (Maron y Ames, 1983).

4.7.4. Dependencia a histidina-biotina

Las dos cepas (Wt y TA98) crecieron, esto se debe a que la Wt no requiere histidina - biotina para crecer. La TA98 es dependiente de estos dos compuestos pero el medio de cultivo los tiene en exceso, lo cual permite el desarrollo de las dos cepas.

Se confirmó que la cepa de *Salmonella* TA98 es dependiente a histidina, porque requiere de este aminoácido para crecer en un medio selectivo. Esta cepa presenta una mutación por delección de pares de bases en el operón *hisD3052* por lo cual no sintetiza el aminoácido. Por otra parte, la dependencia a la biotina se debió a que la mutación por escisión del gen *uvrB* se extendió hasta el gen de biotina. Con esto se comprobó que la cepa presentaba las mutaciones esperadas al observar la dependencia a histidina – biotina y estaba en condiciones idóneas para las pruebas (Maron y Ames, 1983; Tejs, 2008).

4.7.5. Verificación del marcador *rfa* que modifica la pared celular, por sensibilidad al cristal violeta

En esta prueba se observó inhibición del desarrollo de las cepas TA98 (CCA, INP A, INP B) y Wt. El cristal violeta penetra la pared celular de todas las bacterias sin embargo, las cepas TA98 al presentar el marcador *rfa*, que modifica la composición de los lipopolisacáridos y aumenta la permeabilidad de la pared celular, facilita la entrada de moléculas como el cristal violeta al interior de la célula (Ames *et al.*, 1973a). Con lo cual se observa mayor inhibición con respecto a la cepa Wt.

4.7.6. Prueba para determinar la sensibilidad a la luz ultravioleta (confirmación de la delección de genes *uvr-B-bio*)

En esta prueba se observó la inhibición del crecimiento de la parte expuesta a la radiación UV, por lo cual se pudo verificar la delección de los genes *uvr-B-bio*. La prueba de la dependencia a biotina corroboró la delección de estos genes.

4.7.7. Verificación del factor R

En el agar con ampicilina, solamente la cepa de TA98 se desarrolló y la Wt no creció. Esto fue debido a que la TA98 tiene un plásmido pKM101, que codifica para la resistencia a ampicilina y la cepa Wt es sensible a este antibiótico pues no cuenta con dicho mecanismo de resistencia (Langer *et al.*, 1981).

4.7.8. Reversión espontánea

La mutación *hisD3052* portada por las cepas TA98 es una mutación de corrimiento del marco de lectura que afecta la secuencia de bases repetitivas cercanas. La reversión de esta mutación al estado silvestre puede suceder de manera natural pero se ha reportado que el valor de las colonias revertidas espontáneamente se encuentra entre 20 y 50. Sin embargo, la reversión es inducida por diferentes mutágenos de corrimiento del marco de lectura como el 2-nitrofluoreno, benzo(a)pireno, AF y varios derivados aromáticos nitrosos de aminas cancerígenas.

En este ensayo, se verificó la reversión espontánea para determinar que la cepa TA98 presentaba la mutación *hisD3052*. El número de colonias revertidas se encontró dentro de los valores reportados como óptimos. En la **Tabla 29** se presentan los resultados obtenidos de reversión espontánea para las tres cepas de *S. typhimurium* TA98. De acuerdo a los valores que se obtuvieron de la cuenta de colonias revertidas, y a los resultados obtenidos de los demás marcadores genéticos, se decidió trabajar con la cepa identificada como TA98 (INP B), ya que la cantidad de colonias reportadas en la literatura para TA98 se encuentra entre 20 y 50 y los obtenidos para esta cepa son más homogéneos.

Tabla 29. Reversión espontánea para las tres cepas de *Salmonella typhimurium* TA98 probadas.

Repetición	Cepa		
	TA98 (CCA)	TA98 (INP A)	TA98 (INP B)
1	14	26	29
2	22	23	14
3	18	21	26
4	19	19	31
5	27	38	25
6	18	9	21
Promedio	19	22	24

CCA: Centro de Ciencias de la Atmósfera, UNAM.

INP: Instituto Nacional de Pediatría, SSA.

4.8. Verificación de la cepa *Salmonella typhimurium* TA98 con controles positivos y AFB₁

Una vez determinados los marcadores genéticos fue necesario probar la respuesta de la cepa de *Salmonella* a la presencia de mutágenos, los resultados se muestran en la **Tabla 30**. El número de colonias revertidas espontáneas fue de 29 colonias/placa, resultado aceptable de acuerdo con lo reportado por Maron y Ames, 1983 (30-50 colonias/placa) y por Mortelmans y Zeiger, 2000, (20-50 colonias/placa).

Cuando se utilizaron los estándares 2-aminofluoreno y benzo(a)pireno, sin activación metabólica, se observó un decremento en el número de colonias revertidas espontáneas teniendo 9 y 12 colonias respectivamente. En este caso se esperaban valores muy similares a la reversión espontánea ya que los dos compuestos no son mutágenos directos y requieren ser activados metabólicamente por el citocromo P₄₅₀. Sin embargo, bajo este mismo tratamiento pero adicionando 500 µL de fracción S9 (activador metabólico); se observó un notorio incremento en el número de colonias revertidas con 171 y 222 colonias respectivamente. Esto indica que la fracción microsomal sí activa los mutágenos y provoca mutaciones reversas en la bacteria.

Tabla 30. Verificación de la cepa *Salmonella typhimurium* TA98 por controles positivos y AFB₁.

Repetición	Reversión espontánea	Controles			
		Testigo de mutagenicidad (+) sin AM	Testigo de mutagenicidad (+) con AM	Testigo de mutagenicidad (+) sin AM	Testigo de mutagenicidad (+) con AM
		2-aminofluoreno (20 µg/placa)		benzo(a)pireno (5 µg/placa)	
1	26	8	247	10	217
2	35	10	116	10	245
3	27	9	150	16	206
Promedio	29.3	9	171	12	222.7

AM = activación metabólica

El comportamiento para el caso de AFB₁ fue similar es decir, cuando se adicionó el estándar de AFB₁ a las placas, sin activación metabólica (**Tabla 31**), se observó un decremento en el número de colonias revertidas en las tres concentraciones probadas de (5, 50 y 200 µg/placa). Cuando se introdujo la fracción microsomal S9 (500 µL) al sistema, hubo un incremento de más de 3 veces en el número de colonias revertidas. En cuanto a las dosis de 5 y 50 µg/placa no se observaron diferencias.

Tabla 31. Resultados de la prueba de mutagénesis del estándar de AFB₁ con y sin activación metabólica.

Tratamientos de AFB ₁ sin activación metabólica			
Repetición	Tratamientos sin S9		
	AFB ₁ (5 µg mL ⁻¹)	AFB ₁ (50 µg mL ⁻¹)	AFB ₁ (200 µg mL ⁻¹)
1	9	15	5
2	8	14	11
3	10	14	11
Promedio	9	14.3	9

Tratamientos de AFB ₁ con activación metabólica			
Repetición	Tratamiento con S9 (500 µL)		
	AFB ₁ (5 µg mL ⁻¹)	AFB ₁ (50 µg mL ⁻¹)	AFB ₁ (200 µg mL ⁻¹)
1	113	104	471
2	111	98	465
3	98	105	297
Promedio	107.3	102.3	411.0

En las **Figuras 25 a 27** se muestran algunas de las placas con las colonias revertidas obtenidas con los diferentes tratamientos.

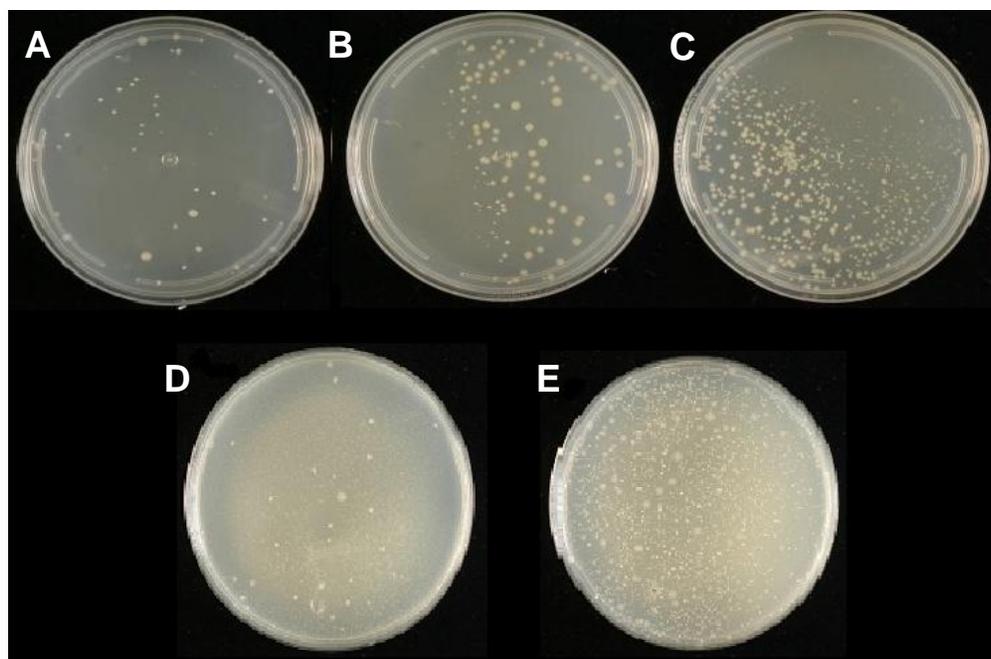


Figura 25. Placas correspondientes a los controles: A) Testigo negativo. B) Testigo positivo (2-aminofluoreno) sin activación metabólica. C) Testigo positivo (2-aminofluoreno) con activación metabólica S9. D) Testigo positivo (benzo(a)pireno) sin activación metabólica. E) Testigo positivo (benzo(a)pireno) con activación metabólica S9.

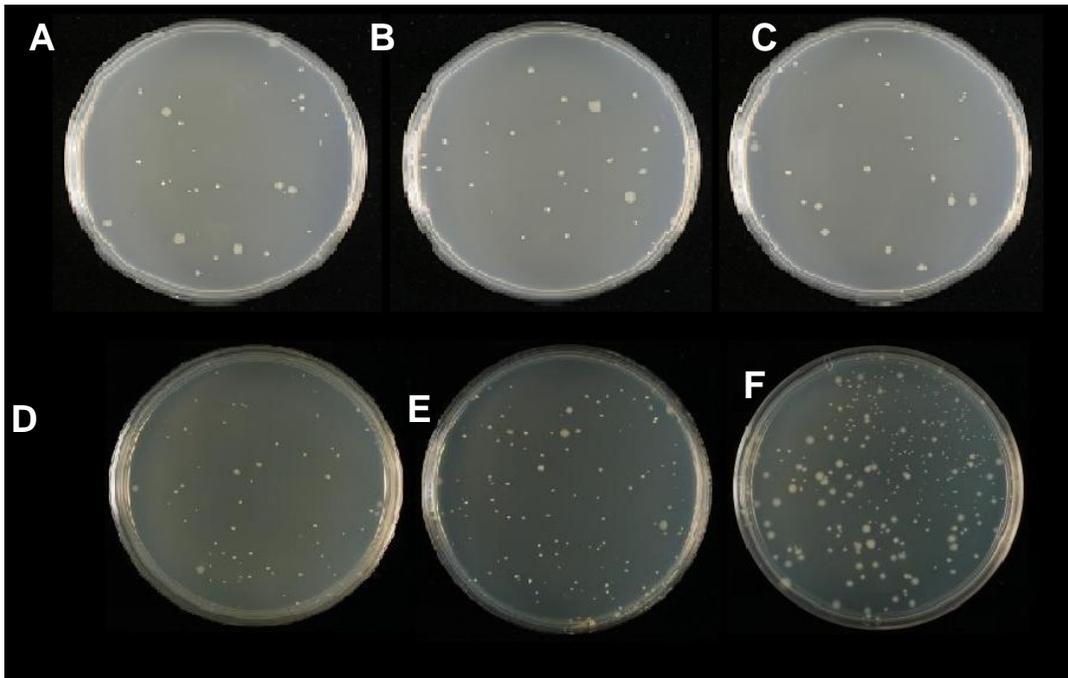


Figura 26. Placas correspondientes a tratamientos directos: A) AFB₁ (5 µg/placa) B) AFB₁ (50 µg/placa) C) AFB₁ (200 µg/placa), sin extracto microsomal S9. Placas correspondientes a tratamientos con activación S9: D) AFB₁ (5 µg/placa) E) AFB₁ (50 µg/placa) F) AFB₁ (200 µg/placa).

4.9. Separación de las AF de los extractos de tortillas de maíz por capa fina para ser usados en la prueba de Ames

En la cromatografía preparativa se designó como $R_f = 0$ el origen y $R_f = 1$ el frente del disolvente. Para la AFB₁ se determinó un $R_f = 0.34$ en el cual se observa, bajo la luz UV, una mancha de color azul intensa. Para AFB₂ el $R_f = 0.33$ con una mancha azul de menor intensidad, en el caso de la AFG₁ se determinó un $R_f = 0.35$ con una mancha verde – amarillo muy brillante y finalmente para AFG₂ el $R_f = 0.30$ con una mancha verde – amarillo de baja intensidad. Las muestras de los extractos de tortilla mostraban bandas de color verde o azul brillante sobrepuestas por lo tanto se recuperaron todas las bandas de color azul o verde comprendidas entre los $R_f = 0.30$ a 0.35 y éstas se usaron en la prueba de Ames.

4.10. Prueba de Ames para las AF obtenidas mediante extracción de tortillas sin acidificación

En el ensayo para determinar la capacidad mutagénica de las AF extraídas de 20 muestras de tortilla, se incluyeron como testigos positivos 2-aminofluoreno y AFB₁. Estos compuestos permitieron medir la respuesta de la cepa de *Salmonella typhimurium* TA98, como puede verse en la **Tabla 32**, ambos compuestos provocaron un incremento sustancial de 10 y 30 veces la reversión espontánea cuando se incluyó 2-aminofluoreno y AFB₁ respectivamente y el extracto microsomal S9. Estos resultados indican que la cepa de *Salmonella* responde al compuesto mutágeno y a la activación enzimática de los tóxicos.

Tabla 32. Resultados de los testigos usados en la prueba de mutagénesis de las AF extraídas de tortillas sin tratamiento ácido.

Controles	1	2	3	Promedio	DE
Reversión espontánea del testigo positivo de mutagenicidad	16	22	23	20.3	4
Sin activación metabólica 2-aminofluoreno 20 µg/placa.	80	92	69	80.3	12
Con activación metabólica 2-aminofluoreno 20 µg/placa.	247	197	214	219.3	25
Sin activación metabólica 10 µg/placa de AFB ₁	176	260	196	210.7	44
Con activación metabólica 10 µg/placa de AFB ₁	596	597	564	585.7	19

En cuanto a los resultados de las 20 muestras positivas de AF y de los tres controles que se extrajeron sin tratamiento ácido se puede observar en la **Tabla 33**, que ni para las AF aisladas de una ó cinco tortillas hay incremento en el número de colonias revertidas. Dado que los promedios de colonias revertidas se encontraron dentro del valor reportado para las colonias con reversión espontánea (20 a 50 colonias, Mortelmans y Zeiger, 2000) y para considerar mutagénico un compuesto, deben obtenerse valores de cuando menos tres veces el valor de la reversión espontánea (Carvajal *et al.*, 2004).

Tabla 33. Prueba de Ames con AF aisladas de tortillas sin tratamiento ácido

Prueba de Ames con las AF aisladas de tortillas								
Muestras	Equivalente a una tortilla				Equivalente a cinco tortillas			
	1	2	3	Promedio	1	2	3	Promedio
S06-5	13	11	17	14	64	20	22	35
S06-6	5	6	13	8	20	13	49	27
S06-9	15	14	15	15	17	20	18	18
S06-17	80	14	28	41	9	5	2	5
S06-33	23	21	16	20	17	18	16	17
S06-48	15	15	17	16	12	8	12	11
S06-68	23	50	52	42	16	23	31	23
S06-76	13	13	10	12	13	10	16	13
S06-81	7	3	1	4	11	12	9	11
S06-90	9	19	13	14	14	24	11	16
LL06-24	8	11	7	9	10	17	10	12
LL06-81	0	5	5	3	19	9	14	14
LL06-82	15	15	16	15	11	19	21	17
LL06-85	24	10	13	16	16	21	19	19
S07-31	19	17	11	16	0	15	19	11
S07-49	17	13	14	15	20	26	18	21
S07-61	13	750	16	260	19	26	20	22
LL07-32	23	24	20	22	38	25	40	34
LL07-43	27	6	191	75	54	40	43	46
LL07-58	22	17	4	14	14	12	14	13
LL07-71	51	12	42	35	31	51	24	35
LL07-83	23	28	16	22	70	17	40	42
LL07-84	66	23	11	33	21	10	29	20
LL07-98	19	26	74	40	28	43	37	36

La **Figura 27 a y b**, muestra los resultados de mutagenicidad en la prueba de Ames con las AF obtenidas del extracto equivalente a una y cinco tortillas.

La nixtamalización (cocimiento alcalino), al cual se somete al maíz para producir la masa, provoca que los anillos de lactona o pentanona se abran. Uno de los efectos que tiene la apertura de este anillo por efecto del álcali es la pérdida de fluorescencia (Torres *et al.*, 2001), y el poder mutagénico.

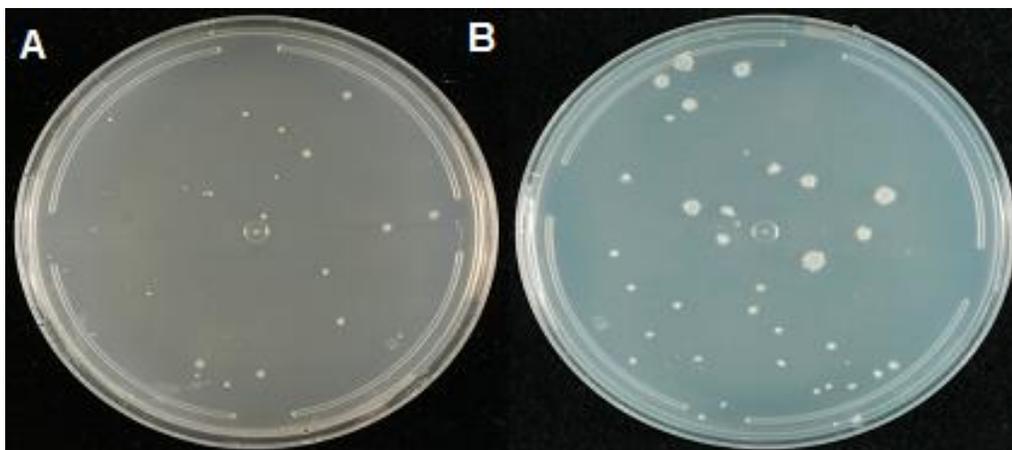


Figura 27. Ensayo de Ames con las AF aisladas de: a) muestra S06-5 equivalente a 1 tortilla, b) muestra S06-5 equivalente a 5 tortillas.

4.11. Prueba de Ames para las AF obtenidas mediante extracción ácida de tortillas

En el experimento con la extracción ácida de las AF de las muestras de tortilla, se esperaba que el efecto de la nixtamalización se revirtiera, es decir, si el tratamiento alcalino abre el anillo de lactona con la consecuente pérdida de fluorescencia y de las propiedades mutagénicas (Price y Jorgensen, 1985), entonces el pH ácido seguido de un pH neutro (Moctezuma, 2002), debería cerrar nuevamente el anillo recobrando la fluorescencia y exhibiendo su poder mutagénico.

Los resultados que se obtuvieron muestran que no hay incremento en el poder mutagénico de las AF extraídas de una y cinco tortillas. En la **Tabla 35**, se muestran los resultados obtenidos con este tratamiento.

Las AF aisladas de las muestras de tortilla no fueron mutágenas en la Prueba de Ames. La prueba de mutagénesis estuvo bien hecha pues se comprobaron todos los marcadores genéticos de la cepa y se observó una respuesta mutágena positiva con el estándar de 2-aminofluoreno y con el estándar de AFB₁, los resultados se presentan en las **Tablas 34 y 35**, sin embargo, los extractos de las tortillas no mostraron mutagenicidad en ninguno de los tratamientos (extracción directa, extracción ácida y para una y cinco tortillas).

Tabla 34. Resultados de los controles usados en la prueba de mutagénesis de las AF extraídas de tortillas con tratamiento ácido.

Controles	1	2	3	Promedio	DE
Reversión espontánea del testigo positivo de mutagenicidad	13	29	26	23	9
Sin activación metabólica 2-aminofluoreno 20 µg/placa.	72	60	96	76	18
Con activación metabólica 2-aminofluoreno 20 µg/placa.	670	574	546	597	65
Sin activación metabólica 10 µg/placa de AFB ₁	112	24	84	73	45
Con activación metabólica 10 µg/placa de AFB ₁	108	168	186	154	41

Huang *et al.*, (1994) y Namiki (1994), indicaron que existen muchos compuestos fitoquímicos en frutas y vegetales que tienen la capacidad de bloquear el proceso de mutagénesis en diferentes modelos animales. Por otra parte, estudios realizados por Burgos-Hernández *et al.*, (2001a) y Park *et al.*, (1997), muestran que algunos extractos obtenidos de maíz amarillo presentan propiedades antimutagénicas contra AFB₁.

Park *et al.*, (1997), encontraron que la cepa de *Salmonella* TA100 tiene una respuesta positiva a estándares de 2-aminofluoreno y AFB₁ en dosis de 10 ng/placa, sin embargo la respuesta es negativa para las aflatoxinas aisladas de maíz naturalmente contaminado inclusive para concentraciones de 7500 µg kg⁻¹. Estos resultados indican que existe una diferencia entre los agentes mutagénicos puros (estándares) usados como controles positivos y los obtenidos con las AF aisladas de las tortillas naturalmente contaminadas.

También, Park *et al.*, (1997), fraccionaron los extractos de maíz naturalmente contaminados con AF usando cromatografía en capa fina (TLC). Ninguna de las fracciones presentó actividad mutagénica en la prueba de Ames, inclusive a las fracciones se les adicionó estándar de AFB₁ obteniendo una respuesta negativa en esta prueba, el resultado obtenido en esta investigación con las AF aisladas de las tortillas es similar a lo que estos investigadores obtuvieron, pues no se observa efecto mutagénico con las AF extraídas con y sin tratamiento ácido.

El comportamiento encontrado en el ensayo de Ames para las AF aisladas de tortillas puede ser explicado por lo que Burgos-Hernández *et al.*, (2001b) reportaron. Ellos lograron la elucidación parcial de las estructuras de compuestos posiblemente responsables del efecto antimutagénico en extractos de maíz contaminados con AF. Determinaron por cromatografía de gases – espectrometría de masas, la relación masa/carga (m/z) de los compuestos. Con 93% de certeza se determinó la presencia del ácido 9, 12-octadecanoico o ácido linoleico, este ácido se había reportado como agente antimutagénico y antioxidante. Para 500-640 m/z se encontraron moléculas de pesos similares a los triglicéridos, fosfolípidos, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, y el fosfatidilinositol que puede contener la molécula del ácido linoleico en su estructura también actúa como antimutagénico y antioxidante. Todos estos compuestos también se encuentran en el maíz. Las tortillas de maíz pueden contener estos compuestos y al extraer las AF pueden seguir actuando como antimutágenos. Es posible que estos compuestos protejan a la población de los efectos tóxicos de las AF de las tortillas de maíz.

Los tratamientos con 5 tortillas presentaron más colonias revertidas que los de una tortilla, sin embargo, los resultados no aportan evidencia contundente que indique que las tortillas del DF contaminadas con AF sean mutagénicas y un riesgo para la salud. Los valores de colonias revertidas por las AF de tortillas no pueden tomarse como datos positivos dado que la reversión espontánea es de 23 colonias y para que fuera un resultado positivo tendrían que haberse presentado tres veces más ó sea 69 colonias como mínimo. La muestra LL07-98 de cinco tortillas presentó 59 colonias valor menor al requerido para considerarlo como positivo.

Tabla 35. Resultados de la prueba de Ames con AF aisladas de tortillas con tratamiento ácido.

Prueba de Ames con las AF aisladas de tortillas								
Muestras	Una tortilla				Cinco tortillas			
	1	2	3	Promedio	1	2	3	Promedio
S06-5	62	26	26	38	25	31	33	30
S06-6	16	17	21	18	30	12	32	25
S06-9	23	19	35	26	32	24	21	26
S06-17	22	25	31	26	25	32	43	33
S06-33	36	51	43	43	26	24	17	22
S06-48	22	25	26	24	31	38	43	37
S06-68	39	26	22	29	40	77	41	53
S06-76	39	41	22	34	40	32	74	49
S06-81	32	44	49	42	41	43	25	36
S06-90	33	66	65	55	40	54	28	41
LL06-24	31	32	38	34	31	35	33	33
LL06-81	39	29	37	35	36	38	35	36
LL06-82	45	25	26	32	39	19	46	35
LL06-85	19	29	42	30	21	30	14	22
S07-31	41	38	25	35	37	27	28	31
S07-49	37	27	36	33	20	36	37	31
S07-61	36	40	25	34	36	28	34	33
LL07-32	34	23	22	26	37	54	17	36
LL07-43	20	21	23	21	27	54	39	40
LL07-58	27	49	37	38	33	28	35	32
LL07-71	33	24	32	30	34	32	34	33
LL07-83	46	42	39	42	50	25	35	37
LL07-84	30	71	28	43	30	56	37	41
LL07-98	33	33	30	32	51	45	44	47

A continuación en la **Tabla 36**, se muestran los resultados de la observación de las placas con los cultivos de la prueba de Ames. La prueba de Ames estuvo realizada con todo rigor, sin embargo no se obtuvieron resultados de mutagénesis por los extractos de las tortillas, aunque sí se presentó un posible efecto de citotoxicidad en las bacterias. Al observar las cajas de cultivo bajo el microscopio se comprobó que en algunos casos no había un fondo homogéneo de bacterias lo cual se ha reportado como acción citotóxica de los compuestos probados. En la **Figura 28A** se muestran la imagen de una colonia con fondo homogéneo en donde se aprecian pequeñas colonias que no se lograron desarrollar pues no son revertidas por los extractos de AF de tortillas. En la **Figura 28B**, de la derecha, se tienen

dos colonias donde no hay fondo bacteriano, este comportamiento es común cuando el compuesto probado tiene efectos citotóxico.

