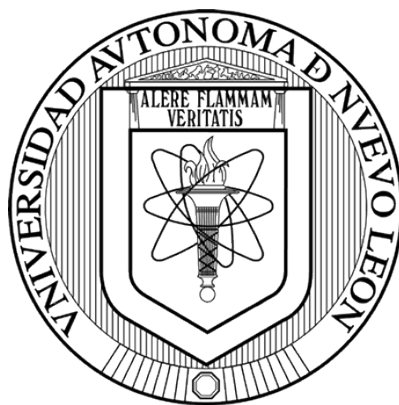


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

FACULTAD DE AGRONOMÍA



**INCLUSIÓN DE ARCILLAS ESMECTITAS EN MASA DE NIXTAMAL
PARA REDUCIR LA EXPOSICIÓN DE AFLATOXINAS Y
FUMONISINAS**

T E S I S

QUE PRESENTA

MVZ. JORGE MIGUEL VILLARREAL GUERRA

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRÍA EN CIENCIA ANIMAL

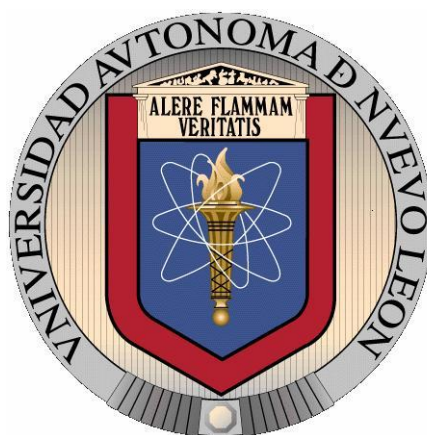
GENERAL ESCOBEDO, N.L.

AGOSTO DEL 2014

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

FACULTAD DE AGRONOMÍA



**INCLUSIÓN DE ARCILLAS ESMECTITAS EN MASA DE NIXTAMAL
PARA REDUCIR LA EXPOSICIÓN DE AFLATOXINAS Y
FUMONISINAS**

T E S I S

QUE PRESENTA

MVZ. JORGE MIGUEL VILLARREAL GUERRA

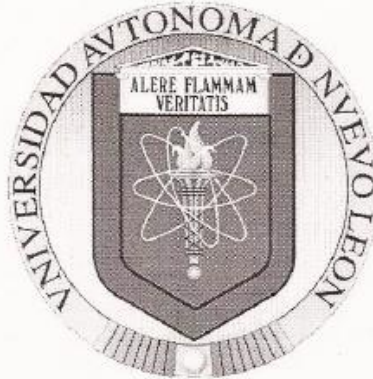
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRÍA EN CIENCIA ANIMAL

GENERAL ESCOBEDO, N.L.

AGOSTO DEL 2014

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



INCLUSIÓN DE ARCILLAS ESMECTITAS EN MASA DE NIXTAMAL
PARA REDUCIR LA EXPOSICIÓN DE AFLATOXINAS Y FUMONISINAS

Aprobación de tesis por el comité particular de

MVZ. Jorge Miguel Villarreal Guerra

Ph. D. Alicia Guadalupe Marroquín Cardona.
Asesor principal

Dra. Patricia González Barranco.
Asesor externo

Dr. Hugo Bernal Barragán.
Co-Asesor

Dr. Francisco Javier Picón Rubio.
Co-Asesor

“Un gran placer en la vida, es lograr lo que la gente te dice que no puedes lograr”

-Walter Bagehot.

DEDICATORIA

Éste documento va dedicado a mis asesores, principalmente a la Ph. D. Alicia Marroquín, sin tu confianza depositada en mi desde un principio, nada de esto se habría realizado; así como a la Dra. Patricia González, al Dr. Francisco Picón y al Dr. Hugo Bernal; sin duda alguna todos ustedes han dejado una huella importante en mi vida profesional y académica.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres gracias por hacer su trabajo: educarme y darme las herramientas para siempre prepararme más, ¡Gracias papás!

A mis hermanos Eduardo, Alejandro, Erik y Devany por permitirme ser su ejemplo e inspiración, esto va por ustedes.

A mis asesores, gracias por siempre motivarme e inspirarme a dar más, por compartir su invaluable aportación a ésta investigación.

Al personal técnico y de servicio social del Laboratorio de Nutrición por su ayuda durante la fase experimental del proyecto.

A mis amigos de posgrado por todos los ánimos que me dieron, por su ayuda, consejos, por el tiempo que compartimos dentro y fuera de las aulas, así como su inolvidable amistad. ¡Gracias totales!

A mis amigos que no hace falta mencionarlos porque siempre han estado en este camino de mi lado, permitiéndome siempre buscar ser una mejor persona, con su apoyo, GRACIAS por ser parte de esto.

Por último, al CONACyT que gracias a la beca de manutención otorgada para realizar mis estudios, puedo hoy concluir esta etapa de mi vida profesional.

ABREVIATURAS

µg	Microgramo
µl	Microlitro
ACS	Reactivo analítico de American Chemical Society
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AF	Aflatoxina
CHC	Carcinoma Hepatocelular
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
FB	Fumonisina
g	Gramo
HBV	Hepatitis B Virus
HFB ₁	Fumonisina B ₁ hidrolizada
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography
kg	Kilogramo
mg	Miligramo
mL	Mililitro
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
nm	Nanómetro
pH	Potencial de hidrógeno
ppb	Partes por billón
ppm	Partes por millón

ÍNDICE DE CONTENIDO	Página
ÍNDICE DE CONTENIDO.....	V
ÍNDICE DE TABLAS.....	VII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VIII
RESUMEN.....	IX
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. OBJETIVO GENERAL.....	4
1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	5
1.3. HIPÓTESIS.....	6
1.4. JUSTIFICACIÓN.....	7
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	8
2.1. Micotoxinas.....	8
2.2. Aflatoxinas.....	10
2.3. Mecanismo de acción y metabolismo de las aflatoxinas.....	14
2.4. Fumonisinias.....	19
2.5. Mecanismos de toxicidad de las fumonisinias.....	20
2.6. Papel de las aflatoxinas y fumonisinias como carcinógenos.....	22
2.7. Estrategias para reducir la exposición a aflatoxinas y fumonisinias.....	23
2.8. Uso de arcillas como enteroadsorbentes.....	24
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
3.1. Preparación de las muestras.....	30
3.2. Inmunoensayos para aflatoxinas y fumonisinias totales.....	31
3.2.1. Extracción de aflatoxinas y fumonisinias.....	31

3.2.2. Procedimientos.....	32
3.2.3. Medición de pH de las muestras de masa.....	34
3.3. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).....	34
3.3.1. Extracción de micotoxinas para HPLC.....	35
3.3.2. Separación cromatográfica.....	36
3.4. Inclusión de la arcilla en la masa de nixtamal.....	38
3.5. Análisis estadístico.....	39
4. RESULTADOS.....	40
4.1. Resumen de cuestionarios aplicados de consumo de maíz.....	40
4.2. Resultados de cuantificación de micotoxinas por ELISA.....	43
4.3. Resultados de medición de pH.....	45
4.4. Resultados de cuantificación de micotoxinas por HPLC.....	45
4.5. Resultados de inclusión de arcilla.....	46
5. DISCUSIÓN.....	48
6. CONCLUSIONES.....	54
7. LITERATURA CITADA.....	55
8. ANEXOS.....	63
8.1. Cuestionario aplicado sobre el consumo de maíz.....	63
8.2. Mapa de molinos muestreados.....	64
8.3. Concentraciones de aflatoxinas y fumonisinas totales por ELISA...	65

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA	Página
1. Respuestas más frecuentes del cuestionario.....	42
2. Estadística descriptiva de aflatoxinas totales	43
3. Estadística descriptiva de fumonisinas totales.....	44
4. Concentraciones de AFB ₁ y FB ₁ por HPLC.....	46
5. Eficacia de la arcilla para aflatoxinas.....	47
6. Eficacia de la arcilla para fumonisinas.....	47
7. Cantidades posibles de AF y FB en una ración de masa.....	51

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	Página
1. Estructura química de AFB ₁	10
2. Estructura química de aflatoxinas.....	12
3. Aducto de AFB ₁ -GUA.....	16
4. Ruta metabólica de AFB ₁	18
5. Estructura química de FB ₁	20
6. Estructura tridimensional del aluminosilicato.....	25