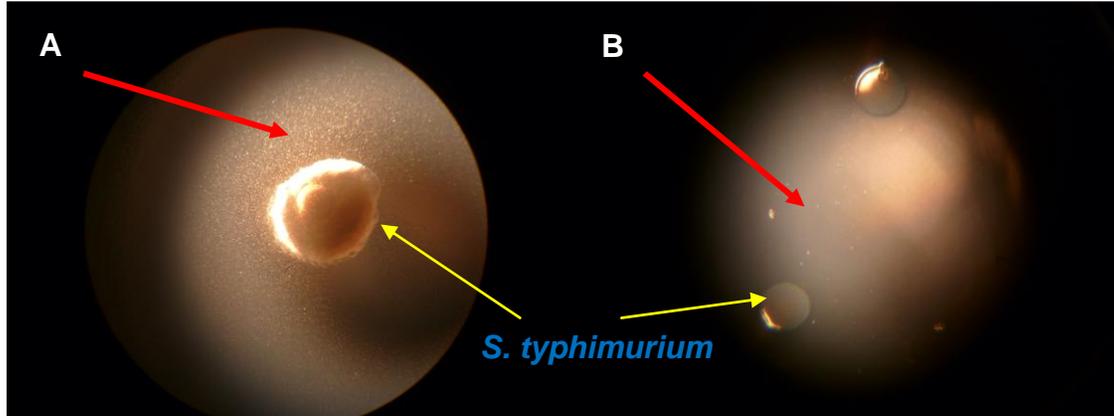


Figura 28. Vista al microscopio de colonias de *S. typhimurium*. A) con fondo de bacterias homogéneo, B) sin fondo de bacterias causado por posible efecto citotóxico y no mutágeno.

Por otra parte, al analizar los resultados obtenidos en esta investigación y a lo reportado en la literatura, considero que efectivamente hay compuestos antimutágenos en el maíz que evitan que las tortillas sean mutágenas en forma directa en la prueba de Ames. Así mismo los objetivos de la tesis se cumplieron dado que se identificaron y cuantificaron las AF en las tortillas de los 4 muestreos, además la prueba de Ames fue realizada con los extractos de tortillas acidificados y sin acidificar, este estudio de mutagenicidad tardó un año entero de trabajo intenso, sin embargo no se pudo comprobar la mutagenicidad de los extractos de las tortillas de maíz en la prueba de Ames.

El paso a futuro será realizar la prueba de Ames con preincubación del cultivo con las AF. Y también analizar la cantidad de ácido linoleico de las tortillas y tratar de separarlo de los extractos de AF, y analizar por separado el ácido linoleico con estándar de AF y los extractos de AF de las tortillas sin ácido linoleico, con objeto de conocer si este compuesto es el que está actuando como agente antimutágeno en la prueba de Ames.

Tabla 36. Observaciones microscópicas de la prueba de Ames.

Controles	N° muestra	Muestra de una tortilla	Muestra de 5 tortillas
	Observaciones de las muestras		
	Colonias de <i>S. typhimurium</i> y fondo homogéneo en las tres repeticiones		
Testigos de reversión espontánea			
Testigo + de mutagenicidad 2-AmF 20 µg/placa sin S9			
Testigo + de mutagenicidad 2-AmF * 20 µg/placa con S9			
Testigo + de mutagenicidad AFB ₁ 10µg/ placa sin S9			
Testigo + de mutagenicidad AFB ₁ 10 µg/ placa con S9			
	S06-5	8 X	34 Colonias con fondo homogéneo y bordes irregulares en las tres repeticiones
	S06-6	9 X	35 Colonias con fondo homogéneo una sin fondo
	S06-9	10 X	36 X
	S06-17	11 X	37 X
	S06-33	12 X	38 Colonias con fondo poco denso
	S06-48	13 Colonias con fondo poco denso.	39 X
	S06-68	14 X	40 X
	S06-76	15 X	41 X
	S06-81	16 X	42 X
	S06-90	17 X	43 Colonias pequeñas sin fondo.
	LL06-24	18 X	44 X
	LL06-81	19 Dos cajas de colonias con fondo poco denso y una sin fondo.	45 X
	LL06-82	20 X	46 X
	LL06-85	21 X	47 X
	S07-18	22 X	48 X
	S07-31	23 Dos cajas con colonias con fondo homogéneo y una sin fondo.	49 X
	S07- 49	24 X	50 X
	S07- 61	25 X	51 X
	LL07-32	26 X	52 X
	LL07-43	27 Dos repeticiones con colonias, una sin fondo en la otra sí hubo.	53 X
	LL07-58	28 Dos repeticiones con colonias y fondo homogéneo, y la tercera con colonias muy pequeñas y sin fondo	54 X
	LL07-71	29 X	55 X
	LL07-83	30 X	56 X
	LL07-84	31 X	57 X
	LL07-97	32 X	58 X
	LL07-98	33 X	59X

* **2-AmF** = 2-aminofluoreno.

V. CONCLUSIONES

1. Se logró identificar y cuantificar las AF en muestras de tortilla de la Ciudad de México y se puede concluir que no hay contaminación significativa o presencia significativa de AF en tortillas de maíz nixtamalizado, harina de maíz nixtamalizado o sus mezclas y no hay evidencia de mutagenicidad, aunque si de probable citotoxicidad, por las AF detectadas.
2. Se tiene que realizar un estudio de citotoxicidad para comprobar el posible efecto de las AF sobre la cepa de *Salmonella typhimurium* TA98.
3. Se acepta la hipótesis alterna ya que el 84 % de las muestras de tortillas de la Ciudad de México tuvo niveles de contaminación por aflatoxinas por debajo del valor normativo de $12 \mu\text{g kg}^{-1}$ (NOM-187-SSA1/SCFI-2002) y solamente el 16% rebasan este límite de tolerancia.
4. En ningún caso las AF presenten en las tortillas exhibieron efecto mutagénico en la prueba de Ames.
5. Los niveles de AF encontrados no constituyen un problema de salud pública, ni de preocupación para la población que consume este alimento en el Distrito Federal.
6. Esta investigación es la primera en la que se estudia el nivel de AF en tortillas de la Ciudad de México en el que se analizaron 392 muestras provenientes de todas las delegaciones políticas del DF.

VI. Referencias

- Abbas, H.K., Williams, W.P., Windham, G.L., Pringle, H.C., Xie, W. y Shier, W.T. 2002. Aflatoxins and fumonisins contamination of commercial corn (*Zea mays*) hybrids in Mississippi. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, 50: 5246-5254.
- Abdullaev, F.I., Riverón-Negrete, L., Caballero-Ortega, H., Hernández, J.M., Pérez-López, I., Pereda-Miranda, R. y Espinosa-Aguirre, J.J. 2003. Use of *in vitro* assay to assess the potential antigenotoxic and cytotoxic effects of saffron (*Crocus sativus* L.). **Toxicologist in vitro**, 17: 731-736.
- Akiyama, H., Goda, Y., Tanaka, T. y Toyoda, M. 2001. Determination of aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ in spices using a multifunctional column clean-up. **Journal of Chromatography A**, 932:153-157.
- Aleem, A. y Malik, A. 2005. Genotoxicity of the Yamuna River water at Okhla (Delhi), India. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 61: 404-412.
- Almeida A.P., Fonseca, H., Fancelli, A.L., Direito, G.M., Ortega, E.M. y Correa, B. 2002. Mycoflora and Fumonisin Contamination in Brazilian Corn from Sowing to Harvest. **Agricultural Food Chemistry**, 50 (13): 3877 -3882.
- 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, Vol. 1: 267-282.
- Ames, B.N, Lee, F. y Durston, W.E. 1973a. An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 70 (3): 782-786.
- Ames, B.N., Durston, W.E., Yamasaki, E. y Lee, F. 1973b. Carcinogens are mutagens: A simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 70(8): 2281-2285.
- Ames, B.N., Gurney, E.G., Miller, J.A. y Bartsch, H. 1972. Carcinogens as frameshift mutagens: Metabolites and derivatives of 2-acetylaminofluorene and other aromatic amine carcinogens. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 69(11): 3128-3132.
- Angle, J.S. 1986. Aflatoxin and aflatoxins-producing fungi in soil. In: Zuber, M.S., Lillehoj, E.B. and Renfro, B.L. Editors. Aflatoxin in Maize: A proceedings of the Workshop. CYMMYT/UNDP/USAID. April 7-11, 1986. El Batán, México, D.F. p.p. 152-163.
- AOAC. 2005. Natural toxins in Official Methods of Analysis of AOAC international. Horwitz, W (Ed.). 17th edition. Trucksess, M.W. Chapter Editor. Chapter 49: Natural Toxins. Vol. II Food Composition Additives; Natural contaminants. Washington, D.C. USA. p.p. 1-42.
- Asao, T., Büchi, G., Abdel-Kader, M.M., Chang, S.B., Wick, E.L. y Wogan, G.N. 1963. Aflatoxins B and G. **Journal of American Chemistry Society**, 85: 1706-1707.
- Asao, T., Büchi, G., Abdel-Kader, M.M., Chang, S.B., Wick, E.L. y Wogan, G.N. 1965. The structures of aflatoxins B₁ and G₁. **Journal of American Chemistry Society**, 87: 882-886.
- Bartsch, H., Malaveille, C., Camus, A.-M., Martel-Planche, G., Brun, G., Hautefeuille, A., Sabadie, N., Barbin, A., Kuroki, T., Drevon, C., Piccoli, C. y Montesano, R. 1980. Validation and comparative studies on 180 chemicals with *S. typhimurium* strains and V79 Chinese hamster cells in the presence of various metabolizing systems. **Mutation Research**, 76: 1-50.
- Bata, A. y Lásztity, R. 1999. Detoxification of mycotoxins-contaminated food and feed by microorganisms. **Trends in Food Science y Technology**, 10: 223-228.
- Bennett, J.W. y Klich, M. 2003. Mycotoxins. **Clinical Microbiology Reviews**, 16 (3): 497-516.

- Bennett, J.W., Chang, P.K. y Bhatnagar, D. 1997. One gene to whole pathway: The role of norsolorinic acid in aflatoxins research. **Advances in Applied Microbiology**, 45: 1-15.
- Bhat, R.V. y Miller, J.D. 1991. Mycotoxins and food supply. In Food for the Future. Food, Nutrition and Agriculture, No. 1. Revisado el 12 de noviembre de 2005.
Base de datos de la FAO, en las redes internacionales:
<http://www.fao.org/docrep/U3550T/U3550T00.htm>.
- Bircan, C. 2005. The determination of aflatoxins in spices by immunoaffinity column extraction using HPLC. **International Journal of Food Science and Technology**, 40: 929-934.
- Blesa, J., Soriano, J.M., Moltó, J.C. y Mañes, J. 2004. Limited survey for the presence of aflatoxins in foods from local market and supermarkets in Valencia, Spain. **Food Additives and Contaminants**, 21(2): 165-171.
- Bonifaz, A. 2002. Micología médica básica. 2ª ed. Méndez editores, México, D.F., México. p.p. 471-475.
- Burgos-Hernández, A., López-García, R., Njapau, H. y Park, D.L. 2001a. Anti-mutagenic compounds from corn. **Food Additives and Contaminants**, 18 (9): 797-809.
- Burgos-Hernández, A., López-García, R., Njapau, H. y Park, D.L. 2001b. Partial chemical/structural elucidation of anti-mutagenic compounds from corn. **Toxicology**, 166: 161-170.
- Cai, J., Hongmei Zeng, H., Shima, Y., Hatabayashi, H., Nakagawa, H., Ito, Y., Adachi, Y., Nakajima, Y. y Yabe, K. 2008. Involvement of the *nadA* gene in formation of G-group aflatoxins in *Aspergillus Parasiticus*. **Fungal Genetics and Biology**, 45: 1081–1093.
- Cary, I.W. Ehrlich, K.C., Beltz, S.B., Harris-Coward, P. y Klich, M.A. 2009. Characterization of the *Aspergillus ochraceoroseus* aflatoxin/sterigmatocystin biosynthetic gene cluster. **Mycologia**, 101 (3): 352-362.
- Carvajal, M. y Arroyo, G. 1997. Management of aflatoxin contaminated maize in Tamaulipas, Mexico. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, 45: 1301-1305.
- Carvajal, M., Bolaños, A., Rojo, F. y Méndez, I. 2003a. Aflatoxin M₁ in pasteurized and ultrapasteurized milk with different fat content in Mexico. **Journal of Food Protection**, 66(10): 1885-1892.
- Carvajal, M., Espinosa-Aguirre, J.J., Moctezuma, M.G., Gonsebatt, M.E., Rojo, F. y Pérez-López, I. 2004. Minimal amount of aflatoxin B₁ to produce a mutation in the Ames test with *Salmonella typhimurium* TA-98. **Revista Mexicana de Micología**, 19: 71-79.
- Carvajal, M., Rojo, F. y Méndez, I. 2003b. Aflatoxin B₁ and its interconverting metabolite aflatoxicol in milk: the situation in Mexico. **Food Additives and Contaminants**, 20(11): 1077-1086.
- Carvajal, M., Rosiles, M.R., Abbas, H.K. y Mirocha, C.J. 1986. Mycotoxins carryover from grain to tortillas in Mexico. In: Zuber, M.S., Lillehoj, E.B. and Renfro, B.L. Editors. Aflatoxin in Maize: A proceedings of the Workshop. CYMMYT/UNDP/USAID. April 7-11, 1986. El Batán, México, D.F. p.p. 318-319.
- Carvajal, M., Moctezuma, G., Espinosa, J., Rojo, F., López-Ridaura, S. y 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 Millenium. Chapter 5. Risk Assessment of mycotoxins. IUPAC/ AOAC International. Edited By W. J. de Koe, R.A. Samson.H.P. van Egmond, J. Gilbert y M. Sabino. Editorial Ponsen y Looijeven. The Netherlands. p.p. 133-141.
- Cavalière, C., Foglia, P., Pastorini, E., Samperi, R. y Laganà, A. 2006. Liquid chromatography/ tandem mass spectrometric confirmatory method for determining aflatoxin M₁ in cow milk. Comparison between

- electrospray and atmospheric pressure photoionization sources. **Journal of Chromatography A**, 1101: 69–78.
- Chan, D., MacDonald, S.J., Boughtflower, V. y Bereton, P. 2004. Simultaneous determination of aflatoxins and ochratoxins A in food using a fully automated immunoaffinity column clean-up and liquid chromatography-fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, 1059: 13-16.
- Chang, P-K., Horn, B.W. y Dorner, J.W. 2005. Sequence breakpoints in the aflatoxins biosynthesis gene cluster and flanking regions in nonaflatoxigenic *Aspergillus flavus* isolates. **Fungal Genetics and Biology**, 42: 914-923.
- Chiavaro, E., Dall' Asta, C., Galaverna, G., Biancardi, A., Gambarelli, E., Dossena, A. y Marchelli, R. 2001. New reversed-phase liquid chromatography method to detect aflatoxins in food and feed with cyclodextrins as fluorescence enhancers added to the eluent. **Journal of Chromatography A**, 937:31-40.
- Cleveland, T.E; Yu, J., Bhatnagar, D., Chen, Z.Y., Brown, R.L., Chang, P.K. y Cary, J.W. 2005. Progress in elucidating the molecular basis of the host plant-*Aspergillus flavus* interaction: A basis for devising strategies to reduce Aflatoxin contamination in crops. *In: Aflatoxin and Food Safety*. Abbas, H.K. Ed. Taylor y Francis CRC, FL, EEUU. p.p. 167-193.
- Coran M.H.O.W. y Craig A.T. 2002. Initial characterization of a type I fatty acid synthase and polyketide synthase multienzyme complex NorS in the biosynthesis of Aflatoxin B₁. **Chemistry and Biology**, 9: 981–988.
- Cortés-Eslava, J. 2008. Comunicación personal. Octubre 10 de 2008.
- Cotty, P.J. y Jaime-García, R. 2007. Influences of climate on aflatoxins producing fungi and aflatoxins contamination. **International Journal of Food Microbiology**, 119: 109-115.
- D'Mello, J.P.F. y Macdonald, A.M.C. 1997. Mycotoxins. **Animal Feed Science Technology**, 69: 155-166.
- David Josephy, P., Petr Gruz, Takehiko Nohmi. 1997. Recent advances in the construction of bacterial genotoxicity assay. **Mutation Research**, 383: 1 -23.
- Davis, N.D., Urban L. y Diener. 1983. Some characteristics of toxigenic and nontoxigenic isolates of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *In: Diener, U.L., Asquith, R.L., Dickens, J.W. eds. Biology of A. flavus and A. parasiticus. Aflatoxins and Aspergillus flavus in corn. Southern Cooperative Series Bulletin 279. Craftmaster Printers, Inc., Opelika, Alabama. p.p. 1-5.*
- De Arriola, M.C., de Porres, E., de Cabrera, S., de Zepeda, M. y Rolz, C. 1986. Aflatoxin and tortilla preparation in Guatemala. *In: Zuber, M.S., Lillehoj, E.B. y Renfro, B.L. Editors. Aflatoxin in Maize: A proceedings of the Workshop. CYMMYT/UNDP/USAID. April 7-11, 1986. El Batán, México, D.F. p.p. 298-307.*
- De Arriola, M.C., de Porres, E., de Cabrera, S., de Zepeda, M. y Rolz, C. 1988. Aflatoxins fate during alkaline cooking of corn for tortilla preparation. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, 36: 530-533.
- Devegowda, G. y Murthy, T.N.K. 2005. Mycotoxins: Their effects in poultry and some practical solutions. *In: The Mycotoxin Blue Book*. Diaz, D.E. Ed. Nottingham University Press. UK. p.p. 25-56.
- DOF. 2002a. Diario Oficial de la Federación. **Norma Oficial Mexicana, NOM-187-SSA1/SCFI-2002**. Productos y servicios. Masa, tortillas, tostadas y harinas preparadas para su elaboración y establecimientos donde se procesan. Especificaciones sanitarias. Información comercial. Métodos de prueba. México, D.F., México. Lunes 18 de agosto. p.p. 1-29.

- DOF. 2002b. **Norma Oficial Mexicana, NOM-188-SSA1-2002**. Norma Oficial Mexicana, productos y servicios. Control de aflatoxinas en cereales para consumo humano y animal. Especificaciones sanitarias. México, D.F., México. Martes 15 de octubre. p.p. 22-41.
- DOF. 2003a. Acuerdo por el que se dan a conocer los cupos mínimos para importar en el periodo 2004-2007 dentro del arancel-cuota establecido en el tratado de libre comercio de América del Norte, maíz excepto para siembra, originario de los Estados Unidos de América o de Canadá. Unidad de asuntos jurídicos. Dirección de legislación. México, D.F., México. 31 de diciembre, p. 2.
- Doebley, J. 2006. The evolution of plant form: An example from maize. In: Evolution of Development. **Developmental Biology**, 295: 337 – 338.
- Du Fourt, V.A., Van Larebeke, N. y Janssen, C.R. 2004. Genotoxic and mutagenic activity of environmental air samples in Flanders, Belgium. **Mutation Research**, 558: 155–167.
- Dutton, M.F. 1988. Enzymes and aflatoxin biosynthesis. **Microbiological Reviews**, 52 (2): 274-295.
- Ehrlich, K.C., Montalbano, B.G., Cary, J.W. y Cotty, P.J. 2002. Promoter elements in the aflatoxin pathway polyketide synthase gene. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1576: 171-175.
- Ehrlich, K.C., Chang, P.K., Yu, J.J. y Cotty, P.J. 2004. Aflatoxin biosynthesis cluster gene *cypA* is required for G aflatoxin formation. **Applied and Environmental Microbiology**, 70: 6518-6524.
- Ehrlich, K.C., Kobbeman, K., Montalbano, B.G. y Cotty, P.J. 2007. Aflatoxin producing *Aspergillus* species from Thailand. **International Journal of Food Microbiology**, 114: 153-159.
- Espinoza, C.A., Gómez, M.N., Sierra, M.M., Caballero, H.F., Coutiño, E.B., Palafox, C.A., Rodríguez, M.F., García, B.A., Cano, R.O. y Betanzos, M.E. 2005. Los maíces de calidad proteínica y la producción de semillas en México. **Ciencia y Desarrollo en Internet**, 1-10. Base de datos de CONACyT, en las redes internacionales: <http://www.conacyt.mx/>. Última revisión 7 de diciembre de 2005.
- Etcheverry, M., Nesci, A., Barros, G., Torres, A. y Chulze, S. 1999. Occurrence of *Aspergillus* section *flavi* end aflatoxin B₁ in corn genotypes and corn meal in Argentina. **Mycophatologia**, 147: 37-41.
- Fernández-Muñoz, J.L., San Martín-Martínez, E., Díaz-Góngora, J.A.I., Calderón, A., Alvarado-Escobar, A., Ortiz-Cárdenas, H. y Leal-Pérez, M. 2006. Steeping time and cooking temperature dependence of calcium ion diffusion during microwave nixtamalization of corn. **Journal of Food Engineering**, 76(4): 568-572.
- García, G.A., Martínez, F.R. y Melgarejo, H.J. 2001. Inspección para aflatoxinas en el maíz almacenado o transportado en el Estado de Sonora, 1998: Informe técnico. Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, **Serie Botánica**, 72 (2): 187-193.
- García, M.A. y Alcántara, A. 2002. Guía de validación de métodos analíticos. Ed. Colegio Nacional de QFB, A.C. Mexico, D.F., México. p.p. 1-122.
- Garner, R.C., Martin, C.N., Lindsay, J.R., Coles, B.F. y Tolson, M.R. 1979. Comparison of aflatoxin B₁ and aflatoxin G₁ binding to cellular macromolecules *in vitro*, *in vivo* and after peracid oxidation; characterisation of the major nucleic acid adducts. **Chemico-Biological Interactions**, 26: 57-73.
- Garner, R.C., Miller, E.C. y Miller, J.A. 1972. Liver microsomal metabolism of aflatoxin B₁ to a reactive derivative toxic to *Salmonella typhimurium* TA1530. **Cancer Research**, 32: 2058.
- Gimeno, A. y Martins, M. L. 2004. Riesgos de micotoxicosis que algunas micotoxinas (como contaminantes de los alimentos) pueden provocar en humanos. Base de datos de Ergomix en línea. Revisado en 24 de noviembre de 2005. Tomado de las redes internacionales: <http://www.ergomix.com/nuevo/prueba/micotoxinas1.asp?valor=366>.

- Gómez-Carniero, M.R., Viana, M.E.S., Felzenazwalb, I. y Paumgartten, F.J.R. 2005. Evaluation of β -myrcene, α -terpinene and (+) - and (-) - α -pinene in the *Salmonella*/microsome assay. **Food and Chemical Toxicology**, 43: 247-252.
- Goto, T., Wiclow, D.T. y Ito, Y. 1996. Aflatoxin and cyclopiazonic acid production by a sclerotium-producing *Aspergillus tamarii* strain. **Applied and Environmental Microbiology**, 113 (12): 4036-4038.
- Guzmán, D.P. 2001. Mitos y realidades de las aflatoxinas. **Avance y perspectiva**, 20: 415-420.
- Harrison, M.A., Silas, J. C. y Carpenter, J.A. 1987. Incidence of aflatoxigenic isolates of *Aspergillus flavus/parasiticus* obtained from Georgia corn processing plant. **Journal of Food Quality**, 10: 101-105.
- Hesseltine, C.W., Shotwell, O.L., Smith, M., Elis, J.J., Vandergraft, E. y Shannon, G. 1970. Production of various aflatoxins by strains of *Aspergillus flavus* series. In: Herzberg, M. ed. Toxic Micro-organisms. UJNR and Dept. Interior, U.S. Gov. Printing Off., Washington, D.C. p.p. 490
- Holcomb, M., Wilson, D.M., Trucksess, M.W. y Thompson, H.C. 1992. Determination of aflatoxins in food products by chromatography. **Journal of Chromatography**, 659: 127-137.
- Horwitz, W. 1982. Evaluation of Analytical Methods Used for Regulations of Foods and Drugs. **Analytical Chemistry**, 54(1): 67A-76A.
- Huang, M.T., Ferraro, T., y Ho, C.T. 1994. Cancer chemoprevention by phytochemicals in fruits and vegetables. An overview. Food Phytochemicals for Cancer Prevention I. Fruits and Vegetables, ACS Symposium Series 546, edited by M.T. Huang, T. Osawa, C.T. Ho y R. T. Rosen (Washington, DC: American Chemical Society). p.p. 15 - 46.
- IARC, 1993. Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. **IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans**, 56: 245.
- IARC, 2002. Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. **IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans**, 82: 171.
- INEGI. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática 2005. II Censo de población y vivienda 2005. Revisado en agosto 22 de 2008. tomado de las redes internacionales: <http://www.inegi.gob.mx/est/contenidos/espanol/sistemas/censo2005/>
- Islas-Hernández, J.J., Rendón-Villalobos, R., Agama-Acevedo, E., Gutiérrez-Meraz, F., Tovar, J., Arámbula-Villa, G. y Bello-Pérez, L.A. 2006. *In vitro* digestion rate and resistant starch content of tortillas stored at two different temperatures. **LWT Food Sciences and Technology**, 39(8): 947-951.
- Jaimez, J., Fuente, C.A., Vázquez, B.I., Franco, C.M., Cepeda, A., y Mahuizer, G. 2000. Application of the assay of aflatoxins by liquid chromatography with fluorescence detection in food analysis. **Journal of Chromatography A**, 882: 1-10.
- Jeffrey, A.M. y Williams, G.M. 2005. Risk assessment of DNA-reactive carcinogens in food. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 207: S628-S635.
- Juan, C. Soriano Del Castillo, J.M. y Burdaspal, P. 2007. Aflatoxinas del Grupo B y G. En: Micotoxinas en Alimentos. Capítulo 8. Ed. Soriano Del Castillo, J.M. Ediciones Díaz de Santos, España. p.p. 167-184.
- Juan-López, M., Carvajal, M., y Ituarte, B. 1995. Supervising programme of aflatoxins in Mexican corn. **Food Additives and Contaminants**, 12 (3): 297-312.
- Knize, M.G., Salmon, C.P., y Felton, J.S. 2003. Mutagenic activity and heterocyclic amine carcinogens in commercial pet foods. **Mutation Research**, 539: 195-201.