RESUMEN

Las aflatoxinas (AF) y fumonisinas (FB) son metabolitos tóxicos de algunos hongos *Aspergillus* y *Fusarium*, respectivamente, que frecuentemente contaminan el maíz y sus subproductos, representando un riesgo para la salud pública por sus efectos hepatotóxicos y carcinogénicos. El objetivo de este trabajo fue detectar la presencia de AF y FB en masa nixtamalizada de molinos del área metropolitana de Monterrey y evaluar la eficacia de la arcilla esmectita para reducir la concentración de estas micotoxinas cuando se adiciona en masa nixtamalizada. En total 62 muestras fueron analizadas mediante ELISA competitivo para detección de aflatoxinas totales y fumonisinas totales, y muestras representativas fueron analizadas con HPLC para la cuantificación de AFB₁ y FB₁. La metodología involucró el secado de las masas y posterior molido y tamizaje previo a extracción metanólica de las muestras. Los resultados de ELISA indicaron que los valores de aflatoxinas variaron de 0 a 22.66 µg/kg mientras que los valores de fumonisinas se encontraron en un rango de 0 a 16.68 mg/kg. Los resultados mostraron que en el 8% de las masas las AF se encontraban por encima del límite permisible (12 µg/kg) de acuerdo a la NOM-247-SSA1-2008, y que en el 13% las FB se encontraban superando los niveles permitidos a nivel internacional (4 mg/kg). Muestras representativas fueron analizadas a través de HPLC mostrando concentraciones desde 0-6.1 µg/kg para AFB₁ y rangos desde 0.8-1.2 mg/kg para FB₁. En los estudios de efectividad de la arcilla para reducir las AF en masa, se observó desde 75 a 91.3% de reducción en las muestras (n=5). Para FB sólo en algunas muestras (5 de 8) se obtuvo reducción de entre 5.3 a 82.4%. La reducción para AF resultó significativa ($P < 0.05$) mientras que para FB no lo fue ($P > 0.05$). En conclusión, de acuerdo a los resultados del presente trabajo, AF y FB están ocasionalmente presentes en masas nixtamalizadas y la adición de esmectita tiene potencial para reducir AF y FB presentes en este alimento.

1.- INTRODUCCIÓN

En el ámbito mundial, la contaminación de los alimentos es un problema de salud pública. Debido a los efectos que ésta ocasiona en la salud humana y animal, y a las pérdidas económicas asociadas para el sector agropecuario, en los países desarrollados se dedican innumerables esfuerzos a manera de investigaciones y legislaciones para combatirla (Nepusz *et al.*, 2008).

Las micotoxinas, metabolitos secundarios de algunos hongos filamentosos, son contaminantes comunes de alimentos como semillas y granos. En algunos países en vía de desarrollo, con sectores agrícolas poco desarrollados y con limitaciones en los sistemas de control y vigilancia, las dificultades causadas por las micotoxinas pueden llegar a afectar de manera importante. Por esto, la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), ha divulgado desde hace algunos años, textos relacionados a la implementación de ciertas prácticas con el fin de disminuir la contaminación por micotoxinas. Entre ellos destacan el Sistema de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (HACCP) en la prevención y el control de las micotoxinas, así como el Programa de la FAO para la Prevención y Control de las Micotoxinas (Cerf & Donnat, 2011; FAO, 2011).

En México la documentación de información relacionada con los niveles de contaminación por micotoxinas en los alimentos es limitada debida a factores como: la falta de políticas sanitarias claras en relación a contaminantes naturales

de los alimentos, los pocos recursos disponibles para investigación, el reducido número de laboratorios tecnológicamente equipados para determinaciones especializadas y sus costos, la falta de estandarización de técnicas para análisis de laboratorio y de protocolos de muestreo, la sensibilidad de los métodos de cuantificación utilizados y el escaso número de profesionales con perfil de profundización en la materia (Arrúa-Alvarenga *et al.*, 2012). Estudios pioneros en nuestro país sobre esta área se remontan a 1987 donde Torreblanca y colaboradores documentaron la presencia de micotoxinas como aflatoxinas y zearalanona usando cromatografía de capa fina en granos de maíz para masa nixtamalizada (Torreblanca *et al.*, 1987).

Estos estudios mostraron que granos destinados a consumo humano podían contener hasta 500 µg/kg de aflatoxinas, despertando un gran interés en la comunidad científica debido a los efectos carcinogénicos de este metabolito. Otros estudios contemporáneos al de Torreblanca, documentaron que la nixtamalización era capaz de reducir hasta en un 20% los niveles de aflatoxinas en las tortillas preparadas a partir de maíz contaminado (Carvajal *et al.*, 1987). Estudios posteriores, como el realizado en la bodega “Las Yescas”, en el estado de Tamaulipas, en donde niveles de hasta 295 µg/kg fueron encontrados en muestras de maíz, resaltaron la importancia de las micotoxinas, de los posibles efectos económicos de la contaminación del maíz y de la falta de buenas prácticas de control en el almacenaje de este cereal (Carvajal & Arroyo, 1997).

Estudios más recientes revelan que niveles de contaminación de hasta 385 µg/kg de aflatoxinas pueden ocurrir en productos como tortillas de maíz colectadas en México (Castillo-Urueta *et al.*, 2011). Todos estos estudios revelan que México ha tenido que lidiar con el problema de las micotoxinas por cerca de 20 años y que esta problemática es común y difícil de controlar.

1.1. OBJETIVO GENERAL

Documentar y cuantificar la presencia de aflatoxina y fumonisina en masa obtenida de molinos del área metropolitana de Monterrey, y evaluar la eficacia de un aditivo mineral natural basado en arcilla esmectita para ligar y reducir la disponibilidad de ambas micotoxinas *in vitro*.

1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Ubicar un número representativo de expendios (molinos) en los cuales se ofrecía el servicio de molido de masa y venta de masa nixtamalizada.
2. Aplicar cuestionarios acerca de frecuencia del uso de ese servicio y del consumo de productos de maíz en general.
3. Determinar el contenido de aflatoxinas y fumonisinas totales mediante una prueba de anticuerpos (ELISA); así como AFB₁ y FB₁ por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).
4. Evaluar el efecto de adicionar a la masa un aditivo mineral basado en arcilla esmectita sobre la reducción de la disponibilidad de aflatoxinas y fumonisinas en la masa.

1.3. HIPÓTESIS

Las aflatoxinas y fumonisinas están presentes en masa nixtamalizada de molinos y la adición de arcilla esmectita en esta masa reduce los niveles de ambas micotoxinas *in vitro*. Por consiguiente la exposición de ambas micotoxinas disminuirá en este alimento.

1.4. JUSTIFICACIÓN

Cereales como el maíz, que son utilizados ampliamente en la alimentación humana y animal, sufren frecuentemente contaminación por algunos hongos que sintetizan micotoxinas, tales como aflatoxinas y fumonisinas. Estas micotoxinas pueden ocurrir en derivados de maíz tales como la masa nixtamalizada y pueden tener efectos importantes en la salud de sus consumidores.

Es importante resaltar que aunque en México, la presencia de AFB₁ ya ha sido documentada en algunos alimentos basados en maíz, la presencia de FB₁ no ha sido adecuadamente investigada.

De mayor importancia es encontrar estrategias que sean útiles para prevenir el riesgo de exposición a estas micotoxinas. Estas estrategias idealmente deben ser fáciles de implementar y de bajo costo, también deben ser culturalmente aceptables. En este sentido, la adición de arcilla esmectita en la masa constituye una tecnología con potencial para la reducción del riesgo a exposición de aflatoxinas y fumonisinas.

2.- REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Micotoxinas

Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos por algunos hongos, dentro de los cuales se encuentran como principales productores a especies de *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*. Estos hongos frecuentemente colonizan y contaminan insumos que son utilizados en la alimentación humana y animal. Se cree que aproximadamente el 25 % de la producción de cereales a nivel mundial se encuentra contaminada con micotoxinas (CAST, 2003; Zain, 2011). Algunas micotoxinas son tóxicas para los humanos y animales aún en bajas concentraciones.

Las micotoxicosis resultan principalmente por el consumo de alimentos contaminados, aunque también se han reportado casos de intoxicación a través de la piel, por tocar sustratos contaminados con cepas toxigénicas, o por inhalación de las esporas y fómites que contienen micotoxinas. Los síntomas de una micotoxicosis dependen de factores tales como el tipo de micotoxinas, la cantidad y la duración de la exposición, la edad, la salud y el sexo del individuo expuesto. La gravedad de la intoxicación por micotoxinas se puede aumentar mediante factores como deficiencias de vitaminas, bajo consumo de calorías, abuso del alcohol, enfermedades infecciosas, inmunosupresión, desnutrición y la interacción sinérgica con otras toxinas (Cano-Sancho *et al.*, 2013; Bezerra da Rocha *et al.*, 2014)

Los principales factores que influyen sobre la toxicidad de las micotoxinas en los humanos son: la cantidad, la biodisponibilidad, la toxicidad inherente, los sinergismos, la continuidad o intermitencia de ingestión, el peso del individuo, su estado de salud y su edad. Este último factor es muy relevante ya que los niños y los jóvenes son más susceptibles a la toxicidad de las micotoxinas debido a un mayor metabolismo basal y a que ellos pueden no tener suficientes mecanismos bioquímicos para la detoxificación (Kuiper-Goodman, 1995; Siloto *et al.*, 2013).

Existe una amplia variedad de micotoxinas que se pueden encontrar como contaminantes de granos de cereales, de las cuales, las más importantes son las aflatoxinas debido a su potencial carcinogénico. De las aflatoxinas más estudiadas, la aflatoxina B₁ (AFB₁) (**Figura 1**) es la más frecuente en alimentos y la más tóxica para los mamíferos. La AFB₁ es uno de los carcinógenos más potentes conocidos en la naturaleza y es clasificado como carcinógeno humano del grupo 1 por la Agencia Internacional de Investigación sobre Cáncer (IARC, 2012; Matsuda *et al.*, 2013). Además, esta toxina es hepatotóxica, teratogénica y mutagénica, causando daños como la hepatitis tóxica, hemorragias, edema, inmunosupresión y el carcinoma hepatocelular (IARC, 2012; Reddy, 2009).

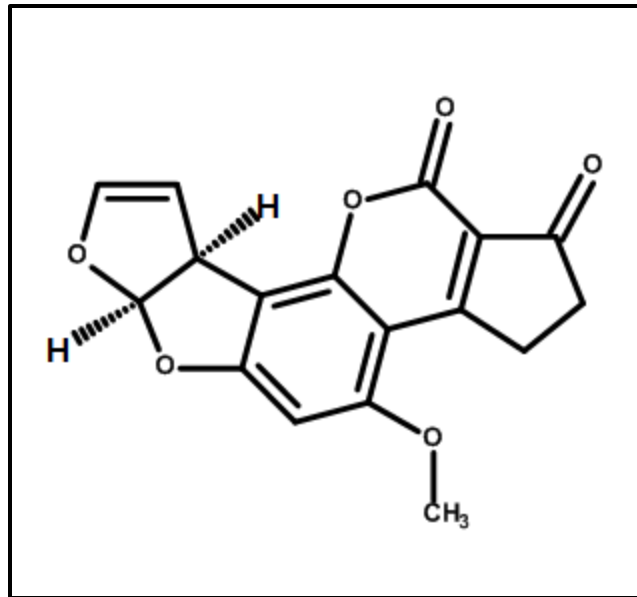


Figura 1.- Estructura química de la AFB₁.

2.2. Aflatoxinas

La palabra aflatoxina (AF) proviene de la primera letra “A” que define al género *Aspergillus*, seguida de las tres letras “fla” correspondiente a la especie *flavus* y el sustantivo “toxina” que significa veneno (Ellis *et al.*, 1991). En particular *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus*, los mayores productores de aflatoxinas, son contaminantes comunes en la agricultura. *A. bombycis*, *A. ochraceoroseus*, *A. nomius* y *A. pseudotamari* también son especies productoras de aflatoxinas, pero son encontrados con menor frecuencia (Giray, 2007; Klich-Maren, 2007). Los hongos *Aspergillus* se caracterizan por no producir conidióforos septados y pueden producir cierto tipo de conidias llamadas esclerotias que tiene función de espora, dándole resistencia en la adversidad de climas como desecación o congelamiento, o bajo condiciones de carencia de nutrientes (García-Cela, 2012; Marin *et al.*, 2013). Las especies de *Aspergillus* son de distribución mundial, pudiendo crecer en una gran variedad de condiciones ambientales y sobre una

gran cantidad de alimentos. La presencia de este hongo no necesariamente implica presencia de aflatoxinas pues hay cepas no toxigénicas. Sin embargo, la ausencia visible del hongo en el alimento no necesariamente implica que el alimento no tenga aflatoxinas, debido a que la toxina puede persistir aún después de que el hongo ha desaparecido, e incluso después de la cocción del alimento (Wiemann & Keller, 2013).

Las aflatoxinas fueron por primera vez aisladas y caracterizadas en Inglaterra después de la muerte de más de 100,000 pavos a causa de una patología denominada la enfermedad “X” que ocurrió en la década de los 60 y que fue asociada con el consumo de productos de cacahuete contaminados (Fountain *et al.*, 2014; Wogan, 1966).

Dentro de las AF más comunes se encuentran la AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂ (**Figura 2**); esta clasificación se basa en los colores de fluorescencia emitidos con luz ultravioleta y designados como “B” para azul y “G” para verde de acuerdo con su origen del Inglés “*blue*” y “*green*”, y a la movilidad cromatográfica relativa en capa fina (Degola *et al.*, 2012). La AFB₁ es la más importante ya que está clasificada como carcinógeno del grupo I por la International Agency for Research on Cancer (IARC). Las demás aflatoxinas (M₁, M₂, P₁, Q₁, aflatoxicol, etc.) ocurren como productos metabólicos de sistemas microbianos o animales pero no ejercen una toxicidad elevada.

Las toxinas tipo B se caracterizan por la fusión de un anillo ciclopentanona a un anillo lactona de la estructura cumarina (**Figura 2**), mientras las toxinas G contienen un anillo lactona fusionado en lugar del anillo ciclopentanona (IARC, 2012; Nicolas-Vazquez *et al.*, 2010; Suarez-Bonnet *et al.*, 2013).

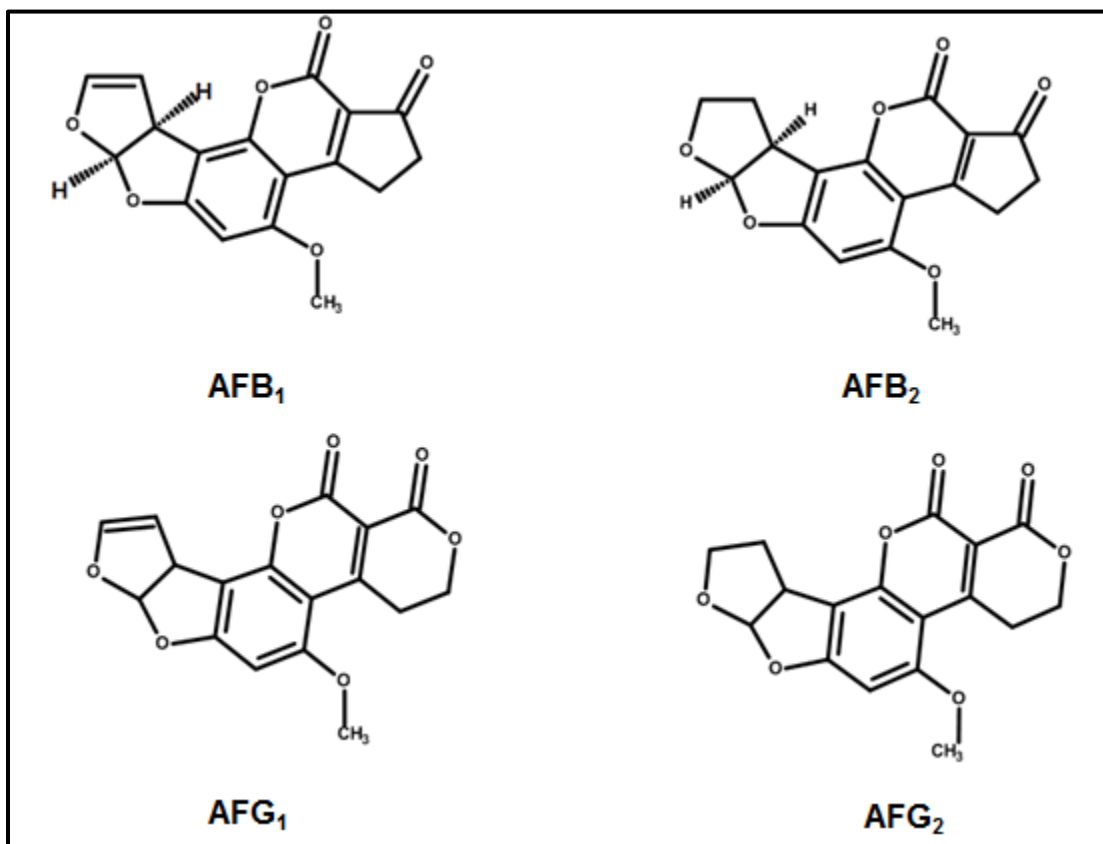


Figura 2.- Estructuras químicas de las aflatoxinas más comunes tomado de (Marin *et al.*, 2013).