- Kok, W. Th. 1994. Derivatization reactions for the determination of aflatoxins by liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Chromatography B**, 659: 127-137.
- Kruskal, W.H. y Wallis, W.A. 1952. Use of ranks in one-criterion variance analysis. **Journal of the American Statistical Association**, 47 (260): 583-621.
- Kurtzman, C.P., Horn, B.W. y Hesseltine, C.W. 1987. *Aspergillus nomius*, a new aflatoxins-producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamarii*. **Antonie Leeuwenhoek**, 53: 147-158.
- Kussak, A., Andersson, B. y Andersson, K. 1995. Immunoaffinity column clean-up for the high-performance liquid chromatography determination of aflatoxins B₁, B₂, G₁, G₂, M₁ and Q₁ in urine. **Journal of Chromatography B**, 672: 253-259.
- Langer, P.J., Shanabruch, W.G. y Walker, G.C. 1981. Functional organization of plasmid pKM101. **Journal of Bacteriology**, 145: 1310-1316.
- Leeson, S., Diaz, G. y Summers, J. 1995. Poultry metabolic disorders and mycotoxins. University Books, Ontario, Canada. p.p. 249-297.
- Lewis, L., Onsongo, M., Njapau, H., Schurz-Rogers, H., Lubber, G., Kieszak, S., Nyamongo, J., Backer, L., Dahiye, M.D., Misore, A., DeCock, K. y Rubin, C. 2005. Aflatoxin contamination of commercial maize products during an outbreak of acute Aflatoxicosis in Eastern and Central Kenya. **Environmental Health Perspectives**, 113 (12): 1763-1767.
- Li, F.Q., Yoshizawa, T., Kawamura, O., Luo, X.Y. y Li, Y.W. 2001. Aflatoxins and fumonisins in corn from the high-incidence area for hepatocellular carcinoma in Guangxi, China. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, 49: 4122-4126.
- Lindner, E. 1995. Toxicología de alimentos. 2ª Edición. Acribia S.A. Zaragoza, España. p.p. 117-123.
- Lippmann, M. 2000. Environmental Toxicants. Wiley-Intersciences. New York, USA. p.p. 401-402.
- Liu, Z., Gao, J. y Yu, J. 2006. Aflatoxins in stored maize and rice grains in Liaoning Province, China. **Journal of Stored Products Research**, 42(4): 468-479.
- Manetta, A.C., Di Giuseppe, L., Giammarco, M., Fusaro, I., Simonella, A., Gramenzi, A. y Formigoni, A. 2005. High-performance liquid chromatography with post-column derivatisation and fluorescence detection for sensitive determination of aflatoxin M₁ in milk and cheese. **Journal of Chromatography A**, 1083: 219-222.
- Manonmani, H.K., Anand, S., Chandrashekar, A. y Rati, E.R. 2005. Detection of aflatoxigenic fungi in selected food commodities by PCR. **Process Biochemistry**, 40: 2859-2864.
- Maron, D.M. y Ames, B.N. 1983. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. **Mutation Research**, 113: 173-215.
- McCann, J., Choi, E., Yamasaki, E. y Ames, B.N. 1975. Detection of carcinogens as mutagens in the *Salmonella*/microsome test: Assay of 300 chemicals, **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 72: 5135-5139.
- McGee, D.C., Olanya, O.M., Hoyos, G.M. y Tiffany, L.H. 1996. Populations of *Aspergillus flavus* in the Iowa cornfield ecosystem in years not favorable for aflatoxin contamination of corn grain. **Plant Disease**, 80 (7): 742-746.
- McKean, C., Tang, L., Tang, M., Billam, M., Wang, Z., Theodorakis, C.W., Kendal, R.J. y Wang, J.-S. 2006. Comparative acute and combinative toxicity of aflatoxin B1 and fumonisin B1 in animals and human cells. **Food and Chemical Toxicology**, 44 (6): 868-876.

- Medina-Martínez, M.S. y Martínez, A.J. 2000. Mold occurrence and aflatoxin B₁ and fumonisin B₁ determination in corn samples in Venezuela. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, 48: 2833-2836.
- Méndez-Albores, J.A., Arámbula-Villa, G., Loaraca-Piña, M.G., González-Hernández, J., Castaño-Tostado, E. y Moreno-Martínez, E. 2004. Aflatoxins' fate during the nixtamalization of contaminated maize by two tortilla-making processes. **Journal of Stored Products Research**, 40: 87-94.
- Minto, R.E. y Townsend, C.A. 1997. Enzymology and molecular biology of aflatoxins biosynthesis. **Chemical Review**, 97: 2537-2552.
- Moctezuma, M.G. 2002. Mutagénesis por AFB₁ presente en maíz y tortillas, y la nixtamalización como posible control. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Molyneaux, R. J., Mahoney, N., Kim, J.H. y Campbell, B.C. 2007. Mycotoxins in edible tree nuts. **International Journal of Food Microbiology**, 119 (1-2): 72-78.
- Moreno, O.J. y Kang, M.S. 1999. Aflatoxins in maize: The problem and genetic solutions. **Plant Breeding**, 118: 1-16.
- Mortelmans, K. y Zeiger, E. 2000. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. **Mutation Research**, 455: 29-60.
- Nadal, A. 2000. El caso del maíz mexicano en el NAFTA: Variabilidad genética y liberalización comercial. **Biodiversidad**, 24: 3-12.
- Nakai, V.K., Rocha, L.O., Gonçalves, E., Fonseca, H., Ortega, E.M.M. y Corrêa, B. 2008. Distribution of fungi and aflatoxins in a stored peanuts variety. **Food Chemistry**, 106: 285-290.
- Namiki, M., 1994. Antimutagen and anticarcinogen research in Japan. Food Phytochemicals for Cancer Prevention I. Fruits and Vegetables, ACS Symposium Series 546, edited by M.T. Huang, T. Osawa, C. T. Ho and R. T. Rosen (Washington, DC: American Chemical Society). pp. 132 -158.
- NCI. 1978 a. Bioassay of 2,4-diaminoanisole sulfate for possible carcinogenicity. NCI Carcinogenesis Technical Report Series No. 84, DHEW publication No. (NIH) 78-1334.
- NCI. 1978 b. Bioassay of tris (2,3-dibromopropyl) phosphate for possible carcinogenicity. NCI Carcinogenesis Technical Report Series No.76, DHEW publication No. (NIH) 78-1326.
- NCI. 1979 a. Bioassay of 2,4-diaminotoluene for possible carcinogenicity. NCI Carcinogenesis Technical Report Series No.162 DHEW publication No. (NIH) 79-1718.
- NCI. 1979 b. Bioassay of 2-nitro-*o*-phenilendiamine for possible carcinogenicity. NCI Carcinogenesis Technical Report Series No.169, DHEW publication No. (NIH) 79-1725.
- Neal, G.E. y Godoy, H.M. 1976. The effect of pre-treatment with phenobarbitone on the activation of aflatoxin B₁ by rat liver. **Chemico-Biological Interactions**, 14: 279.
- Nelson, D.B., Kimbrouhg, R., Landrigan, P.S., Hayes, A.W., Yang, G.C. y Benanides, J. 1980. Aflatoxins and Reye's syndrome: A case control study. **Pediatrics**, 66(6): 865-869.
- Nesci, A., Barros, G., Castillo, C. y Etcheverry, M. 2006. Soil fungal population in preharvest maize ecosystem in different tillage practices in Argentina. **Soil and Tillage Research**, 91 (1-2): 143-149.
- Niedwetzki, G., Lach, G. y Geschwill, K. 1994. Determination of aflatoxins in food by use of an automatic work station. **Journal of Chromatography A**, 661: 175-180.

- Nieminen, S.M., Maki-Paakkanen, J., Hirvonen, M.R., Roponen, M. y von Wright, A. 2002. Genotoxicity of gliotoxin, a secondary metabolite of *Aspergillus fumigatus*, in battery of short-term test systems. **Mutation Research**, 520: 161-170.
- Ohgake, H., Matsukura, N., Morino, K., Kawachi, T., Sugimura, T., Morita, K., Tokiwa, H. y Hirota, T. 1982. Carcinogenicity in rats of the mutagenic compounds 1-nitropyrene and 3-nitrofluorantene, **Cancer Letters**, 15: 1-7.
- Organización Panamericana de la Salud. 1983. Criterios de Salud Ambiental 11. Publicación Científica N° 453. Organización Mundial de la Salud. USA. p.p. 131.
- Otta, K.H., Papp, E. y Bagócsi, B. 2000. Determination of aflatoxins in food by overpressured-layer chromatography. **Journal of Chromatography A**, 882: 11-16.
- Palmgren, M.S. y Hayes, A.W. 1987. Aflatoxins in Food. *In: Mycotoxins in foods. Food Science and Technology, A Series of monographs* Ed. Academic Press. San Diego, EEUU. 65-95.
- Papp, E., H-Otta, K., Záray, G. y Mincsovic, E. 2002. Liquid chromatography determination of aflatoxins. **Microchemical Journal**, 73: 39-46.
- Park, D.L., Martinez, A.J. y Weng, C.Y. 1997. Anti-aflatoxin mutagenic factors in corn. **Food Additives and Contaminants**, 14 (3): 269-279.
- Park, J.W., Kim, E.K. y Kim, Y.B. 2004. Estimation of the daily exposure of Koreans to aflatoxin B₁ through food consumption. **Food Additives and Contaminants**, 21(1): 70-75.
- Payne, G.A. y Brown, M.P. 1998. Genetics and physiology of aflatoxins biosynthesis. **Annual Reviews of Phytopathology**, 36: 329-362.
- Phillips, J.C., Davies, S. y Lake, B.G. 1999. Dose-response relationships for hepatic Aflatoxin B₁-DNA adduct formation in the rat *in vivo* and *in vitro*: The use of immunoslot blotting for adduct quantitation. **Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis**, 19: 157-170.
- Pier, A.C., Fichtner, R.E. y Cysewski, S.J. 1977. Effect of aflatoxin on the cellular immune system. **Annales de la nutrition et de l'alimentation**, 31 (4-6): 781-788.
- Plasencia, J. 2004. Aflatoxins in maize: A Mexican Perspective. **Journal of Toxicology**, 23(2, 3):155-177.
- Plasencia, J. 2005. Aflatoxins in maize: A Mexican Perspective. *In: Aflatoxins and Food Safety*. Abbas, H.K. Ed., Taylor y Francis Group CRC. p.p. 59-75.
- Pohland, A.E. y Wood, G.E. 1987. Occurrence of Mycotoxins in Food. *In: Mycotoxins in foods. Food Science and technology, A series of monographs*. Ed. Academic Press. San Diego, EEUU. p.p. 35-45.
- Prandini, A., Tansini, G., Sigolo, S., Filippi, L., Laporta, M. y Piva, G. 2009. On the occurrence of aflatoxin M₁ in milk and dairy products. **Food and Chemical Toxicology**, 47(5): 984-991.
- Price, R.L. y Jorgensen, K.V. 1985. Effects of processing on aflatoxins levels and on mutagenic potential of tortillas made from naturally contaminated corn. **Journal of Food Science**, 50(2): 347-349.
- Proctor, A.D., Ahmedna, M., Kumar, J.V. y Goktepe, I. 2004. Degradation of aflatoxins in peanut kernels/flour by gaseous ozonation and mild heat treatment. **Food Additives and Contaminants**, 21(8): 786-793.
- Purchase, I.F.H., Longstaff, E., Ashby, J., Styles, J.A., Anderson, D., Lefevre, P.A. y Westwood, F.R. 1976. Evaluation of six short term tests for detecting organic chemical carcinogens and recommendations for their use. **Nature**, 264: 624-627.

- Rastogi, S., Das, M. y Khanna, S.K. 2001. Quantitative determination of aflatoxins B₁-oxime by column liquid chromatography with ultraviolet detection. **Journal of Chromatography A**, 933: 91-97.
- Reddy, S.V. y Farid, W. 2006. Properties of aflatoxin and it producing fungi. Revisado en enero 11 de 2006. tomado de las redes internacionales: <http://www.aflatoxin.info/aflatoxin.asp>.
- Ribeiro, S. 2005. Las tortillas. Amenazas al Maíz. Suplemento semanal de La Jornada. La Jornada en la Economía. 17 de enero del 2005. Directora General: Carmen Lira Saade. Director: León Bendesky.
- Richard, J.L. 2007. Some major mycotoxins and their mycotoxicoses-An overview. **International Journal of Food Microbiology**, 119(1-2): 3-10.
- Robledo, M.L., Marín, S. y Ramos, A. J. 2001. Contaminación natural con micotoxinas en maíz forrajero y granos de café verde en el estado de Nayarit (México). **Revista Iberoamericana de Micología**, 18: 141-144.
- Rosado, J.L., Camacho-Solís, R. y Bourges, H. 1999. Adición de vitaminas y minerales a harinas de maíz y de trigo en México. **Salud pública de México**, 41(2): 130-137.
- Rosi, P., Borsari, A., Lasi, G., Lodi, S., Galanti, A., Fava, A., Girotti, S. y Ferri, E. 2007. Aflatoxin M₁ in milk: Reliability of the immunoenzymatic assay. **International Dairy Journal**, 17: 429-435.
- Rustom, I.Y.S., López-Leiva, M.H. y Nair, B.M. 1993. Effect of pH and heat treatment on the mutagenic activity of peanut beverage contaminated with aflatoxin. **Food Chemistry**, 46: 37-42.
- Rustom, I.Y.S. 1997. Aflatoxin in Food and Feed: Occurrence, legislation and inactivation by physical methods. **Food chemistry**, 59(1): 57-67.
- SAGARPA. 2007. Avances de siembras y cosechas: Resumen nacional por producto año agrícola 2007. Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera. Revisado 14 de junio 2007. Tomado de las redes internacionales: http://www.siap.gob.mx/ventanal2.php?url=reportes.siap.gob.mx/Agricola_siap/AvanceNacionalSinPrograma.do
- Saleemullah, A.I., Iqtidar, A.K. y Hamidullah, S. 2006. Aflatoxin contents of stored and artificially inoculated cereals and nuts. **Food Chemistry**, 98(4): 699-703.
- Sanchis, V., Marín, S. y Ramos, A.J. 2000. Control de micotoxinas emergentes. Situación legislativa actual. **Revista Iberoamericana de Micología**, 17: S69-S75.
- Scherm, B., Palomba, M., Serra, D., Marcello, A. y Migheli, Q. 2005. Detection of transcripts of the aflatoxin genes *afID*, *afIO*, and *afIP* by reverse transcription-polymerase chain reaction allows differentiation of aflatoxin-producing and non-producing isolates of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. **International Journal of Food Microbiology**, 98: 201-210.
- Scott, P.M. 1996. Mycotoxins transmitted into beer from contaminated grains during brewing. **Journal of AOAC International**, 79(4): 875-882.
- Sendra, J.M. y Carbonell, J.V. 2005. Evaluación de las propiedades nutritivas, funcionales y sanitarias de la cerveza, en comparación con otras bebidas. Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos - Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IATA/CSIC). Revisado el 7 de diciembre 2005. Tomado de las redes internacionales: <http://www.alfa-editores.com/bebidas/Abril%20-%20Mayo%2005/TECNOLOGIA%20Evaluacion%20de>.
- Sharman, M. y Gilbert, J. 1991. Automated aflatoxins analysis of foods and animal feeds using immunoaffinity column clean-up and high-performance liquid chromatographic determination. **Journal of Chromatography**, 543: 220-225.

- Shenashi, M., Aidoo, K.E. y Candlish, A.A.G. 2002. Microflora of date fruits and production of aflatoxins at various stages of maturation. **International Journal of Food Microbiology**, 79: 113-119.
- SIEM. 2006. Sistema de Información Empresarial Mexicano. Secretaría de Economía. En las redes internacionales: <http://www.siem.gob.mx/portalsiem/>. Última revisión 13 de abril 2006.
- Simon, P., Delsaut, P., Lafontaine, M., Morele, Y. y Nicot, T. 1998. Automated column-switching high-performance liquid chromatography for the determination of aflatoxin M1. **Journal of Chromatography B**, 712: 95-104.
- Steciow, M. 2003. Aflatoxinas. Revisado el 20 de febrero de 2006. Tomado de las redes internacionales: <http://www.cricyt.edu.ar/enciclopedia/terminos/Aflatox.htm>.
- Steyn, P.S., Vleggaar, R. y Wessels, P.L. 1980. The biosynthesis of aflatoxin and its congeners. 105-155 pp. *In: The biosynthesis of mycotoxins. A study of secondary metabolism.* Steyn, P.S. (Ed). Chapter 4. Academic Press, USA. p.p. 431.
- Stroka, J., Otterdijk, R. y Anklam, E. 2000. Immunoaffinity column clean-up prior to thin-layer chromatography for the determination of aflatoxins in various food matrices. **Journal of Chromatography A**, 904: 251-256.
- Sugimura, T. 1982. A view of cancer researcher on environmental mutagens. *In: H. Takabe Editor. Proceedings of the Third International Conference on Environmental Mutagens, University of Tokyo.* Press/Alan R. Liss. p.p. 3-20.
- Sugimura, T., Sato, S., Nagao, M., Yahagi, T., Matsushima, T., Seino, Y., Takeuchi, M. y Kawachi, T. 1976. Overlapping of carcinogens and mutagens, *In: Maggae et al.*, Editors. *Fundamentals in cancer prevention*, University of Tokyo, p.p. 191-215.
- Sweeney, M.J. y Dobson, A.D.W. 1999. Molecular biology of mycotoxin biosynthesis. **FEMS Microbiology Letters**, 175(2): 149-163.
- Tejs, S. 2008. The Ames test: a methodological short review. **Environmental Biotechnology**, 4(1): 7-14.
- Torreblanca, R.A., Bourges, R.A. y Morales, J. 1986. Aflatoxins in maize and tortillas in Mexico. *In: Zuber, M.S., Lillehoj, E.B. y Renfro, B.L. Editors. Aflatoxin in Maize: A proceedings of the Workshop. CYMMYT/UNDP/USAID. April 7-11, 1986. El Batán, México, D.F.* p.p. 310-317.
- Torres, P., Guzmán-Ortíz, M. y Ramírez-Wong, B. 2001. Revising the role of pH and thermal treatments in aflatoxin content reduction during the tortilla and deep frying processes. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, 49: 2825-2829.
- Trail, F., Mahanti, N. y Linz, J.E. 1995. Molecular biology of aflatoxins biosynthesis. **Microbiology**, 141: 755-765.
- Trucksess, M.W., Dombink-Kurtzman, M.A., Tournas, V.H. y White, K.D. 2002. Occurrence of aflatoxins and fumonisins in Incaparina from Guatemala. **Food Additives and Contaminants**, 19(7): 671-675.
- Wang, J-S. y Groopman, J.D. 1999. DNA damage by mycotoxins. **Mutation Research**, 424: 167-181.
- Watanabe, C.M.H. y Townsend, C.A. 1996. Incorporation of molecular oxygen in aflatoxin B₁ biosynthesis. **Journal of Organic Chemistry**, 61: 1990-1993.
- Weisburger, E., Russield, A.B., Homburger, F., Weisburger, J.H., Boger, E., Van Dongen, C.G. y Chu, K.C. 1978. Testing of twenty-one environmental aromatic amines or derivatives for long-term toxicity or carcinogenicity. **Journal of Environmental Pathology and Toxicology**, 2: 325-356.
- Wilcoxon, F. 1945. Individual comparisons by ranking methods. **Biometrics Bulletin**, 1: 80-83.

- Williams, J. y Wilson, D. 1999. Informe sobre el problema de aflatoxinas de la castaña (*Bertholletia excelsa*) en Bolivia: Documento Técnico 71/1999. Universidad de Georgia, USAID/Bolivia. p.p. 4-7.
- Williams, W.P., Windham, G.L., Buckley, P.M. y Perkins, J.M. 2005. Southwestern corn borer damage and aflatoxin accumulation in conventional and transgenic corn hybrids. **Field Crops Research**, 91: 329-336.
- Woloshuk, C.P. y Prieto, R. 1998. Genetic organization and function of the aflatoxin B₁ biosynthetic genes. **FEMS Microbiology Letters**, 160 (2): 169-176.
- Wong, J.J. y Hsieh, D.P.H. 1976. Mutagenicity of aflatoxins related to their metabolism and carcinogenic potential. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 73: 2241.
- Wrather, J.A. y Sweets, L.E. 2005. Aflatoxin in corn. Revisado el 19 de noviembre de 2007. Tomado de las redes internacionales:
<http://www.aes.missouri.edu/delta/croppest/aflacorn.stm>
- Wyllie, T.D. y Morehouse, L.G. 1978. Mycotoxin Fungi, Mycotoxins, Mycotoxicoses. An Encyclopedic Handbook. Vol 3. MerceL Dekker, Inc. Nueva York, EEUU.p.p. 1-202.
- Yabe, K., Nakamura, M. y Hamasaki, T. 1999. Enzymatic formation of G-Group Aflatoxins and biosynthetic relationship between G- and B-Group Aflatoxins. **Applied and Environmental Microbiology**, 65: 3867 – 3872.
- Yu, J., Chang, P.K., Ehrlich, K.C., Cary, J.W., Montalbano, B., Dyer, J.M., Bhatnagar, D., y Cleveland, T.E. 1998. Characterization of the critical amino acids of *Aspergillus parasiticus* cytochrome P-450 monooxygenase encoded by *ordA* that is involved in the biosynthesis of aflatoxins B1, G1, B2, and G2. **Applied and Environmental Microbiology**, 64: 4834 – 4841.
- Zeiger, E. y Margolin, B.H. 2000. The proportions of Mutagens among chemicals in Commerce. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, 32: 219-225.

ANEXO 1: Resultados de las encuestas de los muestreos

Tabla 37. Primer muestreo (secas 2006).