Estas aflatoxinas pueden estar presentes en algunos cereales desde antes y después de la cosecha. La rapidez y el grado de contaminación dependen directamente de diferentes factores tales como la temperatura, la humedad, actividad del agua, microbiota concurrente, daño físico de los granos o semillas, así como las condiciones de almacenamiento de estos (EFSA, 2007). Algunos

estudios han reportado que los nutrientes y el tipo de sustrato son factores importantes para la producción de aflatoxinas, la cual es estimulada por un alto nivel de carbohidratos y un bajo nivel de proteínas, ya que los carbohidratos proveen los carbonos precursores para la síntesis de la toxina. Por esta razón, el maíz, es un buen sustrato para la producción de aflatoxinas debido a su alto contenido de carbohidratos y bajo contenido de nitrógeno (Viquez *et al.*, 1994).

La AFB₁ es tóxica para una amplia gama de especies animales y aunque es principalmente un hepatocarcinógeno y hepatotóxica, puede causar otros efectos como inmunosupresión, anemia, reducción de la tasa de crecimiento, disminución de la producción de leche y huevo, reducción de la fertilidad, de la utilización del alimento y de la eficiencia alimenticia. Se ha demostrado que AFB₁ induce el carcinoma hepatocelular en muchas especies de animales, incluidos los peces (trucha arco iris, salmón rojo y guppy), aves (pavos, patos, y gansos), primates no humanos (rhesus, macaco de Java, verde africano, y la ardilla monos) y los roedores (ratas, ratones y musarañas de árbol) (Rawal *et al.*, 2010; Siloto *et al.*, 2013).

El efecto tóxico de las aflatoxinas en animales se divide en dos tipos: agudo y crónico. El primer tipo se manifiesta como una hepatitis aguda, con fiebre, depresión, inapetencia y diarrea. El segundo tipo se manifiesta como un hepatocarcinoma y los síntomas como vómito, dolor abdominal y hepatitis se van presentando paulatinamente hasta causar la muerte (Eaton *et al.*, 2010; Wild & Gong, 2010).

La exposición a aflatoxinas se produce principalmente por ingestión de comidas contaminadas. La inhalación de estas toxinas también puede suceder ocasionalmente debido a exposición de tipo laboral. Dentro de los efectos de las aflatoxicosis agudas en los seres humanos se encuentran vómitos, dolor abdominal, edema pulmonar, coma, convulsiones, hígado graso, edema cerebral severo, así como afectaciones a riñón y al corazón (Goossens *et al.*, 2012; Mary *et al.*, 2012; Rawal *et al.*, 2010).

2.3. Mecanismo de acción y metabolismo de las aflatoxinas

El mecanismo de acción tóxica de las aflatoxinas, involucra la formación de ligandos entre uno de sus metabolitos (producido en el hígado luego de la ingestión de la toxina), con el ADN de los hepatocitos, causando alteraciones en su replicación (Wild & Turner, 2002). La ruta de activación es la conversión de AFB₁ en el metabolito AFB₁-8,9-epóxido por los citocromos P-450 (CYP-450). La formación del epóxido requiere la presencia de un doble enlace entre los carbonos C₈-C₉, por esta razón las aflatoxinas B₂ y G₂ son prácticamente atóxicas en comparación con las aflatoxinas B₁ y G₁ (Eaton *et al.*, 2010).

En mamíferos las funciones de los CYP-450 están bien descritas, pero la información es limitada en aves de corral, especialmente en el contexto del metabolismo de AFB₁. Los CYP-450 son oxidasas de función mixta que catalizan la biotransformación de una amplia variedad de xenobióticos. Ellos son una superfamilia de hemoproteínas que ayudan en la oxidación de diversos sustratos

tales como esteroides, eicosanoides, productos farmacéuticos, plaguicidas, contaminantes y carcinógenos (Gross-Steinmeyer & Eaton, 2012; Rawal *et al.*, 2010).

Para que la acción tóxica de la aflatoxina ocurra es necesario que ésta tenga un cambio metabólico, el cual ocurre cuando la AFB₁ llega al hígado de los organismos que la ingieren. Dicho cambio ocurre en las células hepáticas, y es causado por los CYP-450 microsomales a través de una reacción en la que participan oxígeno y las enzimas dependientes del NADPH localizadas en el retículo endoplásmico. Así, una vez absorbida la AFB₁ desde el tracto digestivo llega al tejido hepático donde pasa por dos fases de biotransformación:

Fase I: por acción de enzimas específicas del tipo CYP-450 (principalmente la CYP1A2, 2A6 y 3A4) que producen derivados reducidos y oxidados, algunos de ellos con actividad carcinogénica. Uno de los productos del metabolismo en esta Fase I es el compuesto AFB₁ exo-8,9-epóxido, el cual es altamente inestable y se une con alta afinidad a la guanina (GUA) reaccionando covalentemente con el ADN para formar aductos AFB₁-GUA (**Figura 3**) responsables de los efectos carcinogénicos y mutagénicos de las aflatoxinas. La velocidad de generación de este metabolito activo es dependiente de la dosis, aumentando cuando la dosis de aflatoxina disminuye. El aducto, que ha sido identificado como el 8,9 -dihidro-8-(N7-guanil)-9-hidroxi aflatoxina B₁ (AFB₁-N7-guanidina) no es removido del ADN debido a que su anillo imidazol se abre y forma una molécula más estable química y biológicamente, la AFB₁-formamidopirimidina (AFB₁-FAPY), que puede causar

errores en las transcripciones subsecuentes del ADN. Este compuesto puede estar presente por más de una ronda de replicación del ADN, y se sugiere que es muy importante durante la iniciación del tumor, ya que da lugar a una transversión $G \rightarrow T$ en la tercera base del codón 249 del gen p53. La persistencia del aducto AFB₁-FAPY en tejido hepático y la formación de tumores se han demostrado en varios modelos experimentales (Eaton *et al.*, 2010; Groopman *et al.*, 2005; Gross-Steinmeyer & Eaton, 2012; Guarisco *et al.*, 2008; Guarisco *et al.*, 2008; Smela *et al.*, 2001; Wild & Gong 2010).

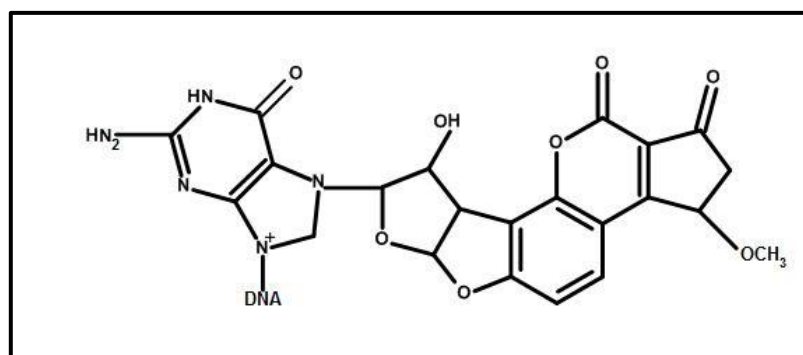


Figura 3.- Formación del aducto aflatoxina B₁ y la guanina del ADN.

Tomado de (Wild & Turner, 2002).

Fase II: El metabolismo de AFB₁ incluye también a aquellas reacciones de conjugación enzimática que inactivan al 8,9-epóxido, el cual puede hidrolizarse espontáneamente a 8,9 dihidrodiol, o bien puede conjugarse con glutatión formando un aducto con este tripéptido (AFB₁-SG). Este compuesto se forma por la acción catalítica de enzimas de la superfamilia glutatión S-transferasas (GTS).

El conjugado AFB₁-SG es el metabolito biliar más abundante y es excretado en la orina (**Figura 4**). Algunas investigaciones han reportado que la inclusión de antioxidantes en la dieta, aumentan los niveles de GTS, y han mostrado una mayor eliminación de AFB₁-SG en la orina de los animales tratados. De ahí que el tipo de dieta de una población podría ser determinante en su respuesta a la ingestión de alimentos contaminados con AFB₁ (Groopman *et al.*, 2005; Guarisco *et al.*, 2008; Moudgil *et al.*, 2013; Wild & Turner, 2002).

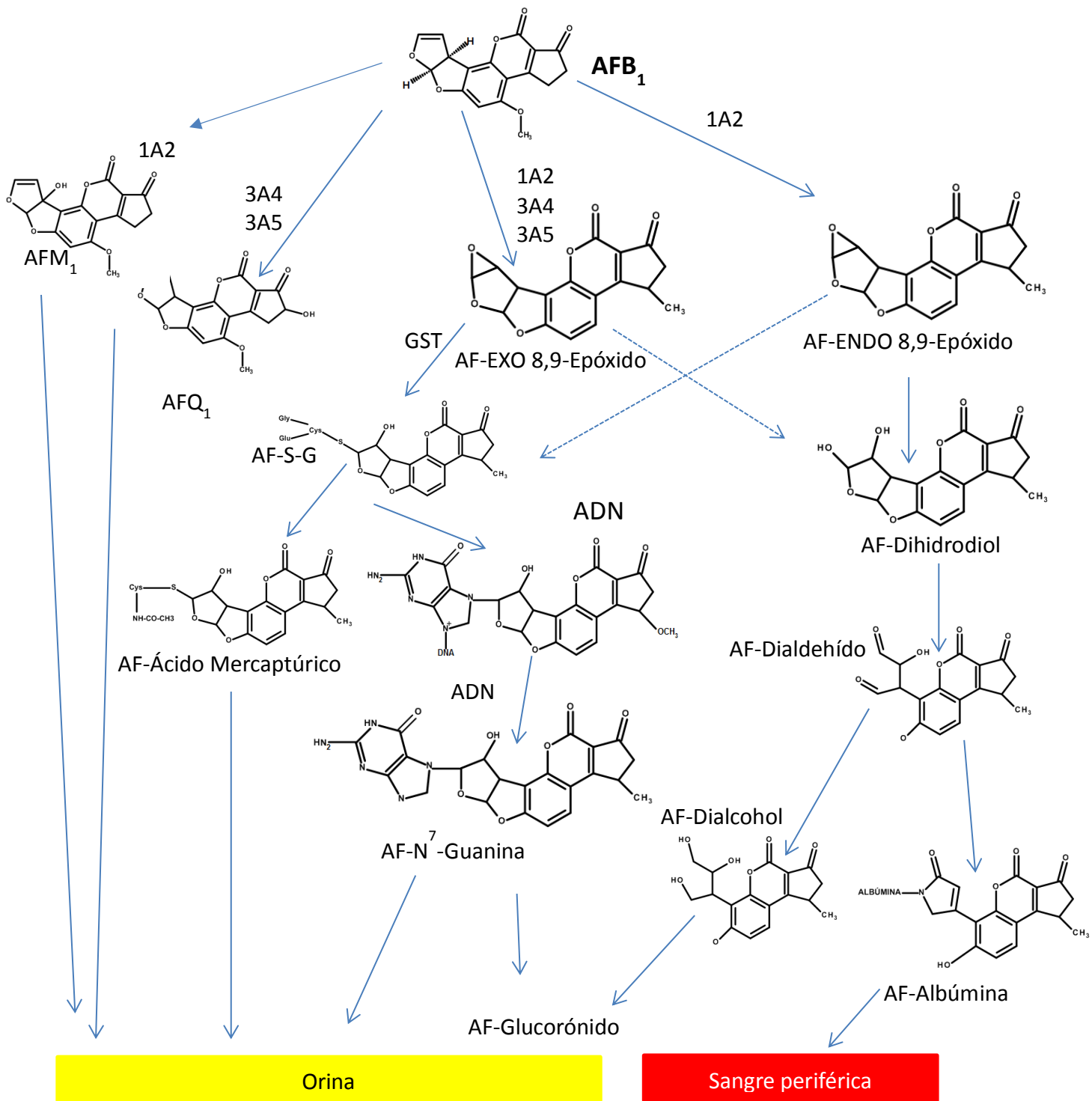


Figura 4.- Ruta metabólica de AFB₁ que conduce a metabolitos y biomarcadores.

1A2:CYP1A2; 3A4:CYP3A4; 3A5:CYP3A5; GST:glutathione S-transferase;

AFAR:Aflatoxin-aldehído reductasa; Aflatoxin-S-G:aflatoxin–glutathione conjugado

(Wild & Turner, 2002).

2.4. Fumonisin

Las fumonisinas son otras micotoxinas que frecuentemente contaminan el maíz y que han ganado importancia reciente. Estas toxinas son producidas por los hongos *Fusarium verticilloides* y *Fusarium proliferatum*. Se estima que el 59 % del maíz y sus productos a nivel mundial se contaminan con fumonisinas, entre las cuales se encuentran FA₁, FA₂, FB₁, FB₂, FB₃ y FB₄. Se considera que en los granos de maíz, FB₂ y FB₃ se producen simultáneamente con FB₁ (**Figura 5**), siendo ésta la más tóxica, y por consiguiente clasificada dentro del grupo 2 B de la IARC (Domijan, 2012). La FB₁ es la fumonisina más prevalente, ya que se ha reportado su presencia en alrededor de 70 a 80% del contenido de fumonisinas totales. La fumonisina FB₁ contiene una cadena larga de hidrocarburos, similar a la esfinganina y esfingosina. La FB₂ difiere de FB₁ sólo por la ausencia del grupo hidroxilo en C₁₀. La FB₃ difiere de FB₁ por la ausencia del grupo hidroxilo en C₅, y FB₄ carece tanto de los grupos hidroxilo en C₅ como C₁₀ (Grenier *et al.*, 2012; Zain, 2011). La FDA recomienda que las fumonisinas totales en la alimentación humana deben limitarse a 4 ppm (FDA, 2001).

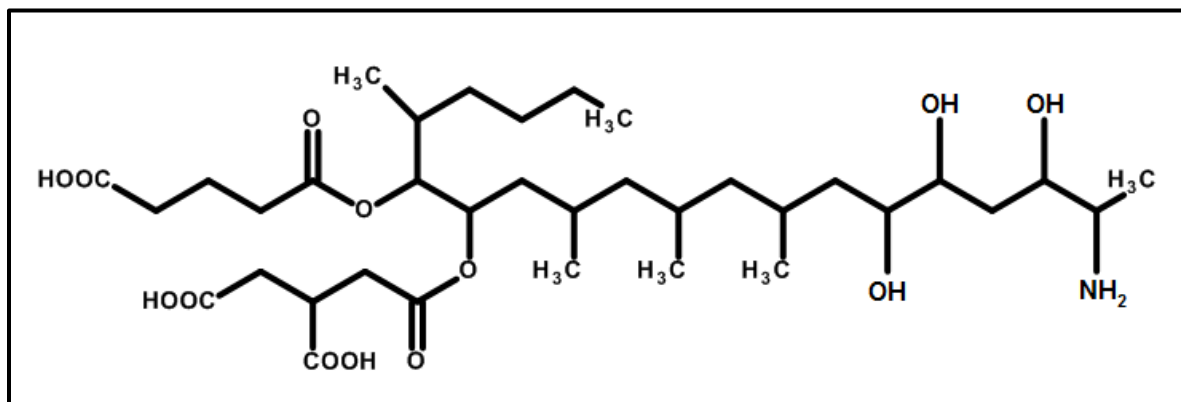


Figura 5.- Estructura química de FB₁.

2.5. Mecanismos de toxicidad de las fumonisinas

Los efectos tóxicos de las fumonisinas van desde la hepatotoxicidad y la toxicidad renal, hasta efectos específicos de la especie animal, tales como edema pulmonar en cerdos, leucoencefalomalacia en caballos y tumores en ratas. En los seres humanos, la exposición a fumonisinas se ha relacionado con el cáncer de esófago y defectos en el desarrollo del tubo neural. El efecto en el intestino ha sido menos investigado, pero las alteraciones de las vellosidades, reducen la expresión de mediadores inmunes y se ha detectado un aumento en la colonización intestinal por bacterias patógenas oportunistas en lechones (Gelderblom & Marasas, 2012; Gelderblom *et al.*, 2008; Marasas, 2004; Voss, 2007).