N° de Muestra, lugar.	Masa /Harina (H)/ Mezcla	Proporción de la mezcla	Masa propia (P) /comprada (C)	Color de maíz: blanco, amarillo, azul	Origen del maíz	Venta kg/día
1. Comercial Mex., Ermita Iztap.2955. Ampliación Sn Miguel, Iztapalapa.	H (Maseca)	Sólo harina	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Sin datos
2. Megacomercial, Calz de la Viga 1381, Col. El Retoño, Iztapalapa.	H (Maseca)	Sólo harina	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Sin datos
3. Walmart, Canal de Tezontle 1520, Dr. A Ortiz Tirado, Iztapalapa.	H (Maseca)	Sólo harina	Sin datos	Sin datos	Sin datos	300
4. Walmart, Av. Tláhuac 5662, Iztapalapa.	H (Maseca)	Sólo harina	Sin datos	Blanco	Estados	Sin datos
5. Mercado Constitución de 1917, Iztapalapa.	Masa		C	Amarillo	Sin datos	225
6. 3ª Cerrada de Retoño esq. Calle Retoño, Col. El Retoño, Iztapalapa.	Mezcla	Maseca/Masa 5:50 kg	C	Amarillo	Sin datos	500
7. Calle Emilio Carranza 281, San Andrés Tetepilco, Iztapalapa.	Masa	Sin datos	P	Blanco, rara Vez amarillo	Sinaloa	250
8. Walmart, Calz. Guadalupe 431, Col. Gpe. Tepeyac, G.A.Madero.	H (Maseca)	Sólo harina	Sin datos	Blanco	Sin datos	1120
9. Bodega Comer. Mex., V. Carranza 100, Barrio Coatepec, G.A.Madero.	H (Maseca)	Sólo harina	Sin datos	Blanco	Sin datos	200-250
10. Superama, Av. Montevideo 360, Av. Politécnico, Lindavista, G.A.Madero.	H (Maseca)	Sólo harina	Sin datos	Blanco	Sin datos	420
11. Calle la Esperanza 95, Col. Industrial, G.A. Madero.	Masa	Sin datos	C	Blanco/amar.	Sin datos	320
12. Av. Emiliano Zapata 75. Col. Zona Escolar, Cuauhtémoc, G.A.Madero.	Masa	Sin datos	P	Blanco	Sin datos	200
13. Poniente 124 N° 405, Col. Nueva Vallejo, G.A. Madero.	Masa	Sin datos	C	Amarillo	Sin datos	130
14. Superama Pedregal, Agua, Jardines del Pedregal, A. Obregón.	H (Maseca)	Sin datos	Sin datos	Blanco	Sin datos	150-200
15. Bodega Gigante, Tamaulipas 1236. Edo. de Hidalgo, A. Obregón.	H (Minsa)	Sin datos	Sin datos	Blanco	Sin datos	Sin datos
16. Bodega Aurrerá, Observatorio 457, Las Américas, A. Obregón.	H (Maseca)	Sin datos	Sin datos	Blanco	Sin datos	Sin datos
17. José Ma. Morelos Mz. 67, Lte. 2 Bis. Torres de Potrero, A. Obregón.	Masa	Sin datos	P	Blanco	Sin datos	400
18. Av. Tamaulipas 1306, Col. Corpus Christi. A. Obregón.	Mezcla	Masa/Maseca 50:10 kg	P	Blanco	Sin datos	80
19. Ricardo Castro 28, Col. Guadalupe Inn. A. Obregón	Masa		P	Amarillo	Toluca	500-600
20. Superama, Río Churubusco y Centenario. Del Carmen, Coyoacán.	Mezcla	Masa/Minsa 3:1	C	Blanco	Sin datos	100
21. Comercial Mexicana, Parque Comercial Gran Sur. Coyoacán.	H (Maseca)	Sin datos	Sin datos	Blanco	Sin datos	250-300
22. Calzada de la Salud, Esc. Naval Militar, Coyoacán.	H (Maseca)	Sin datos	Sin datos	Blanco	Sin datos	600
23. Av. Pacífico 33, Col Los Reyes, Coyoacán.	Masa	Sin datos	P	Amarillo	Sin datos	150-250
24. Anacahuita 40, Col. Pedregal de Santo Domingo, Coyoacán.	Mezcla	¾ Masa por ¼ Minsa	C	Amarillo	Sin datos	110
25. Mercado Educación, Col. Educación, Coyoacán.	Masa	Sin datos	P	Blanco	Fortimex, Pue.	250-300
26. Chedraui, Carr. Picacho-Ajusco 175, Héroes de Padierna, Tlalpan.	H (Maseca)	Sin datos	Sin datos	Blanco	Sin datos	180-200
27. Bodega Comercial Mexicana de la Fama, Col. La Fama, Tlalpan.	H (Minsa)	Sin datos	Sin datos	Amarillo	Sin datos	180
28. Comercial Mex., Canal de Miramontes y Calz. del Hueso, Tlalpan.	H (Maseca)	Sin datos	Sin datos	Blanco	Sin datos	300
29. Calle 7, Mz. 23, Lte. 7, Col. Ampliación, M. Hidalgo, Tlalpan.	Mezcla	Masa/Maseca 50:10 kg	C	Blanco	Sin datos	325
30. Norte 1 esq. Oriente 1, Col. Isidro Fabela, Tlalpan.	Mezcla	Masa/Minsa 50:50 kg	C	Amarillo	Sin datos	250
31. Calle San Martín 27, San Pedro Mártir, Tlalpan.	Mezcla	Masa/Minsa 50:50 kg	C	Amarillo	Sin datos	250
32. Comercial Mex., Calz. Chabacano 43, Col. Asturias, Cuauhtémoc.	H (Maseca)	100% Maseca	Sin datos	Blanco	Sin datos	250-300
33. Bodega Comer., Venustiano Carranza 125, Col. Centro. Cuauhtémoc.	Mezcla	Masa/Maseca 25:10 kg	C	Blanco	Sin datos	Sin datos
34. Mega Calz. de la Ronda 88, Col. Ex -Hipódromo Peralvillo, Cuauhtémoc	H (Maseca)	Sin datos	Sin datos	Blanco	Sin datos	350-400
35. Calle Chihuahua 140, Col. Roma, Cuauhtémoc.	Masa	Sin datos	C	Blanco	Sin datos	400
36. Calle del 57 N° 16, Col. Centro, Cuauhtémoc.	Masa	Sin datos	C	Sin datos	Sin datos	275
37. Calle Ciprés 13, Col Sta. Ma. La Ribera, Cuauhtémoc	Masa	Sin datos	P	Blanco	Sin datos	750
38. Walmart, Calz Ignacio Zaragoza 58, Col. Federal, V. Carranza.	H (Maseca)	Sin datos	Sin datos	Amarillo	Sin datos	Sin datos
39. Fray Servando Teresa de Mier 881, Jardín Balbuena, V. Carranza.	H (Maseca)	Sin datos	Sin datos	Blanco	Sin datos	200-300
40. Calle Anfora 241, Col. Madero, V. Carranza.	H (Maseca)	Sin datos	Sin datos	Blanco	Sin datos	270-350

ANEXO 1: Continuación

N° de Muestra, lugar.	Masa /Harina (H)/ Mezcla	Proporción de la mezcla	Masa propia (P) /comprada (C)	Color de maíz:blanco, amarillo, azul	Origen del maíz	Venta kg/día
41. Calle Norte 178 y Esterlinas. Col. Pensador Mexicano. V. Carranza.	Masa	Sin datos	C	Blanco	Sin datos	Sin datos
42. Alfonso Ceballos 43, Col. Moctezuma, V. Carranza.	Masa	Sin datos	C	Blanco	Sin datos	350
43. Av. Del Taller 502, Col. Jardín Balbuena, V. Carranza.	Masa	Sin datos	C	Blanco	Sin datos	250
44. Relaciones Exteriores 2, Col. Federal, V. Carranza.	Masa	Sin datos	C	Blanco	Sin datos	200
45. Walmart, Nextengo 78, Sta. Cruz Acayucan, Azcapotzalco.	H (Maseca)	Sin datos	Sin datos	Blanco	Sin datos	250
46. Walmart, Av. Cuitláhuac 3651, Col. Hogar y Seguridad, Azcapotzalco.	H (Maseca)	Sin datos	Sin datos	Blanco	Sin datos	Sin datos
47. Bodega Comercial, Av. Azcapotzalco 527, Azcapotzalco.	H (Maseca)	Sin datos	Sin datos	Blanco	Sin datos	100
48. Calle 12, Col. Prohogar, Azcapotzalco.	Masa	Sin datos	P	Blanco	Sinaloa	500-550
49. Av. Jardín 36-1. Col del Gas. Azcapotzalco.	Masa	Sin datos	C	Blanco	Sin datos	200
50. Av. Real de San Martín 194, Col. Nueva España, Azcapotzalco.	Masa	Sin datos	P	Blanco	Tlanepantla	Sin datos
51. Bodega Aurrerá, Tezontle esq. Apatlaco, Col Apatlaco, Iztacalco.	H (Maseca)	Sin datos	Sin datos	Amarillo	Sin datos	Sin datos
52. Bodega Gigante, Av. La Viga 627, Barrio Zapotla, Iztacalco.	H (Minsa)	Sin datos	Sin datos	Amarillo	Sin datos	250
53. Puebla y Calle 5, Col. Agrícola Pantitlán, Iztacalco.	Mezcla	Masa/Maseca 75:25 kg	C	Blanco	Sin datos	Sin datos
54. Oriente 259, esq. Sur 28. Col. Agrícola Oriental, Iztacalco	Mezcla	Masa/Maseca 50:5 kg	C	Blanco	Sin datos	250
55. Oriente 259 N° 230 esq. Sur 18B, Agrícola Oriental, Iztacalco.	Mezcla	Masa/Agroin 50:25 kg	C	Amarillo	Sin datos	250
56. Sur 159 N° 125, Col. Ampliación Ramos Millan, Iztacalco.	Masa	Sin datos	P	Blanco	Sin datos	200
57. Matamoros y J.Ortiz de Domínguez,Barrio Sn Juan Centro,Xochimilco	Masa	Sin datos	C	Blanco	Edo México	300
58. Av. 16 de Septiembre 24, Col. Sta. Ma. Tepepan, Xochimilco.	Masa	Sin datos	C	Sin datos	Sin datos	50
59. San Pablo-Jacarandas. La cañada, Pueblo San Lucas, Xochimilco.	Masa	Sin datos	P	Blanco	Sinaloa	150-170
60. Cuauhtémoc 3, Barrio Cristo Rey, Xochimilco.	Masa	Sin datos	P	Blanco	Sin datos	250
61. Avenida de las Torres 15, Ampliación Tetepan. Xochimilco.	Masa	Sin datos	C	Sin datos	Sin datos	350-400
62. Mercado de Fco. I. Madero 377, Barrio Santa Crucita. Xochimilco.	Masa	Sin datos	C	Blanco/Amar.	Sin datos	Sin datos
63. Walmart, Av. Universidad 936 A, Col. Sta. Cruz Atoyac, B. Juárez.	H (Maseca)	Sin datos	Sin datos	Blanco	Sin datos	150
64. Walmart, Calz. Tlapan 1037, Col. Nativitas. B. Juárez.	H (Maseca)	Sin datos	Sin datos	Blanco/Amar.	Sin datos	800
65. Sumesa, Romero de Terreros y Diag.San Antonio,Del Valle,B. Juárez.	H (Maseca)	Sin datos	Sin datos	Blanco	Sin datos	450-500
66. Jesús Urueta 15 ACC-1, Col. Moderna, B. Juárez.	Masa	Sin datos	C	Blanco	Sin datos	250-300
67. Romero de Terreros 1359, Col. Navarte, B. Juárez.	Masa	Sin datos	C	Blanco	Tlanepantla	300-350
68. San Felipe s/n Pueblo Xoco x Cineteca, B. Juárez.	Masa	Sin datos	C	Sin datos	Sin datos	200
69. Sumesa, Monte Athos y Cda. Monte Libano, M.Hidalgo.	H (Minsa)	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Sin datos	672
70. Sumesa Virgilio 15 Col. Polanco. M. Hidalgo.	H (Minsa)	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Sin datos	150
71. Bodega La Comercial,Calz. México Tacuba 911,Huichiapan, M.Hidalgo	H (Maseca)	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Sin datos
72. Calle J.M. Mendivil esq. Monterde, Col. Américas, M. Hidalgo.	Mezcla	Masa/Minsa 25:3 kg	C	Blanco	Oaxaca	500
73. Laguna de Términos 310, Col. Anáhuac, M. Hidalgo.	Masa	Sin datos	P	Blanco	Sinaloa	500
74. Calle Gazcasónica, Col. Tacuba, M. Hidalgo.	Masa	Sin datos	C	Blanco	Sin datos	1500
75. E.Zapata-Samuel Viguerras, Pueblo San Nicolás Tetelco, Tláhuac.	Masa	Sin datos	C	Blanco	Sin datos	100-150
76. Mercado Mizquic, Local 57, Mizquic, Tláhuac.	Sin datos	No dieron datos	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Sin datos
77. Mercado San Juan Ixtayopan, San Juan Ixtayopan, Tláhuac.	Masa	Sin datos	P	Amarillo	Sin datos	500
78. Buena Suerte (Cocodrilo) frente al N° 154-187, Los Olivos, Tláhuac.	Masa	Sin datos	C	Amarillo	Sinaloa	300-350
79. Mercado Tláhuac, Local de la esquina con Molino Centro de Tláhuac.	Masa	Sin datos	P	Blanco	Bajío, Sinaloa	280
80. N.Bravo esq. 20 de Noviembre, Mz. 16, Lte. 1, San Mateo, Tláhuac.	Masa	Sin datos	C	Blanco	Sin datos	500
81. Superama Periférico- Luis Cabrera, M. Contreras	H (Maseca)	Sin datos	Sin datos	Blanco	Sin datos	250

ANEXO 1: Continuación

N° de Muestra, lugar.	Masa /Harina (H)/ Mezcla	Proporción de la mezcla	Masa propia (P) /comprada (C)	Color de maíz:blanco, amarillo, azul	Origen del maíz	Venta kg/día
82. Emiliano Zapata frente 9 bis, San Bernabé Ocoatepec, M.Contreras.	Masa	Sin datos	C	Blanco	Sin datos	350
83. Calle Independencia No. 22B. San Nicolas Totolapan. M. Contreras	Masa	Sin datos	C	Amarillo	Sin datos	250-300
84. Calle San Francisco 503. Barrio Sn Francisco, M. Contreras.	Masa	Sin datos	P	Blanco	Portimex	150
85. Lázaro Cárdenas 3, Col. El Tanque, M. Contreras.	Masa	Sin datos	P	Blanco	Cargill Gto/Sin.	Sin datos
86. Av. Río Magdalena, Mercado la Cruz, M. Contreras.	Mezcla	Masa/Minsa 2:1 kg	C	Blanco	Sin datos	600
87. Superama, Av. Noche de Paz 38, Col Granjas Navidad, Cuajimalpa.	H (Maseca)	Sin datos	Sin datos	Blanco	Sin datos	350-370
88. Com.Mex.,Av.Bosques de Reforma 1813,Vista Hermosa, Cuajimalpa.	H (Minsa)	Sin datos	Sin datos	Blanco	Sin datos	700
89. Superama, Paseo de las Lilas 92, Bosques de Reforma, Cuajimalpa.	H (Minsa)	Sin datos	Sin datos	Blanco	Sin datos	Sin datos
90. Piñón esq. Sauce,Col. San José de los Cedros, Cuajimalpa.	Masa	Sin datos	C	Blanco	Sin datos	350
91. Calle Navidad Mz.7, Lte. 9, Col. La Navidad, Cuajimalpa.	Mezcla	Masa/Maseca 90:10 kg	C	Blanco	Sin datos	350
92. Lic. Castillo Ledón 117, Col. Pueblo Cuajimalpa, Cuajimalpa.	Masa	Sin datos	C	Blanco	Sin datos	470
93. Av. Hidalgo, Plaza San Martín San Pedro Actopan, M. Alta	Masa	Sin datos	P	Criollo	De la región	Sin datos
94. Calle Guanajuato Mercado Benito Juárez, Villa Milpa Alta, M. Alta.	Masa	Sin datos	P	Blanco	Sonora	800
95. Mercado Santa Ana Tlacotenco, M. Alta.	Mezcla	Masa/Maseca 50:10 kg	P	Blanco	Sin datos	450
96. Mercado San Pedro Actopan, Gabino Barreda, M. Alta.	Masa	Sin datos	C	Blanco	La región	80-200
97. Av. Constitución esq. Tamaulipas Sur, Pueblo Villa Milpa Alta, M.Alta.	Masa	Sin datos	C	Azul	Morelos	200
98. Fabián Flores Pte., San Pablo Oztotepec, M. Alta.	Masa	Sin datos	C	Blanco	Sin datos	Sin datos

SD=Sin datos

Tabla 38. Segundo muestreo (Lluvias 2006).

N° de Muestra, lugar.	Masa /Harina/ Mezcla	Proporción de la mezcla	Masa propia / comprada	Color de maíz: blanco, amarillo, azul	Origen del maíz	Venta kg/día
1. Comercial Mex., Ermita Iztap.2955, Ampliación Sn Miguel, Iztapalapa.	H (Maseca)	Sin datos	Sin datos	B	Sin datos	450-500
2. Megacomercial, Calz de la Viga 1381, Col. El Retoño, Iztapalapa.	H (Maseca)	Sin datos	Sin datos	B	Sin datos	500-600
3. Walmart, Canal de Tezontle 1520, Dr. A Ortiz Tirado, Iztapalapa.	H (Maseca)	Sin datos	Sin datos	A	Sin datos	650-675
4. Walmart, Av. Tláhuac 5662, Iztapalapa.	H (Maseca)	Sin datos	Sin datos	A	Estados	690
5. Mercado Constitución de 1917, Iztapalapa.	Masa	Sin datos	C	A	Estados	750
6. 3ª Cerrada de Retoño esq. Calle Retoño, Col. El Retoño, Iztapalapa.	Mezcla	Masa/Agroinsa 50:6kg		A	Estados	600
7. Calle Emilio Carranza 281, San Andrés Tetepilco, Iztapalapa.	Masa	Sin datos	P	B	Guanajuato	550
8. Walmart, Calz. Guadalupe 431, Col. Gpe. Tepeyac, G.A.Madero.	H (Maseca)	Sin datos	Sin datos	B	Sin datos	1500
9. Bodega Comer. Mex. V. Carranza 100, Barrio Coatepec G.A.Madero.	H (Maseca)	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Sin datos
10. Superama, Av. Montevideo 360, Av. Politécnico, Lindavista, G.A.Madero	H (Maseca)	Sin datos	Sin datos		Sin datos	450
11. Calle la Esperanza 95, Col. Industrial, G.A.Madero.	Masa	Sin datos	C	A	Sin datos	300
12. Av. Emiliano Zapata 75, Col. Zona escolar, Cuauhtémoc, G.A.Madero.	Masa	Sin datos	C	B	Sin datos	125
13. Poniente 124 N° 405, Col. Nueva Vallejo, G.A.Madero.	Masa	Sin datos	C	Sin datos	Sin datos	200
14. Superama Pedregal, Agua, Jardines del Pedregal, A. Obregón.	H (Maseca)	Sin datos	Sin datos	B	Sin datos	250
15. Bodega Gigante, Tamaulipas 1236, Edo. de Hidalgo, A. Obregón.	H (Minsa)	Sin datos	Sin datos	A	Sin datos	Sin datos
16. Bodega Aurrera, Observatorio 457, Las Américas, A. Obregón.	H (Maseca)	Sin datos	Sin datos	B	Sin datos	Sin datos
17. José Ma. Morelos, Mz. 67, Lte. 2 Bis. Torres de Potrero, A. Obregón.	Masa	Sin datos	C	B	Sin datos	320-350
18. Av. Tamaulipas 1306, Col. Corpus Christi, A. Obregón.	Masa	Sin datos	C	A	Sonora	400
19. Ricardo Castro 28, Col. Guadalupe Inn, A. Obregón.	Masa	Sin datos	P	B	Sinaloa	450
20. Superama, Río Churubusco y Centenario, Del Carmen, Coyoacán.	H (Minsa)	Sin datos	Sin datos	B	Sin datos	300
21. Comercial Mexicana, Parque Comercial Gran Sur, Coyoacán.	H (Maseca)	Sin datos	Sin datos	B	Sin datos	370
22. Calzada de la Salud-Escuela Naval Militar, Coyoacán.	H (Maseca)	Sin datos	Sin datos	B	Sin datos	680
23. Av. Pacífico 33, Col. Los Reyes, Coyoacán.	Masa	Sin datos	P	B	Sin datos	450
24. Anacahuíta 40, Col. Pedregal de Santo Domingo, Coyoacán.	Mezcla	Masa/Minsa 50:10 kg	C	A	Sin datos	175-250
25. Mercado Educación, Col. Educación, Coyoacán	Masa		P	A	Sin datos	380
26. Chedraui, Carr. Picacho-Ajusco 175. Héroes de Padierna, Tlalpan.	H (Maseca)	Sin datos	Sin datos	A	Sin datos	350
27. Bodega Comercial Mexicana de la Fama. Col. La Fama, Tlalpan.	H (Minsa)	Sin datos	Sin datos	A	Sin datos	250
28. Comercial Mex., Canal de Miramontes y Calz. Del Hueso, Tlalpan.	H (Maseca)	Sin datos	Sin datos	B	Sin datos	350
29. Calle 7, Mz. 23, Lte. 7, Col. Ampliación, M. Hidalgo, Tlalpan.	Mezcla	Masa/Minsa 25:5 kg	C	A	Sin datos	300
30. Norte 1 esq. Oriente 1, Col. Isidro Fabela, Tlalpan.	Masa		C	A	Sin datos	175-200
31. Calle San Martín 27, San Pedro Mártir, Tlalpan.	Mezcla	Masa/Maseca 50:5 kg	C	A	Sin datos	350-375
32. Comercial Mex., Calz. Chabacano 43, Col. Asturias, Cuauhtémoc.	H (Maseca)	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Sin datos
33. Bodega Comer., Venustiano Carranza 125 Col. Centro, Cuauhtémoc.	H (Maseca)	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Sin datos
34. Mega, Calz. de la Ronda 88, Col. Ex -Hipódromo Peralvillo, Cuauh.	H (Maseca)	Sin datos	Sin datos	B	Sin datos	300
35. Calle Chihuahua 140, Col. Roma, Cuauhtémoc.	Mezcla	Sin datos	C	B	Sin datos	300
36. Calle del 57 N°. 16, Col. Centro, Cuauhtémoc.	Masa	Sin datos	C	B	Sin datos	300
37. Calle Ciprés N°. 13, Col. Sta. Ma. La Ribera, Cuauhtémoc.	Masa	Sin datos	P	B	Sin datos	600
38. Walmart, Calz Ignacio Zaragoza 58, Col. Federal, V. Carranza.	Sin dato	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Sin datos

ANEXO 1: Continuación

N° de Muestra, lugar.	Masa /Harina/ Mezcla	Proporción de la mezcla	Masa propia / comprada	Color de maíz: blanco, amarillo, azul	Origen del maíz	Venta kg/día
39. Fray Servando Teresa de Mier 881. Jardín Balbuena, V. Carranza.	H(Maseca)	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Sin datos
40. Calle Anfora N°. 241, Col. Madero, V. Carranza.	H(Maseca)	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Sin datos
41. Calle Norte 178 y Esterlinas. Col. Pensador Mexicano. V. Carranza.	Masa	Sin Datos	C	Blanco	Sin datos	Sin datos
42. Alfonso Ceballos N°. 43, Col Moctezuma, V. Carranza.	Masa	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Sin datos
43. Av. Del Taller 502, Col. Jardín Balbuena, V. Carranza.	Mezcla	INP	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Sin datos
44. Relaciones Exteriores N°. 2, Col. Federal, V. Carranza.	Masa	Sin datos	C	B	Sin datos	Sin datos
45. Walmart, Nextengo 78, Sta. Cruz Acayucan, Azcapotzalco.	H (Maseca)	Sin datos	Sin datos	Sin dato	Sin datos	Sin datos
46. Walmart, Av. Cuittláhuac 3651. Col. Hogar y Seguridad, Azcap.	H (Minsa)	Sin datos	Sin datos	Sin dato	Sin datos	Sin datos
47. Bodega Comercial, Av. Azcapotzalco 527, Azcapotzalco.	H (Maseca)	Sin datos	Sin datos	Sin dato	Sin datos	Sin datos
48. Calle 12, Col. Prohogar, Azcapotzalco.	Masa	Sin datos	C	A	Sin datos	Sin datos
49. Av. Jardín 36-1. Col. del Gas, Azcapotzalco.	Mezcla	70kg masa 1/5 bto H	C	B	Sin datos	Sin datos
50. Av. Real de San Martín N°. 194 A, Col. Nueva España, Azcapotzalco.	Masa	Sin datos	P	B	Sin datos	150-200
51. Bodega Aurrerá, Tezontle esq Apatlaco, Col Apatlaco, Iztacalco.	H (Maseca)	Sin datos	Sin datos	A	Sin datos	300
52. Bodega Gigante, Av. La Viga 627, Barrio Zapotla, Iztacalco.	H (Maseca)	Sin datos	Sin datos	A	Sin datos	380
53. Puebla y Calle 5, Col Agrícola Pantitlán, Iztacalco.	Mezcla	Masa/Maseca 50:5 kg	C	A	Sin datos	350-375
54. Oriente 259, esq Sur 28, Col. Agrícola Oriental, Iztacalco.	Mezcla	Masa/Maseca 50:5 kg	C	A	Sin datos	450
55. Oriente 259, N°. 230 esq. Sur 18B, Agrícola Oriental, Iztacalco.	Mezcla	Masa/Agroinsa 50:5 kg	C	B	Sin datos	350-400
56. Sur 159 No. 125, Col. Ampliación Ramos Millán, Iztacalco.	Mezcla	Masa/Minsa	C	B	Sin datos	Sin datos
57. Matamoros y J.O. de Domínguez. Barrio Sn Juan Centro, Xochimilco.	Masa	Sin datos	C	B	Sin datos	350
58. Av. 16 de Septiembre N°. 24, Col. Sta. Ma. Tepepan, Xochimilco.	Masa	Sin datos	C	A	Sin datos	270-300
59. San Pablo-Jacarandas, La cañada, Pueblo San Lucas, Xochimilco.	Masa	Sin datos	P	B	Sinaloa	270
60. Cuauhtémoc N°. 3, Barrio Cristo Rey, Xochimilco.	Masa	Sin datos	C	A	Sin datos	350
61. Avenida de las Torres 15, Ampliación Tepepan, Xochimilco.	Masa	Sin datos	C	A	Sin datos	370
62. Calle Fco. I. Madero, Mercado de 377, Barrio Sta. Crucita, Xochimilco.	Masa	Sin datos	C	B	Sin datos	Sin datos
63. Walmart , Av Universidad 936 A, Col. Sta Cruz Atoyac, B.Juárez.	H (Maseca)	Sin datos	Sin datos	A	Sin datos	900
64. Walmart, Calz. Tlapan 1037, Col. Nativitas, B.Juárez.	H (Maseca)	Sin datos	Sin datos	A	Sin datos	800
65. Superama Romero de Terreros y Dgna Sn Antonio, Del Valle, B.J.	H (Maseca)	Sin datos	Sin datos	B	Sin datos	360
66. Jesús Urueta 15 ACC-1, Col. Moderna, B.Juárez.	Masa	Sin datos	C	A	Sin datos	250-300
67. Romero de Terreros 1359, Col. Navarte, B.Juárez.	Masa	Sin datos	C	B	Edo. Mex	320-380
68. San Felipe s/n Pueblo Xoco x Cineteca, B.Juárez.	Masa	Sin datos	C	Sin datos	Sin datos	250
69. Sumesa Monte Athos y Cda. Monte Libano, Miguel Hidalgo.	H (Minsa)	Sin datos	Sin datos	B	Sin datos	440
70. Sumesa Virgilio 15, Col. Polanco, Miguel Hidalgo.	H (Minsa)	Sin datos	Sin datos	Sin Dato	Sin Dato	Sin datos
71. Bodega La Comercial, Calz. México Tacuba 911, Huichiapan, M. Hgo.	H (Maseca)	Sin datos	Sin datos	B	Sin datos	245
72. Calle J.M. Mendivil esq. Monterde. Col. Américas, Miguel Hidalgo.	Mezcla	Masa/Maseca 50:20 kg	C	B	Sin datos	400
73. Laguna de Términos 310. Col. Anahuác, Miguel Hidalgo.	Masa	Sin datos	P	B	Sonora	500
74. Calle Gazcasónica, Col. Tacuba, Miguel Hidalgo.	Masa	Sin datos	P	B	Sin datos	600
75. E.Zapata-Samuel Viguera Pueblo San Nicolás Tetelco, Tláhuac.	Masa	Sin datos	C	B	Sin datos	600
76. Mercado Mizquic local 57, Mizquic, Tláhuac.	Masa	Sin datos	C	A	Cargill	400
77. Mercado San Juan Ixtayopan, San Juan Ixtayopan, Tláhuac.	Masa	Sin datos	C	B	Cargill	270
78. Buena Suerte (Cocodrilo) frente al N° 154-187, Los Olivos, Tláhuac.	Mezcla	Masa/Maseca 50:5 kg	C	A	Sin datos	350