La FB₁ afecta los principales procesos celulares, tales como el crecimiento y la diferenciación celular, la apoptosis y el estrés oxidativo. Algunos autores han demostrado que FB₁ tiende a ser carcinogénica tanto en el hígado como en el riñón, debido a la interrupción de la biosíntesis de los esfingolípidos (Mary *et al.*, 2012) ya que FB₁ es altamente polar, por lo que atraviesa la membrana plasmática probablemente a través de transportadores de aminoácidos, y es capaz de interactuar con estructuras subcelulares alterando la función celular. Esta toxina es resistente a las condiciones de temperatura y preparación de alimentos que normalmente se utilizan en el sector agroalimentario y por lo tanto representa un riesgo significativo para la salud humana y animal (Scott, 2012). Se estima que el promedio de rango de consumo diario para humanos de FB₁ varía entre 12 y 140 ppm; sin embargo, en regiones geográficas donde el maíz es el principal alimento (por ejemplo, Sudáfrica), su consumo puede llegar hasta 2500 ppm (Lombard *et*

al., 2014). Si bien el mecanismo citotóxico de FB₁ se atribuye a la interrupción del metabolismo de los esfingolípidos, sus mecanismos subyacentes específicos para la promoción de cáncer aún son desconocidos (Karuna & Rao, 2013). La toxicidad de FB₁ Hidrolizada (HFB₁) no está bien documentada, reportes *in vitro* e *in vivo*, indican que la HFB₁ tiene una capacidad limitada para inhibir la acción de la ceramida sintetasa (Voss *et al.*, 2009).

En los mamíferos, la concentración de esfingosina es, por lo general, de 3 a 5 veces más elevada que la de esfinganina. La esfinganina N-aciltransferasa y la esfingosina N-aciltransferasa o ceramida sintetasa son enzimas fundamentales en el metabolismo de la biosíntesis de los esfingolípidos (Voss, 2007; Voss *et al.*, 2009). Las fumonisinas pueden alterar la concentración y la proporción entre la esfinganina y la esfingosina de forma que se disminuye la biosíntesis de la esfingosina y se acumula esfinganina. Estas micotoxinas pueden, en células eucarióticas, bloquear la biosíntesis de los esfingolípidos complejos, que son la base de formación de mensajeros secundarios que controlan los diferentes procesos entre células tales como la activación y desactivación de proteínas específicas y la expresión genética (Frisvad, 2007; Gelderblom *et al.*, 2008). La acumulación de esfinganina y esfingosina es una causa principal de la toxicidad de la fumonisina B₁, ya que ambas pueden ser citotóxicas, y tienen efectos inhibidores del crecimiento, además de que estas bases esfingoides inducen la apoptosis. El aumento de la apoptosis parece jugar un papel importante en los efectos tóxicos, incluyendo la inducción de tumores. Sin embargo, se debe mencionar que la reducción de la concentración de la ceramida y el aumento de la

concentración de esfingosina-1-fosfato pueden también dar lugar a una inhibición de la apoptosis y promueve la mitosis y la regeneración celular (Bondy *et al.*, 2012; Gelderblom & Marasas, 2012; Lazzaro *et al.*, 2012).

2.6. Papel de las aflatoxinas y fumonisinas como carcinógenos

El carcinoma hepatocelular (CHC), es la sexta causa principal de muertes por cáncer en el mundo (Persson *et al.*, 2012). De los 550,000-600,000 nuevos casos reportados cada año a nivel mundial, se estima que entre 25,000 y 155,000 se pueden atribuir a exposición a aflatoxinas. La mayoría de los casos ocurren en África, sudeste asiático y China, cuyas poblaciones además tienen alta prevalencia de Hepatitis B Viral (HBV) y existen pocos controles en la contaminación de alimentos por aflatoxinas y fumonisinas (Domijan, 2012; Liu, 2010; Pizzolitto *et al.*, 2012). Ambas micotoxinas, AFB₁ y FB₁ se han relacionado al desarrollo de CHC actuando como promotor de cáncer y carcinógeno completo, respectivamente (Sozmen *et al.*, 2013).

Por otra parte, para FB₁, se ha propuesto que la inhibición de la producción de ceramida sintetas podría conducir a una reducción de la apoptosis y supervivencia de células con ADN dañado, a un incremento en la estimulación de la división celular y al aumento de la regeneración celular que por consiguiente fomentan la carcinogénesis. Sin embargo se sabe muy poco, sobre los efectos de FB₁ en los seres humanos y las investigaciones se han llevado a cabo mayormente en roedores. Algunos estudios ecológicos han reportado correlaciones entre FB₁ en los tipos de alimentos y el carcinoma de células

escamosas locales del esófago y cáncer de hígado, pero los estudios ecológicos proporcionan sólo una débil evaluación de cualquier carcinógeno. Un único estudio epidemiológico utilizando un biomarcador de la exposición individual no encontró ninguna asociación con el riesgo de cáncer de estómago o esofágico (Domijan, 2012; Persson *et al.*, 2012).

2.7. Estrategias para reducir la exposición a aflatoxinas y fumonisinas

Se han desarrollado varias estrategias para reducir la exposición a las aflatoxinas, algunas de ellas basadas en el uso de agentes químicos como el ozono (McKenzie *et al.*, 1998) y otras que promueven la conjugación de las toxinas para ser eliminadas por orina (Wang *et al.*, 1999). Algunas estrategias han sido implementadas como tecnologías propias de la preparación de alimentos de maíz, por ejemplo la nixtamalización. La eficacia de este proceso ancestral para reducción de aflatoxinas ha sido muy controversial, ya que algunos autores han documentado que la alcalinización con hidróxido de calcio solo afecta estructuralmente a la molécula, abriendo sus anillos de lactona reduciendo su fluorescencia, sin embargo una vez que la toxina alcanza ambientes ácidos tales como los encontrados en el jugo gástrico durante la digestión de alimentos, ésta recobra su estructura original y toxicidad (Elias-Orozco *et al.*, 2002; Guzman-de-Pena *et al.*, 1995; Nicolas-Vazquez *et al.*, 2010). Para el caso de las fumonisinas, el tratamiento alcalino del maíz contaminado, escinde mediante hidrólisis el ácido tricarbálico de las cadenas laterales de FB₁ que conducen a la formación de la HFB₁. Esta conversión de FB₁ a HFB₁ también se puede obtener por la degradación microbiana, a través del uso de carboxilesterasas de fumonisinas,

enzimas específicas del catabolismo de FB₁ (Heinl *et al.*, 2010; Murphy *et al.*, 1996).

2.8. Uso de arcillas como enteroadsorbentes

Constantemente se están buscando nuevas estrategias para reducir la presencia de micotoxinas en los alimentos. Un enfoque prometedor y práctico parece ser la adición, a alimentos contaminados, de materiales adsorbentes no nutritivos, tales como aluminosilicatos naturales del tipo esmectita (p. ej. montmorillonita, bentonita) (Daković *et al.*, 2008). Desde la época de los 70's se ha impulsado el uso de arcillas naturales, tales como la montmorillonita (**Figura 6**), ya que se encuentran ampliamente distribuidas en todo el mundo. Mediante investigaciones con arcillas realizadas en países como EE.UU., Japón, México, India, China y Argentina, se ha observado que estas arcillas son promisorias para secuestrar aflatoxinas y propiciar con ello la reducción de su toxicidad (Deng *et al.*, 2010; Phillips *et al.*, 2006).

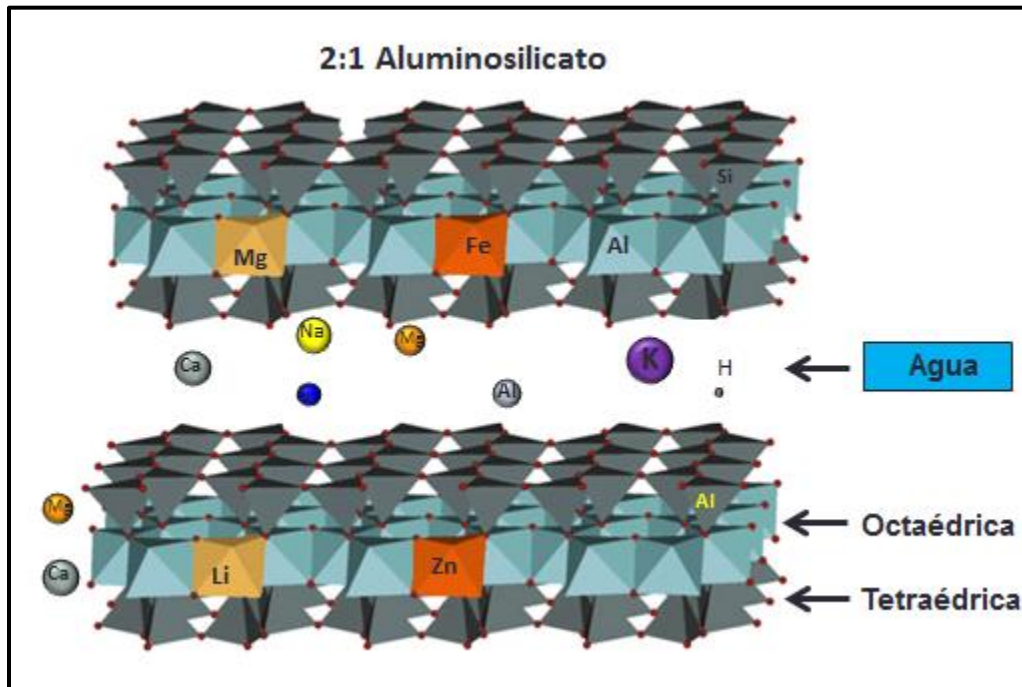


Figura. 6.- Estructura tridimensional del aluminosilicato (Marroquín Cardona *et al.*, 2009).

Las bentonitas son arcillas minerales resultantes de la descomposición de cenizas volcánicas, compuestas principalmente de esmectitas. Reciben este nombre por sus propiedades de expansión y deshidratación. Existen seis tipos de esmectitas pero las más abundantes en la naturaleza y las más efectivas como adsorbentes de aflatoxinas son las montmorillonitas. Estas arcillas tienen la capacidad de reducir efectivamente la biodisponibilidad de AFB₁ y FB₁ que se encuentra en los alimentos contaminados (Daković *et al.*, 2010; Marroquín Cardona *et al.*, 2009; Vekiru *et al.*, 2007).

Muchas bentonitas se han probado en numerosos ensayos de alimentación animal en especies como pollos, pavos, patos, cerdos, corderos, visones, truchas, tilapias, vacas lecheras y cabras (Deng *et al.*, 2010). Estudios clínicos en los que la arcilla comercial NovaSil (BASF, Alemania) fue añadida a la dieta humana, a

niveles altos y bajos, tuvieron resultados prometedores en la reducción de biomarcadores de exposición. En estos estudios, las concentraciones del aducto aflatoxina B₁-albúmina en muestras de sangre y de la aflatoxina M₁, un metabolito de la aflatoxina B₁ presente en la orina, fueron reducidos de manera dependiente de la dosis de arcilla (Afriyie Gyawu *et al.*, 2008 a; Afriyie Gyawu *et al.*, 2008 b; Phillips *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008).

Algunos autores han discutido la mineralogía y las propiedades químicas de las bentonitas, relacionadas con la adsorción de aflatoxinas. Para esto se establecieron protocolos para modificar las esmectitas o zeolitas con cationes inorgánicos, amonio cuaternario orgánico, y fosfatidilcolina, para aumentar la capacidad de adsorción a través de los minerales y con ello reducir los niveles de las aflatoxinas. Así mismo se ha investigado la interferencia de otros ingredientes alimentarios en la harina de maíz respecto a la adsorción de aflatoxinas, con el fin de seleccionar o modificar esmectitas que desintoxican efectivamente aflatoxinas y mejorar la selectividad de las mismas para su uso en piensos. El mecanismo molecular de la interacción de la aflatoxina y la esmectita también ha sido investigado (Deng *et al.*, 2010; Dixon *et al.*, 2008; Jaynes *et al.*, 2007), sin embargo no existe hasta ahora un mecanismo aceptado que pueda considerarse como único.

Algunas investigaciones sugieren que las superficies basales externas, los bordes y el espacio entre las capas son los posibles sitios de adsorción de aflatoxinas, mientras que otras basados en la simulación computacional y

observaciones realizadas en experimentos, concluyen que la adsorción se produce sólo en las superficies de borde externo y que el espacio entre capas es inaccesible para las toxinas. Otros estudios sugieren que la integridad de los espacios interlaminares (capas) son indispensable para la adsorción ya que al colapsar la arcilla (p. ej. NovaSil) con calor de hasta 800 grados Celsius, se reduce la adsorción de aflatoxinas de manera significativa. Los autores designaron este mecanismo quimisorción selectiva (Deng & Dixon 2002; Desheng, 2005; Phillips *et al.*, 2002; Phillips *et al.*, 1995).

Algunos autores han sugerido mecanismos de acción que involucran interacciones del tipo ion-dipolo y puentes de hidrógeno entre los grupos carbonilo de la toxina y los cationes intercalados en el espacio intralaminar (Deng & Szczerba, 2011), mientras que otros han propuesto modelos de unión, tales como un modelo de donante - receptor de electrones (Phillips *et al.*, 2006; Phillips *et al.*, 2002); así como la quelación de los dos grupos carbonilo con borde incoordinado de aluminio (Smith *et al.*, 1994).

Para fumonisina, se han reportado posibles mecanismos de acción de las arcillas tales como la adsorción de la toxina en la capa superficial de la arcilla. Un posible mecanismo de acción que se ha sugerido tiene que ver con la protonación del grupo amino en el C₂ de la molécula que ocurre en las condiciones ácidas del estómago. Esta protonación carga positivamente a la fumonisina haciendo que se ligue a la superficie interlaminar negativa de la arcilla (Robinson *et al.*, 2012).

A través de estos posibles mecanismos descritos para ambas toxinas, la arcilla es capaz de adsorber las micotoxinas durante su paso por el tracto gastrointestinal de animales y seres humanos, reduciendo así la biodisponibilidad de las mismas hacia la sangre y otros órganos (Marroquín-Cardona *et al.*, 2011).

3.- MATERIALES Y MÉTODOS

Para la primera fase se localizaron expendios de masa nixtamalizada (molinos) representativos del área metropolitana de Monterrey, en total se encontraron diez para cada uno de los siguientes municipios: Monterrey, Apodaca, San Nicolás de los Garza, Guadalupe, Santa Catarina y General Escobedo; para el municipio de San Pedro Garza García, sólo se encontraron dos expendios de masa nixtamalizada, resultando así un total de sesenta y dos molinos muestreados.

Así mismo se aplicó un cuestionario (ver Anexo No. 8.1.) para documentar el proceso de nixtamalización que se utilizaba en los molinos o de qué manera la población prepara la masa que ahí se procesa, así mismo se consideró conocer la frecuencia de consumo de los diferentes productos de maíz que existen.

Los resultados de este cuestionario fueron sometidos a un análisis estadístico no paramétrico usando la prueba de alfa de Cronbach, el cual demuestra la confiabilidad de estos instrumentos bajo este análisis (Cabello & Chirinos, 2012).

La fórmula de este análisis consiste en lo siguiente:

$$\alpha = \frac{K}{K - 1} \left[1 - \frac{\sum Vi}{\sum Vt} \right]$$

α = alfa de Cronbach

K = Número de ítems

V_i = Varianza de los ítems

V_t = Varianza total

3.1. Preparación de las muestras

Una vez ubicados los molinos, se procedió a coleccionar muestras de masa nixtamalizada. Cada muestra consistió en 500 g de masa, la cual fue sometida a un proceso de secado en una estufa de aire forzado, a temperatura de 65° C durante 48 horas. Una vez deshidratada, la masa fue pulverizada en un molino marca THOMAS-WILEY® (ThermoScientific, Waltham, MA, USA) modelo 4 con tamiz interno de 1 mm y tamizada usando un tamiz de la marca FISHERBRAND® (ThermoScientific, Waltham, MA, USA) modelo No. 20 con 850 µm de apertura. El resto de la masa fue congelado a -20 °C para futuros análisis.

3.2. Inmunoensayos para aflatoxinas y fumonisinas totales

Para la extracción de las aflatoxinas se realizaron los procedimientos descritos en el manual del estuche comercial de AgraQuant® de los laboratorios Romer (Singapore Pte. Ltd.) para detección de aflatoxinas totales. Las muestras para extracción consistieron en 20 g de masa previamente deshidratada y tamizada. La solución de extracción (70:30 metanol:agua) se preparó tomando 70 mL de metanol grado ACS (Jalmek, México) y 30 mL de agua bidestilada, para tener un total de 100 mL para cada muestra. Las mezclas de muestra más solución de extracción fueron licuadas durante tres minutos a alta velocidad en una licuadora convencional, para posteriormente filtrar la mezcla a través de papel filtro Whatman (GE, Healthcare; UK) No. 1. El filtrado que se obtuvo fue utilizado para los análisis de micotoxinas correspondientes.

3.2.1. Extracción de aflatoxinas y fumonisinas

El estuche comercial AgraQuant® es un ELISA directamente competitivo en el cual las aflatoxinas extraídas de las muestras y las micotoxinas controles competirán con las aflatoxinas conjugadas a enzimas por los sitios de unión disponibles de los anticuerpos que se encuentran recubriendo los pocillos de dilución. El estuche consta de una solución de conjugado, cinco viales que contienen soluciones concentradas de aflatoxinas (controles), una solución de sustrato que contiene la enzima para la reacción colorimétrica, que desarrolla un color azul, y la solución bloqueadora o de alto encargada de detener la reacción colorimétrica de la unión del sustrato con el conjugado. El resultado colorimétrico

es inversamente proporcional a la concentración de aflatoxinas en la muestra o en los controles.