ANEXO 1: Continuación

N° de Muestra, lugar.	Masa /Harina/ Mezcla	Proporción de la mezcla	Masa propia / comprada	Color de maíz: blanco, amarillo, azul	Origen del maíz	Venta kg/día
79. Mercado Tláhuac, local de la esquina con Molino Centro de Tláhuac.	Mezcla	Masa/Maseca sin datos	P	B	Sinaloa	1500
80. N.Bravo, esq 20 de Noviembre, Mz. 16 Lte. 1, San Mateo, Tláhuac.	Masa	Sin datos	C	B	Sin datos	300
81. Superama Periférico- Luis Cabrera, M. Contreras.	H (Maseca)	Sin datos		B	Sin datos	250
82. Emiliano Zapata frente 9 bis. San Bernabé Ocotepc, M. Contreras.	Masa	Sin datos	C	B	Cargill	350-370
83. Calle Independencia No. 22B, San Nicolas Totolapan, M. Contreras.	Mezcla	Masa/Maseca 50:5 kg	C	A	Sin datos	280-300
84. Calle San Francisco 503. Barrio Sn Francisco, M. Contreras.	Masa	Sin datos	C	A		350-450
85. Lázaro Cárdenas No. 3, Col. el Tanque, M. Contreras.	Masa	Sin datos	P	B	Sin/Gto	1000
86. Av Río Magdalena, Mercado La Cruz, M. Contreras.	Mezcla	Masa/Maseca 50:5 kg	Sin datos	B	Sin datos	380
87. Superama, Av. Noche de Paz 38, Col Granjas Navidad, Cuajimalpa.	H (Maseca)	Sin datos	Sin datos	B	Sin datos	350-400
88. Com.Mex.Av.Bosques de Reforma 1813, Vista Hermosa, Cuajimalpa.	H (Maseca)	Sin datos	Sin datos	B	Sin datos	750
89. Superama, Paseo de las Lilas 92. Bosques de Reforma, Cuajimalpa.	H (Maseca)	Sin datos	Sin datos	A	Sin datos	350-450
90. Piñon, esq. Sauce, Col. San José de los Cedros, Cuajimalpa.	Masa	Sin datos	C	B	Cargill	750-800
91. Calle Navidad, Mz.7, Lte. 9, Col. La Navidad, Cuajimalpa.	Mezcla	Masa/Maseca SD	C	A	Sin datos	400
92. Lic. Castillo Ledón 117, Col. Pueblo Cuajimalpa, Cuajimalpa.	Masa	Sin datos	C	A	Sin datos	400
93. Av. Hidalgo, Plaza San Martín, San Pedro Actopan, Milpa Alta.	Masa	Sin datos	P	B	Sin datos	Sin datos
94. Calle Guanajuato, Mercado Benito Juárez, Villa Milpa Alta, M. Alta.	Masa	Sin datos	P	B	Sonora	750
95. Mercado Santa Ana Tlacotenco, Milpa Alta.	Mezcla	Masa/Maseca 50:10 kg	C	B	Sin datos	450
96. Mercado San Pedro Actopan, Gabino Barreda, Milpa Alta.	Mezcla	Masa/Maseca 50:7 kg	C	A	Sin datos	450
97. Av. Constitución, esq Tamaulipas Sur Pueblo Villa, Milpa Alta.	Masa	Sin datos	P	Azul	Morelos	150
98. Fabián Flores Pte. San Pablo Oztotepec, Milpa Alta.	Masa	Sin datos	C	B	Sin datos	350-400

SD=Sin datos

Tabla 39. Tercer muestreo (secas 2007).

N° de Muestra, lugar.	Masa /Harina/ Mezcla	Proporción de la mezcla	Masa propia / comprada	Color de maíz: blanco, amarillo, azul	Origen del maíz	Venta kg/día
1. Comercial Mex., Ermita Iztap.2955, Ampliación Sn Miguel, Iztapalapa.	H (Maseca)	Sin datos	Sin datos	B	Estados	650-750
2. Megacomercial, Calz de la Viga 1381, Col. El Retoño, Iztapalapa.	H (Maseca)	Sin datos	Sin datos	B	Estados	630
3. Walmart, Canal de Tezontle 1520, Dr. A Ortiz Tirado, Iztapalapa.	H (Maseca)	Sin datos	Sin datos	B	Estados	670
4. Walmart, Av. Tláhuac 5662, Iztapalapa.	H (Maseca)	Sin datos	Sin datos	A	Estados	500
5. Mercado Constitución de 1917, Iztapalapa.	Masa	Sin datos	C	A	Estados	400-450
6. 3ª Cerrada de Retoño esq calle retoño Col. El Retoño. Iztapalapa	Mezcla	Masa/Agroinsa 50:5 kg	C	A	Estados	380
7. Calle Emilio Carranza No. 281. San Andrés Tetepilco. Iztapalapa	Masa	Sin datos	P	B	Sinaloa	350
8. Walmart Calz. Guadalupe 431. Col. Gpe. Tepeyac GAM.	H (Maseca)	Sin datos	Sin datos	A	Estados	650
9. Bodega Comer. Mex. V. Carranza 100 Barrio Coatepec GAM	H (Maseca)	Sin datos	Sin datos	B	Estados	250
10. Superama Av Montevideo # 360 Av. Politécnico. Lindavista. GAM	H (Maseca)	Sin datos	Sin datos	B	Sin datos	350
11. Calle la esperanza No.-95 Col. Industrial. GAM	Masa	Sin datos	C	A	Sin datos	170
12. Av. Emiliano Zapata No. 75. Col. Zona escolar, Cuauhtémoc, GAM	Masa	Sin datos	C	B	Sin datos	150
13. Poniente 124 No. 405. Col. Nueva Vallejo. GAM	Masa	Sin datos	C	A	Estados	390-400
14. Superama Pedregal. Agua. Jardines del Pedregal. A. Obregón	H (Maseca)	Sin datos	Sin datos	B	Estados	350
15. Bodega Gigante Tamaulipas 1236.Edo.de Hidalgo, A. Obregón.	H (Maseca)	Sin datos	Sin datos	B	Sin datos	Sin datos
16. Bodega Aurrera. Observatorio 457. Las Américas. A. Obregón	Masa	Sin datos	Sin datos	Sin datos		
17. José Ma.Morelos Mz.67, Lte.2Bis. Torres de Potrero. A. Obregón	Masa	Sin datos	Sin datos	Sin datos		
18. Av. Tamaulipas 1306 Col. Corpus Christi. A. Obregón	Masa	Sin datos	Sin datos	Sin datos		
19. Ricardo Castro 28, Col. Guadalupe Inn. A. Obregón	Masa	Sin datos	P	B	Sinaloa	350
20. Superama Rio Churubusco y Centenario. Del Carmen, Coyoacán.	H(Minsa)	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Sin dato
21. Comercial Mexicana Parque Comercial Gran Sur. Coyoacan.	H (Maseca)	Sin datos	Sin datos	B	Estados	430
22. Calzada de la Salud-Esc. Naval Militar, Coyoacan.	H (Maseca)	Sin datos	Sin datos	B	Estados	670
23. Av. Pacifico No. 331. Col Los reyes Coyoacan.	Masa	Sin datos	P	B	Estados	550
24. Anacahuíta 40 Col. Pedregal de Santo Domingo, Coyoacan.	Mezcla	Masa/Minsa 50:10 kg	C	A	Estados	370
25. Mercado Educación, Col Educación. Coyoacan	Masa	Sin datos	C	B	Estados	450-500
26. Chedraui Carr. Picacho-Ajusco 175. Héroes de Padierna. Tlalpan	H (Maseca)	Sin datos	Sin datos	B	Estados	450
27. Bodega Comercial Mexicana de la Fama. Col. La fama. Talpan	H (sin dato)	Sin datos	Sin datos	Sin dato	Sin dato	Sin dato
28A. Comercial Mex. Canal de Miramontes y Calz. Del. Hueso. Tlalpan	H (Maseca)	Sin datos	Sin datos	B	Estados	470
29. Calle 7 Mz. 23 Lte. 7 Col. Ampliación M. Hidalgo, Tlalpan.	Mezcla	Masa/Maseca 50:5 kg	C	A	Estados	470
30. Norte 1 esq Oriente 1 Col. Isidro Fabela, Tlalpan D.F.	Mezcla	Sin dato	C	A	Estados	370
31. Calle San Martín No. 27 San Pedro Mártir Tlalpan.	Mezcla	Masa/Maseca 50:5 kg	C	B	Estados	630
32. Comercial Mex. Calz. Chabacano 43 Col. Asturias, Cuauhtémoc.	H (Maseca)	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Sin datos
33. Bodega Comer Venustiano Carranza 125 Col. Centro. Cuauhtémoc.	H (Maseca)	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Sin datos
34. Mega Calz. de la Ronda 88 Col. Ex -Hipódromo Peralvillo, Cuauh.	H (Maseca)	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Sin datos
35. Calle Chihuahua 140 Col. Roma, Cuauhtémoc.	Masa	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Sin datos
36. Calle del 57 No. 16. Col. Centro, Cuauhtémoc.	Masa	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Sin datos
37. Calle Ciprés No. 13. Col Sta. Ma. La Ribiera Cuauhtémoc.	Masa	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Sin datos
38. Walmart. Calz Ignacio Zaragoza 58 Col. Federal. VC	H(Maseca)	Sin datos	Sin datos	B	Estados	550
39. Fray Servando Teresa de Mier 881. Jardín Balbuena. VC	H(Maseca)	Sin datos	Sin datos	B	Sin dato	500-550
40. Calle Anfora No. 241 Chedraui, Col. Madero. VC	H(Maseca)	Sin datos	Sin datos	Sin dato	Sin dato	Sin dato
41. Calle norte 178 y Esterlinas. Col. Pensador Mexicano. VC.	Masa	Sin datos	C	B	Estados	390

ANEXO 1: Continuación

N° de Muestra, lugar.	Masa /Harina/ Mezcla	Proporción de la mezcla	Masa propia / comprada	Color de maíz: blanco, amarillo, azul	Origen del maíz	Venta kg/día
42. Alfonso Ceballos No. 43. Col Moctezuma. VC	Masa	Sin datos	C	A	Sin dato	270-300
43. Av. Del Taller 502. Col. Jardín Balbuena.VC	Mezcla	Masa/Maseca 50:3 kg	C	B	Estados	370-400
44. Relaciones exteriores No. 2 Col. Federal. VC.	Masa	Sin datos	C	A	Estados	350
45. Walmart Nextengo 78, Sta. Cruz Acayucan Azcapotzalco.	H (Maseca)	Sin datos	Sin datos	B	Estados	250
46. Walmart Av. Cuitláhuac 3651. Col. Hogar y Seguridad. Azcapo.	H(Maseca)	Sin datos	Sin datos	B	Estados	650
47. Bodega Comercial. Av. Azcapotzalco 527 Azcapotzalco. Azcapo.	H (Maseca)	Sin datos	Sin datos	B	Estados	450
48. Calle 12, Col. Prohogar, Azcapo.	Masa	Sin datos	C	A	Estados	300-350
49. Av. Jardin No. 36-1. Col del gas. Azcapo.	Masa	Sin datos	C	A	Sin datos	380
50. Av. Real de San Martín No. 194 A. Col. Nueva España. Azcapo.	Masa	Sin datos	C	B	Estados	300-370
51. Bodega Aurrera. Tezontle esq Apatlaco. Col Apatlaco. Iztacalco.	H (Maseca)	Sin datos		A	Estados	370
52. Bodega Gigante Av. La viga No. 627, Barrio Zapotla. Iztacalco.	H (Minsa)	Sin datos		A	Estados	450-500
53. Puebla y calle 5. Col Agrícola Pantitlán, Iztacalco	Mezcla	Masa/Maseca 50:7 kg	C	A	Estados	260
54. Oriente 259 esq Sur 28. Col Agrícola Oriental. Iztacalco	Mezcla	Masa/Maseca 50:5 kg	C	B	Sin datos	450
55. Oriente 259 No. 230 esq. Sur 18B, Agrícola Oriental. Iztacalco.	Mezcla	Masa/Agroinsa 50:5 kg	C	B	Sin datos	350-400
56. Sur 159 No. 125. Col. Ampliación Ramos Millan. Iztacalco	Mezcla	Masa/Minsa	C	B	Sin datos	Sin dato
57. Matamoros y J.Ortiz de Domínguez. Barrio San Juan Centro. Xoch.	Masa	Sin datos	C	B	Sin datos	350
58. Av. 16 de septiembre No. 24. Col. Sta. Ma. Tepepan, Xoch.	Masa	Sin datos	C	A	Sin datos	270-300
59. San Pablo-Jacarandas. La cañada, Pueblo San Lucas, Xoch.	Masa	Sin datos	P	B	Sinaloa	270
60. Cuauhtémoc No. 3, Barrio Cristo Rey, Xoch.	Masa	Sin datos	C	A	Sin datos	350
61. Avenida de las Torres 15 Ampliación Tetepan.	Masa	Sin datos	C	A	Sin datos	370
62. Calle Fco. I. Madero Mercado de 377. Barrio Santa Crucita. Xoch.	Masa	Sin datos	C	B	Sin datos	Sin datos
63. Walmart Av Universidad 936 A Col. Sta Cruz Atoyac, B.J.	H (Maseca)	Sin datos	Sin datos	A	Sin datos	900
64. Walmart Calz. Tlapan 1037 Col. Nativitas. B.J.	H (Maseca)	Sin datos	Sin datos	A	Sin datos	800
65. Superama Romero de Terreros y Diagonal Sn Antonio Del Valle, B.J.	H (Maseca)	Sin datos	Sin datos	B	Sin datos	360
66. 4. Jesús Urueta 15 ACC-1 Col. Moderna,B.J.	Masa	Sin datos	C	A	Sin datos	250-300
67. Romero de Terreros 1359. Col. Narvarte, B.J.	Masa	Sin datos	C	B	Edo. Mex	320-380
68. San Felipe s/n Pueblo Xoco x Cineteca, B.J.	Masa	Sin datos	C	Sin datos	Sin datos	250
69. Sumesa Monte Athos y Cda Monte Líbano, M.H.	H (Minsa)	Sin datos	Sin datos	B	Sin datos	440
70. Sumesa Virgilio 15 Col. Polanco. M.H.	H (Minsa)	Sin datos	Sin datos	Sin dato	Sin dato	Sin dato
71. Bodega La Comercial. Calz. México Tacuba 911 Huichiapan, M.H.	H (Maseca)	Sin datos	Sin datos	B	Sin datos	245
72. Calle JM. Mendivil esq. Monterde. Col. Américas, M.H.	Mezcla	Masa/Maseca 50:20 kg	C	B	Sin datos	400
73. Laguna de Términos 310. Col. Anahuác, M.H.	Masa	Sin datos	P	B	Sonora	500
74. Calle Gazcasonica. Col. Tacaba, M.H.	Masa	Sin datos	P	B	Sin datos	600
75. E.Zapata-Samuel Viguera Pueblo San Nicolás Tetelco, Tláhuac	Masa	Sin datos	C	B	Sin datos	600
76. Mercado Mizquic local 57. Mizquic, Tláhuac.	Masa	Sin datos	C	A	Cargill	400
77. Mercado san Juan Ixtayopan, San Juan Ixtayopan, Tláhuac.	Masa	Sin datos	C	B	Cargill	270
78. Buena Suerte (Cocodrilo) frente al N° 154-187. Los Olivos. Tláhuac.	Mezcla	Masa/Maseca 50:5 kg	C	A	Sin datos	350
79. Mercado Tláhuac local de la esquina con molino centro de Tláhuac.	Mezcla	Masa/Maseca sin dato	P	B	Sinaloa	1500
80. N.Bravo esq 20 de Noviembre Mz. 16 Lte. 1, San Mateo. Tláhuac	Masa	Sin datos	C	B	Sin datos	300
81. Superama Periférico- Luis Cabrera	H (Maseca)	Sin datos	Sin datos	B	Sin datos	250
82. Emiliano Zapata frente 9bis. San Bernabé Ocotepc. M.Contreras	Masa	Sin datos	C	B	Cargill	350-370
83. Calle Independencia No. 22B. San Nicolás Totolapan. M. Contreras	Mezcla	Masa/Maseca 50:5 kg	C	A	Sin datos	280-300

ANEXO 1: Continuación

N° de Muestra, lugar.	Masa /Harina/ Mezcla	Proporción de la mezcla	Masa propia / comprada	Color de maíz: blanco, amarillo, azul	Origen del maíz	Venta kg/día
84. Calle San Francisco 503. Barrio Sn Francisco, Magdalena Contreras	Masa	Sin datos	C	A	Sin dato	350-450
85. Lázaro Cardenas No. 3 Col. el Tanque. M. Contreras	Masa	Sin datos	P	B	Sin/Gto	1000
86. Av Río Magdalena Mercado la Cruz. M. Contreras	Mezcla	Masa/Maseca 50:5 kg	Sin datos	B	Sin datos	380
87. Superama. Av. Noche de Paz 38. Col Granjas Navidad. Cuajimalpa	H (Maseca)	Sin datos	Sin datos	B	Sin datos	350-400
88. Com.Mex.Av.Bosques de Reforma 1813. Vista Hermosa. Cuajimalpa	H (Maseca)	Sin datos	Sin datos	B	Sin datos	750
89. Superama, Paseo de las Lilas 92. Bosques de Reforma. Cuajimalpa	H (Maseca)	Sin datos	Sin datos	A	Sin datos	350-450
90. Piñon esq Sauce Col. San José de los Cedros. Cuajimalpa	Masa	Sin datos	C	B	Cargill	750-800
91. Calle Naviad Mz7 Lte. 9. Col La Navidad. Cuajimalpa	Mezcla	Masa/Maseca SD	C	A	Sin datos	400
92. Lic. Castillo Ledón 117 Col. Pueblo Cuajimalpa. Cuajimalpa	Masa	Sin datos	C	A	Sin datos	400
93. Av. Hidalgo, Plaza San Martín San Pedro Actópan. M.Alta	Masa	Sin datos	P	B	Sin datos	Sin datos
94. Calle Guanajuato Mercado Benito Juarez. Villa Milpa Alta. M.Alta	Masa	Sin datos	P	B	Sonora	750
95. Mercado Santa Ana Tlacotenco, M.Alta	Mezcla	Masa/Maseca 50:10 kg	C	B	Sin datos	450
96. Mercado San Pedro Actopan. Gabino Barreda. Subdeleg. M.Alta	Mezcla	Masa/Maseca 50:7 kg	C	A	Sin datos	450
97. Av. Constitución esq Tamaulipas Sur Pueblo Villa Milpa Alta, M.Alta	Masa	Sin datos	P	Azul	Morelos	150
98. Fabián Flores Pte. San Pablo Oztotepec, M.Alta	Masa	Sin datos	C	B	Sin datos	350-400

SD= Sin datos.

Tabla 40. Cuarto muestreo (lluvias 2007).

N° de Muestra, lugar.	Masa /Harina/ Mezcla	Proporción de la mezcla	Masa propia / comprada	Color de maíz:blanco, amarillo, azul	Origen del maíz	Venta kg/día
1. Comercial Mex. Ermita Iztap.2955. Ampliación Sn Miguel Iztapalapa	H (Maseca)	Sin datos	Sin datos	B	Sin datos	200
2. Megacomercial Calz de la Viga 1381 Col. El Retoño, Iztapalapa	H (Maseca)	Sin datos	Sin datos	Sin dato	Sin dato	Sin dato
3. Walmart Canal de Tezontle 1520 Dr. A Ortiz Tirado, Iztapalapa.	H (Maseca)	Sin datos	Sin datos	B	Sin datos	Sin datos
4. Walmart Av. Tláhuac No. 5662, Iztapalapa	H (Maseca)	Sin datos	Sin datos	B	Estados	700
5. Mercado Constitución de 1917, Iztapalapa	Masa	Sin datos	C	A	Sin datos	250
6. 3ª Cerrada de Retoño esq calle retoño Col. El Retoño, Iztapalapa	Mezcla	Masa/Agroinsa 50:6 kg	C	A	Sin datos	250
7. Calle Emilio Carranza No. 281. San Andrés Tetepilco, Iztapalapa	Masa	Sin datos	P	B	Sinaloa Cargill	350
8. Walmart Calz. Guadalupe 431. Col. Gpe. Tepeyac, GAM.	H (Maseca)	Sin datos	Sin datos	B	Estados	600
9. Bodega Comer. Mex. V. Carranza 100 Barrio Coatepec, GAM	H (Maseca)	Sin datos	Sin datos	A	Estados	250
10. Superama Av Montevideo # 360 Av. Politécnico, Lindavista, GAM	H (Minsa)	Sin datos	Sin datos	B	Estados	200
11. Calle la esperanza No.-95 Col. Industrial, GAM	Masa	Sin datos	C	A	Estados	300
12. Av. Emiliano Zapata No. 75. Col. Zona escolar, Cuauhtémoc, GAM	Masa	Sin datos	C	A	Edo Mex.	250
13. Poniente 124 No. 405. Col. Nueva Vallejo, GAM	Masa	Sin datos	C	A	Estados	450
14. Superama Pedregal. Agua. Jardines del Pedregal, A. Obregón	H (Minsa)	Sin datos	Sin datos	Sin dato	Sin dato	150
15. Bodega Gigante Tamaulipas 1236. Edo. de Hidalgo, A. Obregón.	H (Maseca)	Sin datos	Sin datos	A	Estados	Sin dato
16. Bodega Aurrera. Observatorio 457. Las Américas, A. Obregón	H (Maseca)	Sin datos	Sin datos	Sin dato	Sin dato	Sin dato
17. José Ma. Morelos Mz.67, Lte.2Bis. Torres de Potrero, A. Obregón	Masa	Sin datos	P	B	Michoacan	300
18. Av. Tamaulipas 1306 Col. Corpus Christi, A. Obregón	Masa	Sin datos	P	A	Estados	300
19. Ricardo Castro 28, Col. Guadalupe Inn, A. Obregón	Masa	Sin datos	P	B	Sinaloa	350
20. Superama Río Churubusco y Centenario. Del Carmen, Coyoacán.	H (Minsa)	Sin datos	Sin datos	Sin dato	Sin dato	150
21. Comercial Mexicana Parque Comercial Gran Sur, Coyoacán.	H (Maseca)	Sin datos	Sin datos	Sin dato	Sin dato	Sin dato
22. Calzada de la Salud-Esc. Naval Militar, Coyoacán.	H (Maseca)	Sin datos	Sin datos	B	Estados	600
22B. Calzada de la Salud-Esc. Naval Militar, Coyoacán.	H (Maseca)	Sin datos	Sin datos	Azul	Estados	150
23. Av. Pacífico No. 331. Col Los Reyes, Coyoacán.	Masa	Sin datos	P	B	Estados	300
24. Anacahuita 40 Col. Pedregal de Santo Domingo, Coyoacán.	Mezcla	Masa/Minsa 50: 5 kg	C	A	Estados	150
25. Mercado Educación, Col Educación, Coyoacán	Masa	Sin datos	P	B	Puebla	375
26. Chedraui Carr. Picacho-Ajusco 175. Héroes de Padierna, Tlalpan	H (Maseca)	Sin datos	Sin datos	Sin dato	Sin dato	Sin dato
27. Bodega Comercial Mexicana de la Fama, Col. La Fama, Tlalpan	H (sin dato)	Sin datos	Sin datos	Sin dato	Sin dato	Sin dato
28A. Comercial Mex. Canal de Miramontes y Calz. Del. Hueso, Tlalpan	H (Maseca prem)	Sin datos	Sin datos	Sin dato	Sin dato	Sin dato
29. Calle 7 Mz. 23 Lte. 7 Col. Ampliación M. Hidalgo, Tlalpan.	Mezcla	Masa/Maseca 50:5 kg	P	A	Estados	300
30. Norte 1 esq Oriente 1 Col. Isidro Fabela, Tlalpan	Masa	Sin datos	C	A	Estados	100
31. Calle San Martín No. 27 San Pedro Mártir, Tlalpan.	Mezcla	Masa/Minsa 50:7 kg	C	A	Estados	200
32. Comercial Mex. Calz. Chabacano 43 Col. Asturias, Cuauh.	H (Maseca prem)	Sin datos	Sin datos	B	Estados	Sin dato
33. Bodega Comer Venustiano Carranza 125 Col. Centro, Cuauh.	H (Maseca)	Sin datos	Sin datos	B	Sin datos	350
34. Mega Calz. de la Ronda 88 Col. Ex -Hipódromo Peralvillo, Cuauh.	H (Maseca prem)	Sin datos	Sin datos	B	Estados	400
35. Calle Chihuahua 140 Col. Roma, Cuauhtémoc	Masa	Sin datos	C	A	Estados	270
36. Calle del 57 No. 16. Col. Centro, Cuauhtémoc	Masa	Sin datos	C	A	Estados	350
37. Calle Ciprés No. 13. Col Sta. Ma. La Ribera, Cuauhtémoc	Masa	Sin datos	P	B	Estados	600
38. Walmart. Calz Ignacio Zaragoza 58 Col. Federal, VC	H (Maseca)	Sin datos	Sin datos	B	Estados	Sin datos
39. Frav Servando Teresa de Mier 881. Jardín Balbuena, VC	H (Maseca)	Sin datos	Sin datos	B	Estados	350
40. Calle Anfora 241 Chedraui, Col. Madero, VC	H (Maseca)	Sin datos	Sin datos	A	Estados	Sin datos
41. Calle Norte 178 y Esterlinas, Col. Pensador Mexicano, VC.	Masa	Sin datos	C	A	Estados	250
42. Alfonso Ceballos 43, Col Moctezuma, VC	Masa	Sin datos	C	A	Guanajuato	270
43. Av. Del Taller 502. Col. Jardín Balbuena, VC	Mezcla	Masa/Maseca 50:5 kg	C	B	Estados	100
44. Relaciones Exteriores 2 Col. Federal, VC.	Masa	Sin datos	P	B	Sinaloa	120
45. Walmart Nextengo 78. Sta. Cruz Acayucan, Azcapotzalco	H (Maseca prem)	Sin datos	Sin datos	B	Estados	600

ANEXO 1: Continuación.

N° de Muestra, lugar.	Masa /Harina/ Mezcla	Proporción de la mezcla	Masa propia / comprada	Color de maíz:blanco,	Origen del maíz	Venta kg/día
46. Walmart Av. Cuitláhuac 3651. Col. Hogar y Seguridad. Azcapo.	H(Maseca prem)	Sin datos	Sin datos	B	Estados	Sin datos
47. Bodega Comercial. Av. Azcapotzalco 527 Azcapotzalco. Azcapo.	H (Maseca)	Sin datos	Sin datos	A	Estados	290
48. Calle 12. Col. Prohogar. Azcapozalco	Masa	Sin datos	Sin dato	Sin dato	Sin dato	Sin datos
49. Av. Jardín 36-1. Col del Gas, Azcapo.	Masa	Sin datos	P	B	Puebla	150
50. Av. Real de San Martín No. 194 A. Col. Nueva España, Azcapo.	Masa	Sin datos	P	Sin datos	Estados	200
51. Bodega Aurrerá. Tezontle esq Apatlaco. Col Apatlaco, Iztacalco.	H (Minsa)	Sin datos	Sin datos	A	Estados	350
52. Bodega Gigante Av. La Viga 627, Barrio Zapotla. Iztacalco.	H (Minsa)	Sin datos	Sin datos	B	Estados	Sin datos
53. Puebla y Calle 5. Col Agrícola Pantitlán, Iztacalco.	Mezcla	Masa/Maseca 50:7 kg	C	A	Sin datos	Sin datos
54. Oriente 259 esq Sur 28. Col Agrícola Oriental. Iztacalco.	Masa	Sin datos	P	A	Sin datos	350
55. Oriente 259 No. 230 esq. Sur 18B, Agrícola Oriental. Iztacalco.	Mezcla	Masa/Agroinsa	C	B	Sin datos	170
56. Sur 159 No. 125. Col. Ampliación Ramos Millan. Iztacalco	Mezcla	Masa/Minsa	C	A	Estados	300
57. Matamoros y J.Ortiz de Domínguez. Barrio San Juan Centro. Xoch.	Masa	Sin datos	C	A, B	Estados	200
58. Av. 16 de septiembre No. 24. Col. Sta. Ma. Tepepan, Xoch.	Masa	Sin datos	C	B	Estados	120
59. San Pablo-Jacarandas. La cañada, Pueblo San Lucas, Xoch.	Masa	Sin datos	P	A	Estados	250
60. Cuauhtémoc No. 3, Barrio Cristo Rey, Xoch.	Masa	Sin datos	C	B	Sin datos	130
61. Avenida de las Torres 15 Ampliación Tetepan.	Masa	Sin datos	C	A	Sin datos	200
62. Calle Fco. I. Madero Mercado de 377. Barrio Santa Crucita. Xoch.	Masa	Sin datos	C	B	Estados	300
63. Walmart Av Universidad 936 A Col. Sta Cruz Atoyac, B.J.	H (Maseca)	Sin datos	Sin datos	B	Estados	600
64. Walmart Calz. Tlapan 1037 Col. Nativitas. B.J.	H (Maseca)	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Estados	650
1. Comercial Mex. Ermita Iztap.2955. Ampliación Sn Miguel Iztapalapa	H (Maseca)	Sin datos	Sin datos	B	Sin datos	200
66. Jesús Urueta 15 ACC-1 Col. Mooderna. B.J.	Masa	Sin datos	C	B	Estados	250
67. Romero de Terreros 1359. Col. Narvarte. B.J.	Masa	Sin datos	C	A	Sin datos	Sin datos
68. San Felipe s/n Pueblo Xoco x Cineteca. B.J.	Masa	Sin datos	C	A	Estados	270
69. Sumesa Monte Athos y Cda Monte Libano. M.H.	H (Minsa)	Sin datos	Sin datos	A	Estados	600
70. Sumesa Virgilio 15 Col. Polanco. M.H.	H (Minsa)	Sin datos	Sin datos	B	Estados	150
71. Bodega La Comercial. Calz. México Tacuba 911 Huichiapan. M.H.	H (Maseca premium)	Sin datos	Sin datos	B	Sin datos	500
72. Calle JM. Mendivil esq. Monterde. Col. Américas. M.H.	Mezcla	Masa/Maseca 50:6	C	A	Estados	300
73. Laguna de Términos 310. Col. Anáhuac. M.H.	Masa	Sin datos	C	A, B	Jalisco	400
74. Calle Gazcasonica. Col. Tacuba. M.H.	Masa	Sin datos	C	B	Puebla	200
75. E.Zapata-Samuel Viguera Pueblo San Nicolás Tetelco, Tláhuac	Masa	Sin datos	P	A	Sin datos	Sin datos
76. Mercado Mizquic local 57. Mizquic, Tláhuac.	Masa	Sin datos	C	A	Estados	300
77. Mercado san Juan Ixtayopan, San Juan Ixtayopan, Tláhuac.	Masa	Sin datos	C	A	Sin datos	500
78. Buena Suerte (Cocodrilo) frente al N° 154-187. Los Olivos. Tlahuac.	Masa	Sin datos	C	A	Sinaloa	250
79. Mercado Tláhuac local de la esquina con molino centro de Tláhuac.	Masa	Sin datos	P	B	Zapotitlán	320
80. N.Bravo esq. 20 de Noviembre Mz. 16 Lte. 1, San Mateo. Tláhuac	Masa	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Sin datos
81. Superama Periférico- Luis Cabrera M. Contreras.	H (Maseca premium)	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Sin datos
82. Emiliano Zapata frente 9bis. San Bernabe Ocotepc. M.Contreras	Masa	Sin datos	P	B	Sin datos	300
83. Calle Independencia No. 22B. San Nicolas Totolapan. M. Contreras	Masa	Sin datos	P	A	Sin datos	1000
84. Calle San Francisco, 503. Barrio San Francisco M. Contreras	Masa	Sin datos	P	B	Importimex	100
85. Lázaro Cardenas No. 3 Col. el Tanque. M. Contreras	Masa	Sin datos	P	B	Sin, Guan	1000

ANEXO 1: Continuación

N° de Muestra, lugar.	Masa /Harina/ Mezcla	Proporción de la mezcla	Masa propia / comprada	Color de maíz:blanco, amarillo, azul	Origen del maíz	Venta kg/día
86. Av Río Magdalena Mercado la Cruz. M. Contreras	Mezcla	Masa/Maseca 50:5	C	A	Sin datos	600
87. Superama. Av. Noche de Paz 38. Col Granjas Navidad. Cuajimalpa	H (Maseca)	Sin datos	Sin datos	A	Sin datos	Sin datos
88. Com.Mex.Av.Bosques de Reforma 1813. Vista Hermosa. Cuajimalpa	H (Maseca premium)	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Sin datos
89. Superama, Paseo de las Lilas 92. Bosques de Reforma. Cuajimalpa	H (Minsa)	Sin datos	Sin datos	A	Sin datos	150
90. Piñon esq Sauce Col. San José de los Cedros. Cuajimalpa	Masa	Sin datos	C	B	Estados	Sin datos
91. Calle Naviad Mz7 Lte. 9. Col La Navidad. Cuajimalpa	Masa	Sin datos	C	A	Estados	250
92. Lic. Castillo Ledón 117 Col. Pueblo Cuajimalpa. Cuajimalpa	Masa	Sin datos	C	A	Sin datos	170
93. Av. Hidalgo, Plaza San Martín San Pedro Actópan. M.Alta	Masa	Sin datos	P	B	Sin datos	120
94. Calle Guanajuato Mercado Benito Juarez. Villa Milpa Alta. M.Alta	Masa	Sin datos	P	A	Sin datos	200
95. Mercado Santa Ana Tlacotenco M.Alta	Masa	Sin datos	P	B	Jalisco	250
96. Mercado San Pedro Actopan. Gabino Barreda. Subdeleg. M.Alta	Masa	Sin datos	C	B	Estados	200
97. Av. Constitución esq Tamaulipas Sur Pueblo Villa Milpa Alta. M.Alta	Masa	Sin datos	P	Azul	Morelos	120
98. Fabián Flores Pte. San Pablo Oztotepec, M.Alta	Masa	Sin datos	P	B	Sinaloa	700

SD=Sin datos

ANEXO 2: Resultados de la presencia de AF en los cuatro muestreos de tortilla

Tabla 41. Resultados de la presencia de aflatoxinas en el primer muestreo de tortillas.

Primer muestreo, Abril de 2006 ($\mu\text{g kg}^{-1}$)						
Descripción de la muestra		Aflatoxinas				
Delegación	N° de muestra	AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂	AFt
Iztapalapa	1	12.8	ND	ND	ND	12.8
Iztapalapa	2	8.1	ND	ND	ND	8.1
Iztapalapa	3	3.0	ND	ND	ND	3.0
Iztapalapa	4	ND	ND	ND	ND	ND
Iztapalapa	5	12.8	ND	ND	ND	12.8
Iztapalapa	6	4.8	ND	ND	ND	4.8
Iztapalapa	7	ND	ND	ND	ND	ND
Gustavo Madero	8	2	ND	ND	ND	2
Gustavo Madero	9	<LD	ND	ND	ND	<LD
Gustavo Madero	10	2.3	ND	ND	ND	2.3
Gustavo Madero	11-13	ND	ND	ND	ND	ND
Alvaro Obregón	14	ND	ND	ND	ND	ND
Alvaro Obregón	15	ND	3	ND	ND	3
Alvaro Obregón	16	ND	ND	ND	ND	ND
Alvaro Obregón	17	ND	ND	ND	<LC	<LC
Alvaro Obregón	18-19	ND	ND	ND	ND	ND
Coyoacán	20	ND	2.2	<LC	ND	2.2
Coyoacán	21-22	ND	ND	ND	ND	ND
Coyoacán	23	ND	ND	ND	<LC	<LC
Coyoacán	24	ND	ND	ND	ND	ND
Coyoacán	25	ND	<LC	ND	ND	<LC
Tlalpan	26	ND	3.2	ND	ND	3.2
Tlalpan	27	ND	2.2	ND	ND	2.2
Tlalpan	28	ND	2.2	ND	ND	2.2
Tlalpan	29	ND	2.5	ND	ND	2.5
Tlalpan	30-31	ND	ND	ND	ND	ND
Cuauhtémoc	32-37	ND	ND	ND	ND	ND
Venustiano Carranza	38-44	ND	ND	ND	ND	ND
Azcapotzalco	45-47	ND	ND	ND	ND	ND
Azcapotzalco	48	3.8	2.2	3.9	5.3	15.2
Azcapotzalco	49-50	ND	ND	ND	ND	ND
Iztacalco	51-56	ND	ND	ND	ND	ND
Xochimilco	57-62	ND	ND	ND	ND	ND
Benito Juárez	63-67	ND	ND	ND	ND	ND
Benito Juárez	68	4.8	<LD	4.1	2.4	11.1
Hidalgo	69-74	ND	ND	ND	ND	ND
Tláhuac	75	ND	ND	ND	ND	ND
Tláhuac	76	ND	<LC	4.2	ND	4.2
Tláhuac	77-80	ND	ND	ND	ND	ND
M. Contreras	81	105.6	<LC	ND	ND	105.6
M. Contreras	82-86	ND	ND	ND	ND	ND
Cuajimalpa	87-89	ND	ND	ND	ND	ND
Cuajimalpa	90	29.6	<LC	ND	ND	29.6
Cuajimalpa	91-92	ND	ND	ND	ND	ND
Milpa Alta	93-98	ND	ND	ND	ND	ND

Tabla 42. Resultados de la presencia de aflatoxinas en el segundo muestreo de tortillas.

Descripción de la muestra		Aflatoxinas				
Delegación	N° de muestra	AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂	AFt
Iztapalapa	1	ND	ND	ND	ND	ND
Iztapalapa	2	1.9	ND	ND	ND	1.9
Iztapalapa	3-7	ND	ND	ND	ND	ND
Gustavo Madero	8	ND	ND	ND	ND	ND
Gustavo Madero	9	4.6	ND	ND	ND	4.6
Gustavo Madero	10	1.6	ND	ND	ND	1.6
Gustavo Madero	11-13	ND	ND	ND	ND	ND
Alvaro Obregón	14-19	ND	ND	ND	ND	ND
Coyoacán	20-25	ND	ND	ND	ND	ND
Tlalpan	26-29	ND	ND	ND	ND	ND
Tlalpan	30	1.4	ND	ND	ND	1.4
Tlalpan	31	ND	ND	ND	ND	ND
Cuauhtémoc	32	ND	ND	ND	ND	ND
Cuauhtémoc	33	<LC	2.0	ND	ND	2.0
Cuauhtémoc	34	1.6	0	ND	ND	1.6
Cuauhtémoc	35-37	ND	ND	ND	ND	ND
Venustiano Carranza	38-44	ND	ND	ND	ND	ND
Azcapotzalco	45	1.7	<LC	ND	ND	1.7
Azcapotzalco	46	ND	ND	ND	ND	ND
Azcapotzalco	47	<LC	ND	ND	ND	<LC
Azcapotzalco	48	ND	ND	ND	ND	ND
Azcapotzalco	49	ND	2.1	ND	ND	2.1
Azcapotzalco	50	ND	ND	ND	ND	ND
Iztacalco	51-56	ND	ND	ND	ND	ND
Xochimilco	57-62	ND	ND	ND	ND	ND
Benito Juárez	63-68	ND	ND	ND	ND	ND
Hidalgo	69-74	ND	ND	ND	ND	ND
Tláhuac	75-80	ND	ND	ND	ND	ND
M. Contreras	81	7.8	ND	ND	ND	7.8
M. Contreras	82	<LC	4.2	385.2	3.9	393.3
M. Contreras	83-84	ND	ND	ND	ND	ND
M. Contreras	85	4.9	<LC	5.0	5.9	15.8
M. Contreras	86	ND	ND	ND	ND	ND
Cuajimalpa	87-92	ND	ND	ND	ND	ND
Milpa Alta	93-94	ND	ND	ND	ND	ND
Milpa Alta	95	9.8	ND	ND	ND	9.8
Milpa Alta	96-98	ND	ND	ND	ND	ND

Tabla 43. Resultados de la presencia de aflatoxinas en el tercer muestreo de tortillas.

Descripción de la muestra		Aflatoxinas				
Delegación	N° de muestra	AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂	AFt
Iztapalapa	1-7	ND	ND	ND	ND	ND
Gustavo Madero	8-13	ND	ND	ND	ND	ND
Alvaro Obregón	14-19	ND	ND	ND	ND	ND
Coyoacán	20-25	ND	ND	ND	ND	ND
Tlalpan	26-28	ND	ND	ND	ND	ND
Tlalpan	29	6.9	ND	ND	ND	6.9
Tlalpan	30	ND	ND	ND	ND	ND
Tlalpan	31	140.3	ND	150.1	ND	290.4
Cuauhtémoc	32	2.5	ND	ND	ND	2.5
Cuauhtémoc	33-37	ND	ND	ND	ND	ND
Venustiano Carranza	38-41	ND	ND	ND	ND	ND
Venustiano Carranza	42	6.2	ND	ND	ND	6.2
Venustiano Carranza	43	5.6	ND	ND	ND	5.6
Venustiano Carranza	44	ND	ND	ND	ND	ND
Azcapotzalco	45-48	ND	ND	ND	ND	ND
Azcapotzalco	49	ND	4.7	ND	ND	4.7
Azcapotzalco	50	8.2	ND	ND	ND	8.2
Iztacalco	51-56	ND	ND	ND	ND	ND
Xochimilco	57-60	ND	ND	ND	ND	ND
Xochimilco	61	ND	ND	<LD	ND	<LD
Xochimilco	62	ND	ND	ND	ND	ND
Benito Juárez	63-64	ND	ND	ND	ND	ND
Benito Juárez	65	6.0	ND	ND	ND	6.0
Benito Juárez	66-68	ND	ND	ND	ND	ND
Hidalgo	69-74	ND	ND	ND	ND	ND
Tláhuac	75	ND	ND	ND	ND	ND
Tláhuac	76	11.4	ND	ND	ND	11.4
Tláhuac	77-80	ND	ND	ND	ND	ND
M. Contreras	81	6.4	ND	ND	ND	6.4
M. Contreras	82-86	ND	ND	ND	ND	ND
Cuajimalpa	87	ND	ND	ND	ND	ND
Cuajimalpa	88	7.8	ND	ND	ND	7.8
Cuajimalpa	89-92	ND	ND	ND	ND	ND
Milpa Alta	93-98	ND	ND	ND	ND	ND

Tabla 44. Resultados de la presencia de aflatoxinas en el cuarto muestreo de tortillas.

ANEXO 2: Continuación. Cuarto muestreo, Noviembre de 2007 ($\mu\text{g kg}^{-1}$)						
Descripción de la muestra		Aflatoxinas				
Delegación	N° de muestra	AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂	AFt
Iztapalapa	1-2	ND	ND	ND	ND	ND
Iztapalapa	3	ND	ND	ND	4.2	4.2
Iztapalapa	4-7	ND	ND	ND	ND	ND
Gustavo Madero	8-13	ND	ND	ND	ND	ND
Alvaro Obregón	14-16	ND	ND	ND	ND	ND
Alvaro Obregón	17	ND	2.8	ND	ND	2.8
Alvaro Obregón	18	ND	<LC	ND	ND	<LC
Alvaro Obregón	19	ND	ND	ND	ND	ND
Coyoacán	20-21	ND	ND	ND	ND	ND
Coyoacán	22	2.0	ND	ND	ND	2.0
Coyoacán	23	<LC	ND	ND	ND	<LC
Coyoacán	24-25	ND	ND	ND	ND	ND
Tlalpan	26-31	ND	ND	ND	ND	ND
Cuauhtémoc	32-37	ND	ND	ND	ND	ND
Venustiano Carranza	38-42	ND	ND	ND	ND	ND
Venustiano Carranza	43	ND	2.4	ND	ND	2.4
Venustiano Carranza	44	ND	ND	ND	ND	ND
Azacapozalco	45-50	ND	ND	ND	ND	ND
Iztacalco	51-56	ND	ND	ND	ND	ND
Xochimilco	57	ND	ND	ND	ND	ND
Xochimilco	58	ND	ND	ND	<LC	<LC
Xochimilco	59	ND	ND	ND	<LC	<LC
Xochimilco	60-61	ND	ND	ND	ND	ND
Xochimilco	62	2.6	ND	ND	ND	2.6
Benito Juárez	63	ND	ND	ND	ND	ND
Benito Juárez	64	5.4	ND	ND	ND	5.4
Benito Juárez	65	ND	ND	ND	ND	ND
Benito Juárez	66	4.0	ND	ND	ND	4.0
Benito Juárez	67	0	ND	ND	ND	ND
Benito Juárez	68	5.0	ND	ND	ND	5.0
Hidalgo	69	ND	ND	ND	ND	ND
Hidalgo	70	3.5	ND	ND	ND	3.5
Hidalgo	71	11.4	3.1	16.6	ND	31.1
Hidalgo	72-74	ND	ND	ND	ND	ND
Tláhuac	75-80	ND	ND	ND	ND	ND
M. Contreras	81-82	ND	ND	ND	ND	ND
M. Contreras	83	ND	ND	5.8	<LC	5.8
M. Contreras	84	<LC	<LC	ND	ND	<LC
M. Contreras	85-86	ND	ND	ND	ND	ND
Cuajimalpa	87	3.7	ND	ND	ND	3.7
Cuajimalpa	88-92	ND	ND	ND	ND	ND
Milpa Alta	93-94	ND	ND	ND	ND	ND
Milpa Alta	95	8.7	ND	ND	ND	8.7
Milpa Alta	96	ND	ND	ND	4.3	4.3
Milpa Alta	97	ND	ND	ND	ND	ND
Milpa Alta	98	ND	<LC	ND	ND	<LC

ANEXO 3: Cromatogramas de las muestras de tortillas

a) Primer muestreo de tortillas de secas del 2006 (S06)

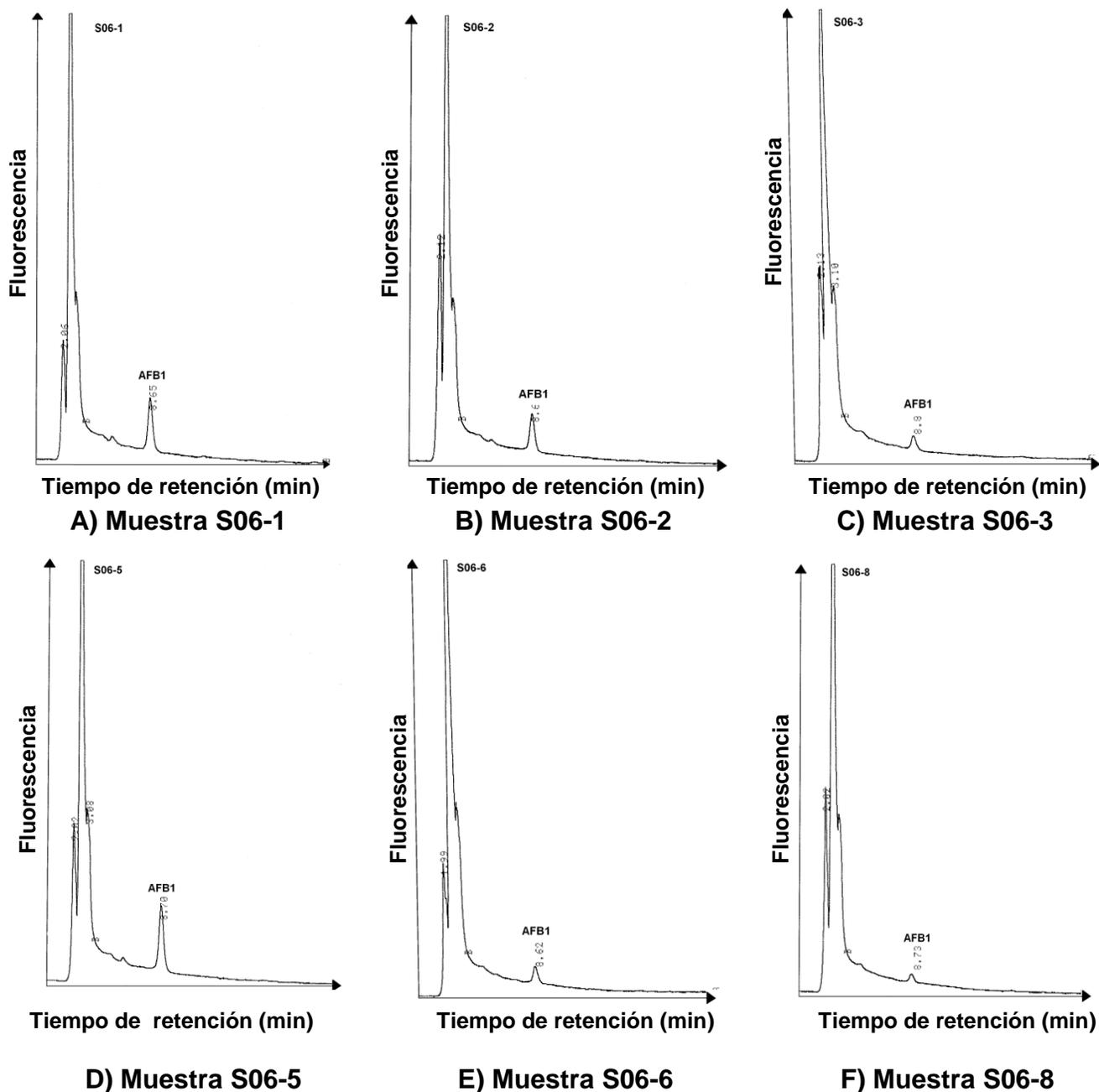
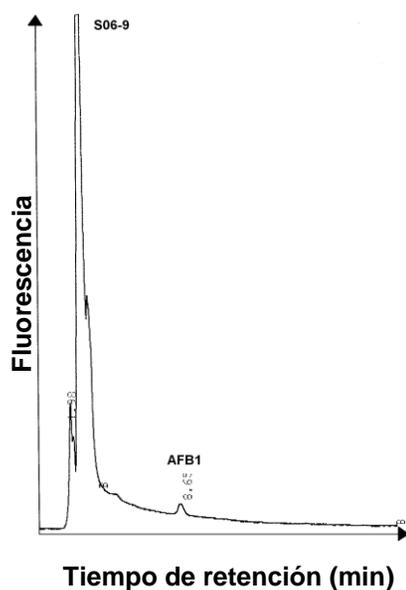
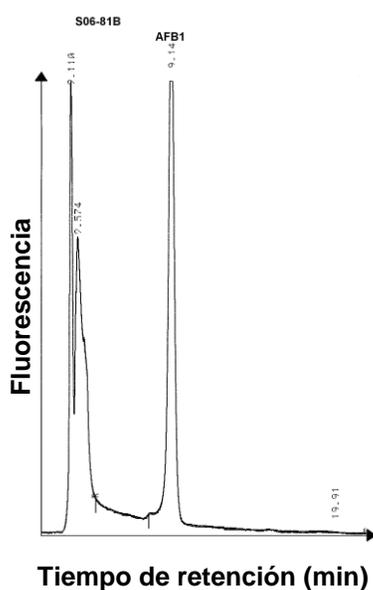


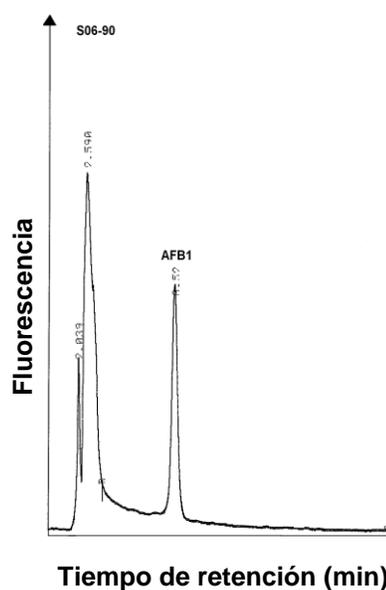
Figura 29. Cromatogramas correspondientes a las muestras del primer muestreo **A)** 12.75 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB₁, **B)** 8.12 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB₁, **C)** 2.96 $\mu\text{g kg}^{-1}$ AFB₁, **D)** 12.80 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB₁, **E)** 4.84 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB₁, **F)** 2.21 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB₁.



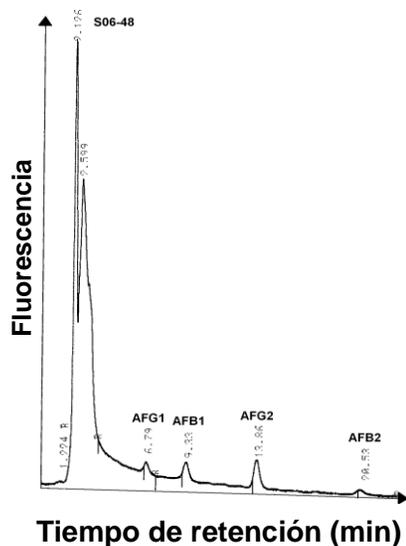
G) Muestra S06-9



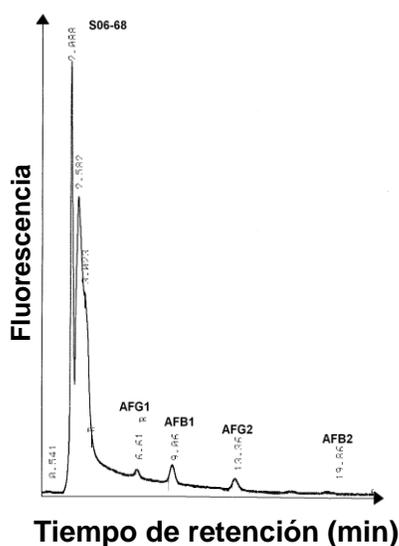
H) Muestra S06-81



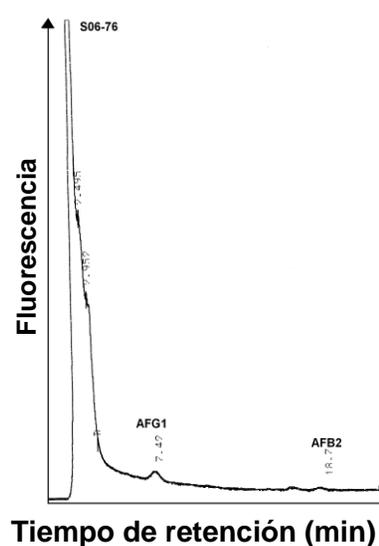
I) Muestra S06-90



J) Muestra S06-48



K) Muestra S06-68



L) Muestra S06-76

Figura 30. Cromatogramas correspondientes a las muestras del primer muestreo **A)** $0.29 \mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB₁, **B)** $105.67 \mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB₁, **C)** $29.60 \mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB₁, **D)** $3.93 \mu\text{g kg}^{-1}$ de AFG₁, $3.78 \mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB₁, $5.25 \mu\text{g kg}^{-1}$ de AFG₂ y $2.21 \mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB₂, **E)** $4.13 \mu\text{g kg}^{-1}$ de AFG₁, $4.81 \mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB₁, $2.38 \mu\text{g kg}^{-1}$ de AFG₂ y $0.54 \mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB₂, **F)** $4.16 \mu\text{g kg}^{-1}$ de AFG₁ y $1.73 \mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB₂.

b) Segundo muestreo de tortillas de lluvias del 2006 (LL06)

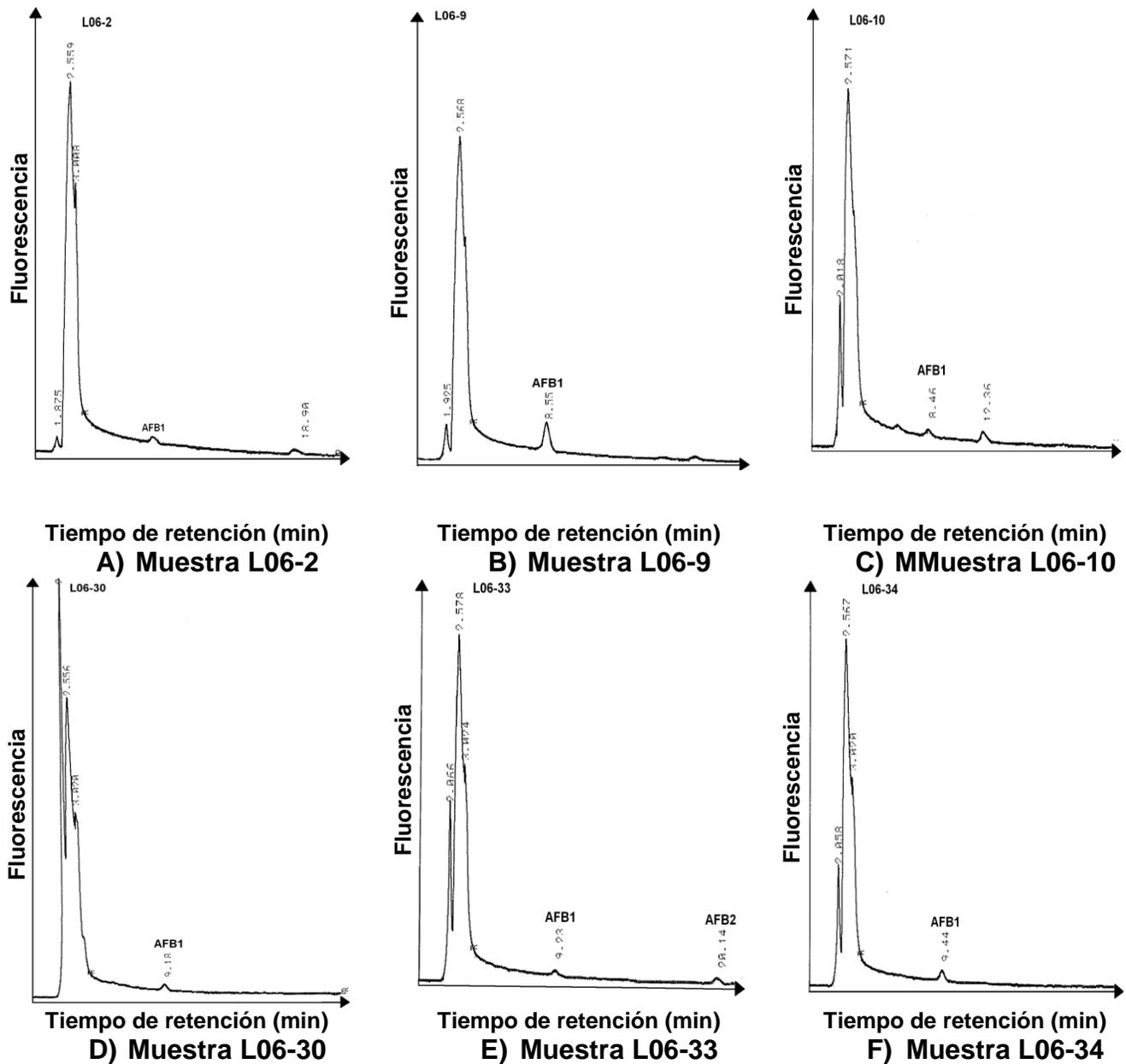


Figura 31. Cromatogramas correspondientes a las muestras del segundo muestreo **A)** 1.88 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB₁, **B)** 4.58 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB₁, **C)** 1.63 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB₁, **D)** 1.41 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB₁, **E)** 0.78 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB₁ y 2.03 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB₂, **F)** 1.20 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB₁.

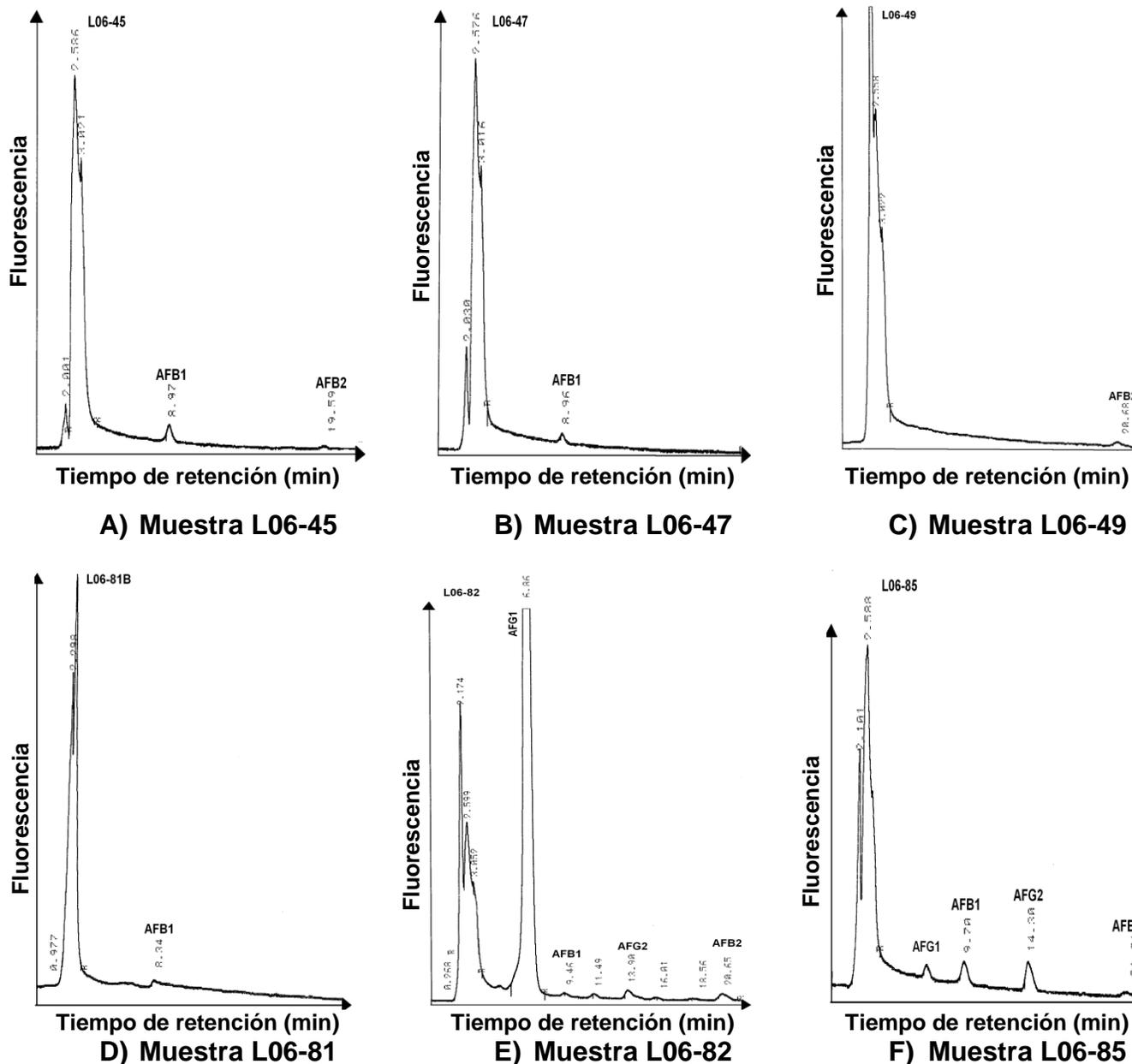


Figura 32. Cromatogramas correspondientes a las muestras del segundo muestreo **A)** 1.71 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB₁ y 0.68 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB₂, **B)** 1.57 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB₁, **C)** 2.10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB₂, **D)** 7.78 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB₁, **E)** 385.21 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFG₁, 1.17 21 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB₁, 3.89 21 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFG₂, y 4.20 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB₂, **F)** 4.96 21 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFG₁, 4.93 21 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB₁, 5.92 21 $\mu\text{g kg}^{-1}$ AFG₂, y 1.77 $\mu\text{g kg}^{-1}$ AFB₂.

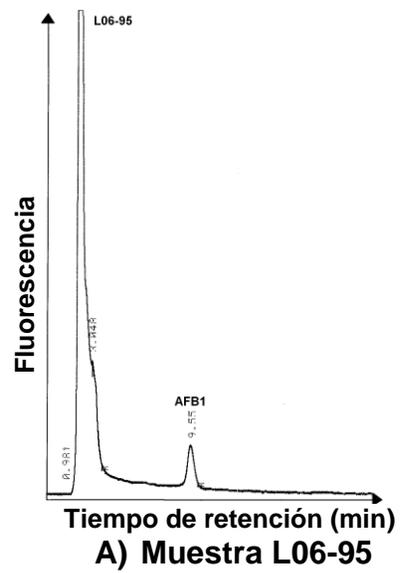


Figura 33. Cromatograma correspondiente a la muestra L06-95 del segundo muestreo con $9.83 \mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB_1 .

c) Tercer muestreo de tortillas de secas del 2007 (S07)

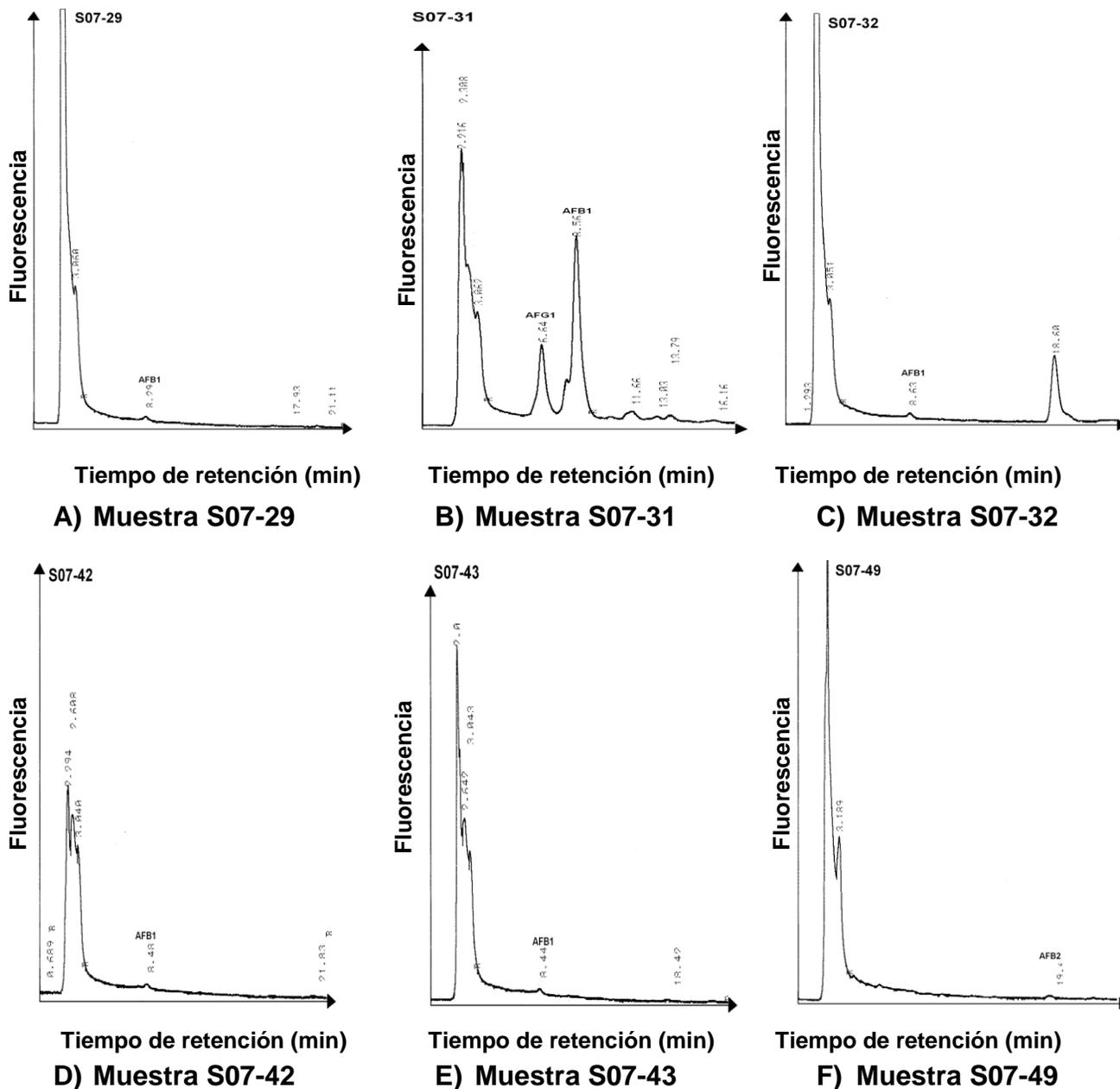
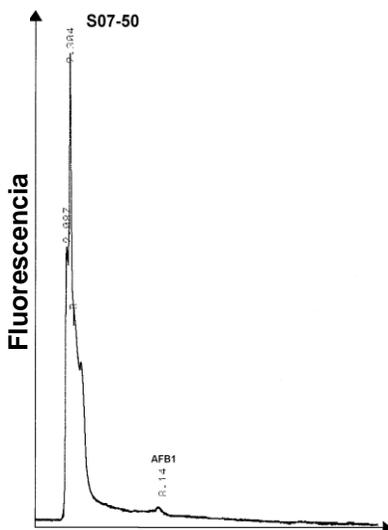
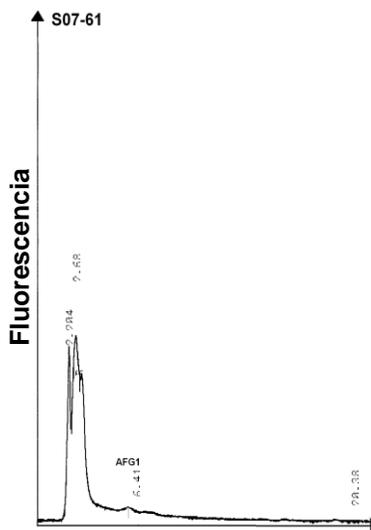


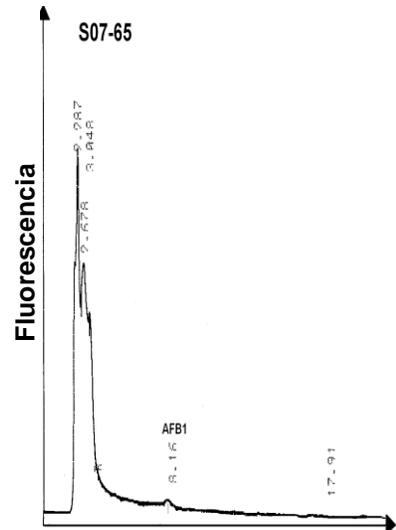
Figura 34. Cromatogramas correspondientes a las muestras del tercer muestreo **A)** $6.90 \mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB₁, **B)** $140.33 \mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB₁ y $150.14 \mu\text{g kg}^{-1}$ de AFG₁, **C)** $2.54 \mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB₁, **D)** $6.22 \mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB₁, **E)** $5.63 \mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB₁, **F)** $4.72 \mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB₂.



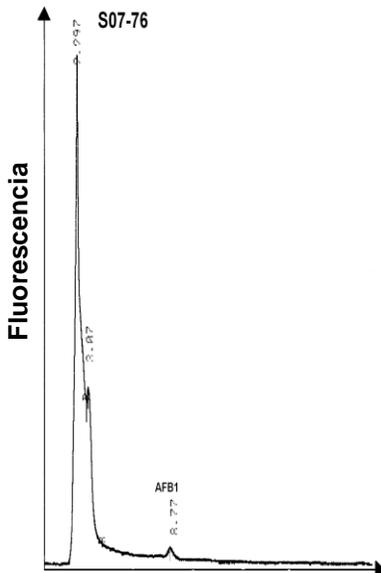
Tiempo de retención (min)
A) Muestra S07-50



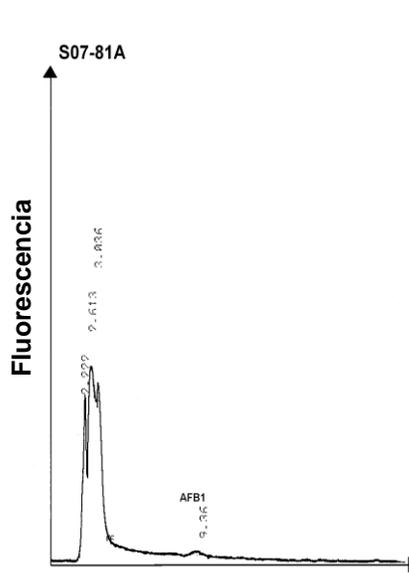
Tiempo de retención (min)
B) Muestra S07-61



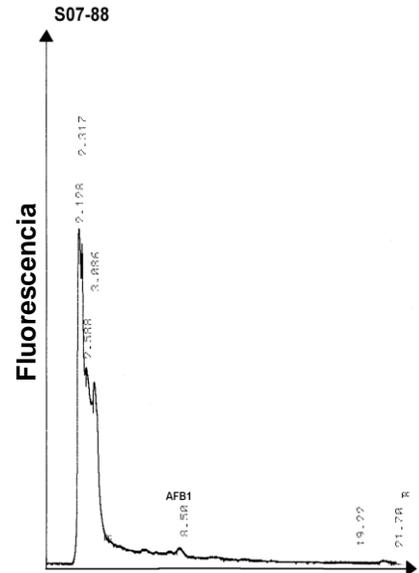
Tiempo de retención (min)
C) Muestra S07-65



Tiempo de retención (min)
D) Muestra S07-76



Tiempo de retención (min)
E) Muestra S07-81



Tiempo de retención (min)
F) Muestra S07-88

Figura 35. Cromatogramas correspondientes a las muestras del tercer muestreo **A)** $8.24 \mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB_1 , **B)** $0.29 \mu\text{g kg}^{-1}$ de AFG_1 , **C)** $6.04 \mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB_1 , **D)** $11.37 \mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB_1 , **E)** $6.44 \mu\text{g kg}^{-1}$ AFB_1 , **F)** $7.79 \mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB_1 .

d) Cuarto muestreo de tortillas de lluvias de 2007 (LL07)

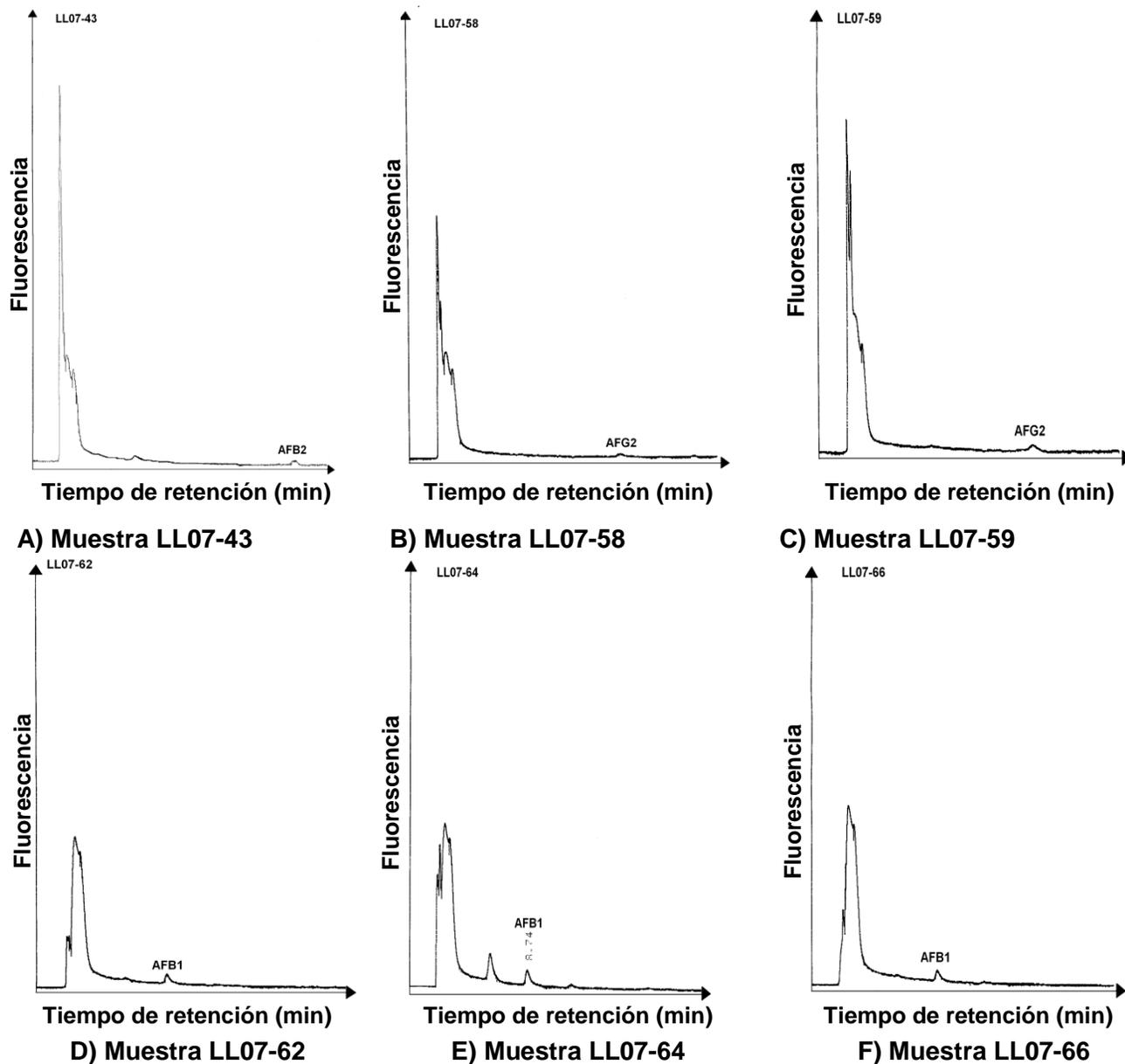


Figura 36. Cromatogramas correspondientes a las muestras del cuarto muestreo **A)** $2.43 \mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB₂, **B)** $1.92 \mu\text{g kg}^{-1}$ de AFG₂, **C)** $1.64 \mu\text{g kg}^{-1}$ de AFG₂, **D)** $2.57 \mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB₁, **E)** $5.37 \mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB₁, **F)** $3.95 \mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB₁.

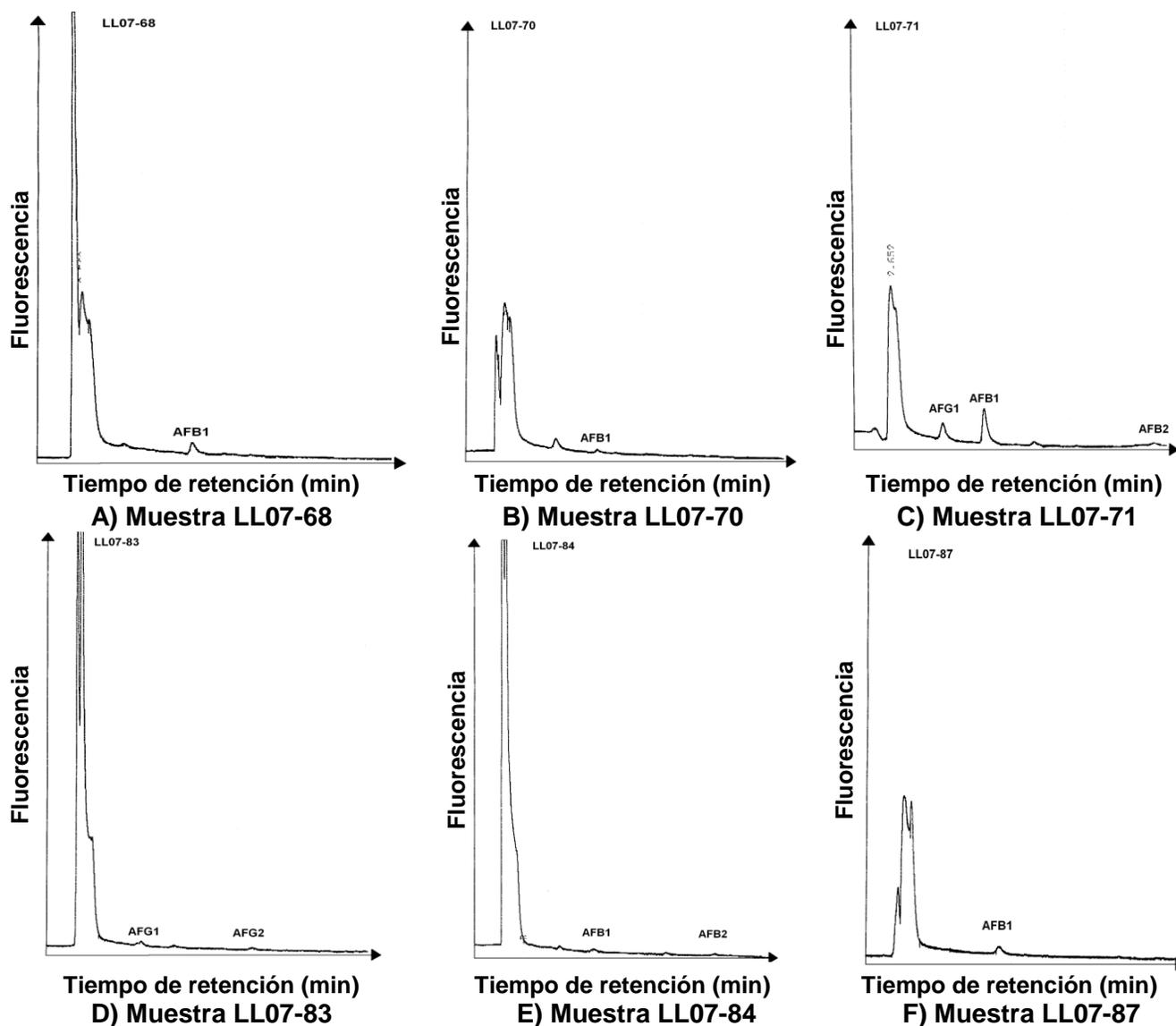


Figura 37. Cromatogramas correspondientes a las muestras del cuarto muestreo **A)** $4.96 \mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB₁, **B)** $3.48 \mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB₁, **C)** $16.61 \mu\text{g kg}^{-1}$ de AFG₁, $11.44 \mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB₁ y $3.05 \mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB₂, **D)** $5.83 \mu\text{g kg}^{-1}$ de AFG₁ y $0.90 \mu\text{g kg}^{-1}$ de AFG₂, **E)** $1.31 \mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB₁ y $1.13 \mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB₂, **F)** $3.73 \mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB₁.

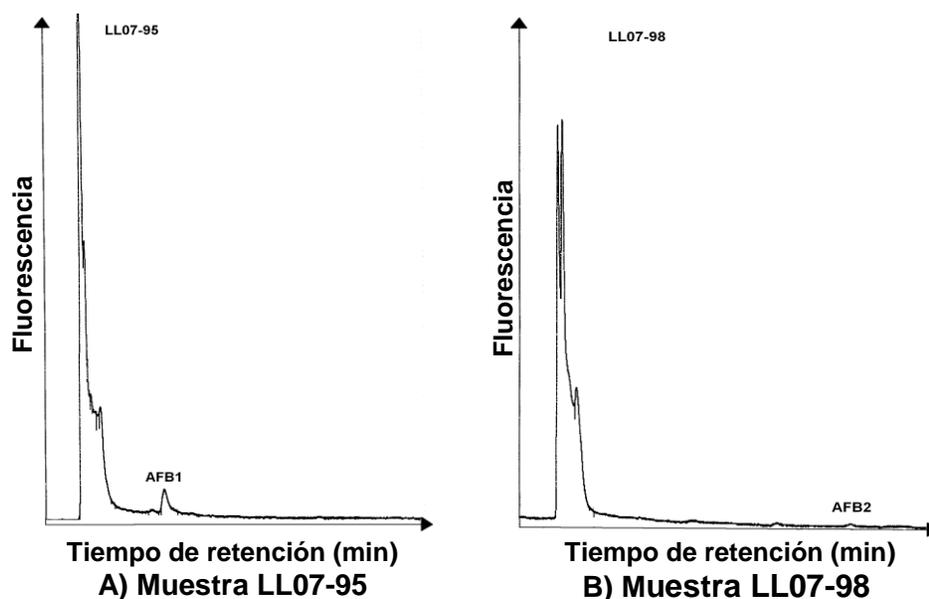


Figura 38. Cromatogramas correspondientes a las muestras del cuarto muestreo **A)** $8.74 \mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB₁, **B)** $0.93 \mu\text{g kg}^{-1}$ de AFB₂.

ANEXO 4: Soluciones y medios de cultivo para la Prueba de Ames

A4.1. Solución de histidina

Se disolvieron 0.5 g de L-histidina ($\text{C}_6\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_2$, PM: $155.55 \text{ g mol}^{-1}$) (Sigma, St. Louis, EEUU) en 100 mL de agua destilada, se esterilizó en autoclave a 121°C y 20 lb/in^2 durante 20 minutos. La solución se guardó bajo refrigeración a 4°C . La concentración final fue de 32 mM.

A4.2. Solución de biotina.

Se disolvieron 0.0122g de D-biotina ($\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$, PM: $246.33 \text{ g mol}^{-1}$) (Sigma, St. Louis, EEUU) en 100 mL de agua destilada caliente. Se esterilizó en autoclave a 121°C y 20 lb/in^2 durante 20 minutos. La solución se guardó bajo refrigeración a 4°C . La concentración final fue de 0.5 mM.

A4.3. Solución de sales Vogel-Bonner (medio E 50 X)

Se calentaron 670 mL de agua destilada a 45 °C y se adicionaron las siguientes sales en el orden que se describe a continuación: 10 g de sulfato de magnesio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ PM: 246.3 g mol⁻¹, J.T. Baker, Xalostoc, México), en una concentración final de 40.6 mM; 100 g de ácido cítrico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ PM: 192.13 g mol⁻¹, Sigma, St. Louis, EEUU) en una concentración final de 0.520 M; 500 g de fosfato de potasio dibásico anhidro (K_2HPO_4 PM: 174 g mol⁻¹ Sigma, St. Louis, EEUU) en una concentración final de 2.87 M y finalmente 175 g de fosfato de sodio y amonio tetrahidratado ($\text{NaH}_2\text{N}_2\text{HPO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ PM: 209 g mol⁻¹, Sigma, St. Louis, EEUU) en una concentración final de 0.83 M. Se mantuvo agitación constante al resguardó de la luz hasta su completa dilución. Posteriormente, la solución se ajustó a 1L con agua destilada y se almacenó en un frasco ámbar a temperatura ambiente.

A4.4. Solución de histidina /biotina

Se pesaron 0.0122 g de D-biotina ($\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$, PM: 246.33 g mol⁻¹) (Sigma, St. Louis, EEUU) y 0.007758 g de L-histidina ($\text{C}_6\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_2$, PM: 155.55 g mol⁻¹) (Sigma, St. Louis, EEUU). Se disolvieron en 100 mL de agua destilada precalentada a 70 °C en una botella de vidrio. La solución se esterilizó durante 20 minutos a 121 °C y 20 lb/in². La solución se guardó bajo refrigeración a 4 °C. La concentración final de cada solución fue: D-biotina 0.5 mM, L-histidina 0.5 mM.

A4.5. Solución de D-glucosa 40% m/v

Se calentaron 500 mL de agua destilada a ebullición, y se mezclaron con 200 g de glucosa ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ PM: 180.16 g mol⁻¹) (J.T. Baker, Xalostoc, México), se agitaron hasta total dilución de la glucosa y se esterilizó 20 minutos a 121 °C y 20 lb/in². La solución se guardó refrigerada a 4 °C.

A4.6. Solución de cristal violeta 0.1 % m/v

Se pesó 0.1 g de cristal violeta (Sigma, St. Louis, EEUU), se disolvió en 100 mL de agua destilada y esta solución se guardó en un frasco de vidrio color ámbar bajo refrigeración a 4 °C.

A4.7. Solución de hidróxido de sodio 0.02 N

Para preparar la solución de hidróxido de sodio se llevó a ebullición 1L de agua destilada por 10 minutos, se guardó en un frasco con tapa y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Posteriormente se pesaron 0.08 g de NaOH PM: 40 g mol⁻¹ (J.T. Baker, Xalostoc, México) y se disolvieron en 100 mL de agua, y esta solución se guardó en un frasco de vidrio a temperatura ambiente.

A4.8. Solución de hidróxido de sodio 1 N

Para preparar la solución de hidróxido de sodio se llevó a ebullición 1L de agua destilada por 10 minutos, se guardó en un frasco con tapa y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Posteriormente se pesaron 4.0 g de NaOH PM: 40 g mol⁻¹ (J.T.

Baker, Xalostoc, México) y se disolvieron en 100 mL de agua, y esta solución se guardó en un frasco de vidrio a temperatura ambiente.

A4.9. Solución de ampicilina 2.5 mg/ 3mL de NaOH 0.02 N

Se pesaron 0.0835 g de ampicilina ($C_{16}H_{19}N_3O_4S$, PM: 349.4 g mol⁻¹) y se disolvieron en 100 mL de NaOH (0.02N) dando una concentración de la solución de 2.4 mM ó 0.835 mg mL⁻¹. La solución se esterilizó por filtración con membranas de 0.22 µm y se guardó en un frasco de vidrio bajo refrigeración a 4 °C.

A4.10. Solución de ampicilina 8 mg/mL de NaOH 0.02 N

Se pesaron 0.8 g de ampicilina ($C_{16}H_{19}N_3O_4S$, PM: 349.4 g mol⁻¹) y se disolvieron en 100 mL de NaOH (0.02N) dando una concentración de 22.8 mM ó 8 mg mL⁻¹. La solución se esterilizó por filtración con membranas de 0.22 µm y se guardó en un frasco de vidrio bajo refrigeración a 4 °C.

A4.11. Solución de Benzo(a)pireno

Se pesaron 0.001 g de benzo(a)pireno ($C_{20}H_{14}$, PM: 254.3 g mol⁻¹) (Sigma, St. Louis, EEUU) y se disolvieron en 10 mL de DMSO dando una concentración de 3.93 mM ó 100 ng mL⁻¹ y se mantuvo en refrigeración al abrigo de la luz.

A4.12. Solución de 2-aminofluoreno

Se pesaron 0.01 g de 2-aminofluoreno ($C_{13}H_{11}N$, PM: 181.23 g mol⁻¹) (Sigma, St. Louis, EEUU), se disolvieron en 10 mL de DMSO dando una concentración de 55.2 mM ó 1000 ng mL⁻¹ y se mantuvo en refrigeración al abrigo de la luz.

A4.13. Solución de amortiguadora de fosfatos

Se preparó una solución amortiguadora de fosfatos (PBS) 0.2 M, con un pH 7.4. Para 100 mL de PBS se pesaron 2.289 g de Na_2HPO_4 (PM: 141.96 g mol⁻¹) y 0.5244 g de NaH_2PO_4 (PM: 119.98 g mol⁻¹) y se disolvieron con 80 mL de agua destilada, el pH se ajustó con NaOH ó HCl 0.1 N según se requirió y se aforó a 100 mL. Dando una concentración final de 0.016 mol de HPO_4^{2-} y 4.37×10^{-3} mol de $H_2PO_4^{-1}$.

A4.14. Agar mínimo de glucosa (GM)

Para preparar el agar mínimo de glucosa se pesaron 7.5 g de agar bacteriológico (Merck, Darmstadt, Alemania) y se disolvieron en 300 mL de H₂O destilada en un matraz de 1L con tapón de algodón. Posteriormente se tomaron 10 mL de la solución de sales de Vogel-Bonner 50 X, se diluyeron con 90 mL de agua destilada, y se colocaron en un frasco de vidrio. Finalmente, en otro frasco de vidrio se colocaron 10 g de dextrosa anhidra y se le adicionaron 100 mL de agua destilada. Las tres soluciones se esterizaron en autoclave por 20 minutos a 121°C y 20 lb/in². Transcurrido el tiempo

de esterilización, se complementó el agar adicionando las disoluciones de glucosa y de Vogel-Bonner 50 X, se agitó suavemente para no formar burbujas de aire. La mezcla se distribuyó en cajas de Petri adicionando 30 mL de agar por caja. Las placas se dejaron enfriar a temperatura ambiente hasta total solidificación; una vez sólidas se invirtieron y después de una hora se almacenaron en refrigeración a 4°C. La suplementación y vertido de placas se realizó en una zona aséptica.

A4.15. Agar Mínimo de glucosa + biotina (Bio+)

Para preparar el agar mínimo de glucosa + *Bio+* se pesaron 7.5 g de agar bacteriológico (Merck, Darmstadt, Alemania), se disolvieron en 462 mL de H₂O destilada en un matraz de 1L con tapón de algodón. La dilución de agar se esterilizó en autoclave por 20 minutos a 121°C y 20 lb/in², transcurrido el tiempo de esterilización se sacó el medio y se le adicionaron 25 mL de solución de glucosa al 40% m/v, 10 mL de solución Vogel-Bonner 50 X y 3 mL de solución de Biotina 30 mM. Todas las soluciones se esterilizaron previamente y precalentaron en horno de microondas antes de la complementación. La mezcla se agitó suavemente y se distribuyó en cajas de Petri adicionando 30 mL de agar por caja. Las placas se dejaron enfriar a temperatura ambiente hasta total solidificación; una vez sólidas se invirtieron para permitir la evaporación del agua y después de una hora se almacenaron en refrigeración a 4°C. La suplementación y vertido de cajas se realizó en una zona aséptica.

A4.16. Agar Mínimo de glucosa + histidina (His+)

Para preparar el agar mínimo de glucosa + *His+* se pesaron 7.5 g de agar bacteriológico (Merck, Darmstadt, Alemania), se disolvieron en 461 mL de H₂O destilada en un matraz de 1L con tapón de algodón. La solución de agar mínimo se esterilizó en autoclave por 20 minutos a 121°C y 20 lb/in², transcurrido el tiempo de esterilización se sacó el medio y se le adicionaron 25 mL de solución de glucosa al 40% m/v, 10 mL de solución Vogel-Bonner 50 X y 4 mL de solución de histidina 0.5 mM. Todas las soluciones se esterilizaron previamente y precalentaron en horno de microondas antes de la complementación. La mezcla se agitó suavemente y se distribuyó en cajas de Petri adicionando 30 mL de agar por placa. Las cajas se dejaron enfriar a temperatura ambiente hasta total solidificación, se invirtieron y después de una hora se almacenaron en refrigeración a 4°C. La suplementación y vertido de cajas se realizó en una zona aséptica.

A4.17. Medio enriquecido (ME)

Para preparar el medio enriquecido se pesaron 7.5 g de agar bacteriológico (Merck, Darmstadt, Alemania), se disolvieron en 455.5 mL de H₂O destilada en un matraz de 1L con tapón de algodón. La dilución de agar se esterilizó en autoclave por 20 minutos a 121°C y 20 lb/in², transcurrido el tiempo de esterilización se sacó el medio y se le adicionan 25 mL de solución de glucosa al 40% m/v, 10 mL de solución Vogel-Bonner 50 X y 5 mL de solución de histidina (2 g en 400 mL agua destilada), 3 mL de solución de biotina (0.5 mM) y 1.575 mL de solución de ampicilina (8 mg/mL en NaOH 0.02 N). Todas las soluciones se esterilizaron previamente en autoclave y precalentaron en en horno de microondas antes de la complementación, la solución de ampicilina se

esterilizó por filtración usando membranas de nylon de 0.45 μm . El medio enriquecido se agitó suavemente y se distribuyó en placas de Petri adicionando 30 mL de agar por caja. Las placas se dejaron enfriar a temperatura ambiente hasta total solidificación, se invirtieron y después de una hora se almacenaron en refrigeración a 4°C. La suplementación y vertido de placas se realizó en una zona aséptica.

A4.18. Medio completo sólido (NB)

Para preparar el medio completo sólido se pesaron 7.5 g de agar bacteriológico (Merck, Darmstadt, Alemania) y 12.5 g de medio Oxoid No. 2 (Oxoid, Hampshire, Inglaterra), y se disolvieron en 500 mL de H₂O destilada en un matraz de 1 L con tapón de algodón. El medio NB se esterilizó en autoclave por 20 minutos a 121°C y 20 lb/in², transcurrido el tiempo de esterilización se sacó y se distribuyó en cajas de Petri adicionando 30 mL de agar por caja. Las placas se dejaron enfriar a temperatura ambiente hasta total solidificación, se invirtieron y después de una hora se almacenaron en refrigeración a 4°C. El vertido de placas se realizó en una zona aséptica.

A4.19. Medio completo líquido (LB) + ampicilina

Para preparar el medio completo líquido se pesaron 2.5 g de medio Oxoid No. 2 (Oxoid, Hampshire, Inglaterra) se disolvieron en 100 mL de H₂O destilada en un matraz de 250 mL con tapón de algodón. El medio LB se esterilizó en autoclave por 20 minutos a 121°C y 20 lb/in², transcurrido el tiempo de esterilización se complementó con 100 μL de solución de ampicilina (2.5 mg en 3 mL de NaOH 0.02 N), previamente esterilizada por filtración en membranas de nylon de 0.45 μm . El medio se distribuyó en matraces de 50 mL adicionando en cada uno 20 mL. El medio distribuido se dejó enfriar a temperatura ambiente y después se almacenó en refrigeración a 4°C. La distribución del medio LB se realizó en una zona aséptica.

A4.20. Agar de superficie (TOP)

Para el agar de superficie se pesaron 0.5 g de NaCl (J.T. Baker, Xalostoc, México) y 0.6 g de agar bacteriológico (Merck, Darmstadt, Alemania) se disolvieron en 100 mL de agua destilada y se esterizaron en autoclave por 20 minutos a 121°C y 20 lb/in² y a continuación se añadieron 10 mL de la solución histidina/biotina (0.5 mM). Una vez añadida esta solución se agitó ligeramente y se distribuyó en alícuotas de 2 mL. Para ello, se emplearon tubos de cultivo 13 x 100 mm con tapón de rosca previamente esterilizados. El agar contenido en estos tubos se fundió previamente al ensayo y se mantuvo a 45 °C usando un multiblock (New Brunswick Scientific).

A4.21. Mezcla de la fracción S9

El homogenizado de hígado de ratón activado con Aroclor 1254 que contiene la fracción microsomal S9 se compró del laboratorio de mutagénesis del Dr. Javier Espinosa del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. El homogenizado se conservó bajo congelación a -70 °C en un ultracongelador (Legaci, Ashville, NC,

EEUU). En un matraz aforado de 10 mL se mezclaron 0.02 mL de una solución de $MgCl_2$ (0.4 M) y 0.02 mL de KCl (1.65 M), se adicionaron 0.0013 g de glucosa-6-fosfato, 0.0030 g de NADP y 0.9 mL de amortiguador de fosfatos 0.2 M, pH 7.4, se aforó con agua destilada. Posteriormente se retiraron 500 μ L de la solución y se adicionaron 500 μ L de la fracción S9 previamente descongelada, conservada en un baño de hielo y protegida de la luz. Finalmente la solución se esterilizó por filtración mediante membranas estériles (Millex – GV, 0.22 μ m. Millipore, Bedford, MA, EEUU). La solución se conservó bajo refrigeración 4 °C y después se mantuvo en un baño de hielo.