3.2.2. Procedimientos

Se utilizaron placas de 48 ó 96 pocillos de dilución. Para la curva de calibración, en los pozos respectivos se depositaron por separado 100 μ L de cada una de las soluciones control, que incluían concentraciones de 0, 4, 10, 20 y 40 μ g/mL (ppb) de aflatoxinas totales. Después se agregaron 100 μ L de la solución previamente extraída de cada muestra, para posteriormente adicionar 200 μ L de la solución de conjugado a cada uno de estos pocillos. Después de esto, la solución en cada pocillo se mezcló en tres ocasiones usando una micropipeta, y se tomaron 100 μ L que fueron colocados en pocillos recubiertos con anticuerpos y se dejó reposar durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después, éstos se voltearon para desechar el sobrenadante y se enjuagaron cinco veces con 300 μ L de agua destilada. Al terminar, a cada pozo se le colocaron 100 μ L de la solución sustrato y se dejó actuar durante cinco minutos. Posteriormente se aplicaron 100 μ L de la solución bloqueadora o de alto y cinco minutos después se colocó la placa con pocillos en un espectrofotómetro lector de placas de ELISA Chromate® Microplate Reader (Awareness Technology Inc. Palm City, FL, USA) para su lectura a 450 nm de longitud de onda. Las densidades ópticas obtenidas fueron usadas para cuantificar la concentración de aflatoxinas totales en base a la curva de calibración.

Para la cuantificación de fumonisinas totales se utilizó un estuche comercial de la misma marca AgraQuant®, cuyo procedimiento consistió en colocar en cada pocillo la cantidad de 100 μL de los patrones de control con concentraciones de 0, 0.25, 1, 2.5 y 5 ppm de fumonisinas totales, así como de las soluciones extraídas de las muestras. Después de esto, se agregaron 200 μL del conjugado en cada pocillo con la solución de titulación o la muestra y se mezclaron con una pipeta tres veces para obtener 100 μL de esta solución, la cual fue colocada en los pocillos recubiertos con anticuerpos para fumonisinas. Se dejó incubar durante diez minutos a temperatura ambiente; y se voltearon para permitir desechar el sobrenadante. Posterior a esto, se enjuagaron con 300 μL de agua destilada. Después se colocaron 100 μL de la solución sustrato y se dejó actuar durante cinco minutos. Posteriormente se añadieron 100 μL de la solución bloqueadora o de alto; para finalmente, cinco minutos después se colocó la placa con pocillos dentro del espectrofotómetro lector de ELISA y se realizó la lectura a una longitud de onda de 450 nm con el fin de cuantificar las fumonisinas totales en base a su densidad óptica.

3.2.3. Medición de pH de las muestras de masa

La medición del pH de las muestras se realizó con el objetivo de verificar las condiciones de alcalinidad residual de las muestras ya que la alcalinidad afecta la detección de aflatoxinas. El equipo usado para medición de pH fue un potenciómetro de la marca ThermoScientific® Orion Star A Series (Waltham, MA, USA) con sus estándares respectivos. Para la medición del pH de las muestras se prepararon suspensiones con 2 g de masa deshidratada y 10 mL de metanol. Esto se realizó simulando las proporciones de masa y metanol usados para las extracciones de micotoxinas. Las suspensiones fueron agitadas en un agitador Vibrax® Vxr Basic (IKA, Wilmington, USA) por 30 segundos y el pH fue medido inmediatamente después.

3.3. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Los análisis de HPLC fueron realizados en el Texas Veterinary Diagnostic Lab (TVMDL) ubicado en College Station, Texas. Las muestras de masa deshidratada (cerca de 60-80 g) fueron enviadas a través de FedEx. Solo se enviaron las muestras que resultaron con niveles que excedían los límites permisibles de aflatoxinas y fumonisinas. A continuación, se describen brevemente los materiales y la metodología empleada para las extracciones de micotoxinas y su análisis con HPLC.

3.3.1. Extracción de micotoxinas para HPLC

La AFB₁ fue extraída siguiendo las recomendaciones del manual de extracción de VICAM. Brevemente, 50 g de muestra de masa pulverizada, 5 g de cloruro de sodio y 100 mL de solución de metanol:agua [80:20] fueron colocados en una licuadora. La mezcla fue licuada por 1 minuto a alta velocidad. La mezcla fue después pasada a través de papel filtro. Un volumen de 10 mL del filtrado fue después diluido y mezclado con 40 mL de agua desionizada ultra pura. Esta dilución fue filtrada a través de filtros de microfibra. El filtrado (10mL) fue después pasado a través de una columna de inmunoafinidad Aflatest™ (VICAM, Watertown, MA, USA) con una velocidad de 1-2 gotas por segundo. Posteriormente, un volumen de 10 mL de agua desionizada ultra pura fue pasado a través de la columna para enjuagarla. Este procedimiento se repitió una vez. Por último, la AFB₁ fue eluida de la columna con 1 mL de metanol y colectada. Posteriormente, 1 mL de agua fue adicionado a la AFB₁ eluida. Esta solución fue usada para inyección en el HPLC (ver condiciones de HPLC en 3.3.2).

La extracción de FB₁ se realizó de manera idéntica a la de AFB₁ para el proceso de licuado. En el proceso de dilución se adicionaron 40 mL de PBS en vez de agua. Posteriormente, 10 mL de filtrado fueron pasados a través de columnas de inmunoafinidad Fumonitest™ (VICAM, Watertown, MA, USA). Un volumen de 10 mL de PBS fue transferido a la columna para enjuagarla con una velocidad de 1-2 gotas por segundo de flujo. Después, 1.5 mL de metanol fueron usados para eluir la FB₁ que fue colectada en una cubeta de vidrio. Esta solución fue usada para el HPLC (ver condiciones de HPLC en 3.3.1).

3.3.2. Separación cromatográfica

Metanol, acetonitrilo, hidróxido de sodio, borato de sodio, cianuro de sodio, fosfato de potasio dibásico, nafatleno-2,3-dicarboxaldehído (NDA) fueron adquiridos grado HPLC. Los estándares de aflatoxina y fumonisina fueron adquiridos de Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Agua ultrapura estéril (18 M Ω) fue obtenida a través de un sistema de filtración.

La AFB₁ fue cuantificada usando HPLC de fase reversa. El sistema de detección consistió en un equipo con detector de fluorescencia (Waters 2475), un reactor fotoquímico para aumentar la detección (PHRED-12) (Aura Industries, Inc, New York, NY), una bomba binaria (Waters 1525) y un automuestreador (Waters 717). Una columna de fase reversa Spherisorb® (Waters, Milford Massachusetts) C18 con 5 μ m de tamaño de partícula (4.6 x 150 mm, Waters) se usó para separar la AFB₁ de la solución. Las longitudes de onda usadas para emisión y excitación fueron 360 y 420 nm, respectivamente. La cuantificación fue determinada usando las medidas de área debajo de la curva usando el software Breeze™ HPLC (Waters, Milford Massachusetts) comparando con los estándares apropiados. Los estándares y las muestras (100 μ L) fueron colocados en el automuestreador para su análisis. La fase móvil consistió acetonitrilo/metanol/agua en proporción de 57:41:2 con una velocidad de flujo de 1.0 mL/min. El tiempo de corrida fue de 19 min con un volumen de inyección de 10 μ L. Bajo estas condiciones la AFB₁ muestra un tiempo de retención de 16 min.

Para la detección de FB₁ se empleó NDA como agente derivatizador ya que esta molécula no emite fluorescencia. El método de derivatización empleado se basa en investigaciones previas de Bennet y Richard (1994), de acuerdo a las cuales NDA forma un complejo estable con la FB₁ que no se degrada rápidamente y permite el re-análisis de muestras. Para la detección de FB₁, el sobrenadante obtenido de las extracciones (1mL) se colocó en tubos de 40 mL color ámbar. Un volumen de 1 mL de amortiguador de borato de sodio [0.05M] fue adicionado al vial, seguido de 0.5 ml de cianuro de potasio (0.13 mg/mL) y 0.5 mL de NDA (0.25 mg/mL). Los viales fueron cerrados, agitados en un vórtex y colocados en un baño de agua caliente a 60°C por 20 min. Después, los frascos fueron colocados en un refrigerador a 4°C durante 4 minutos. Seguido de esto, 7 mL de solución de acetonitrilo:fosfato 60:40 se añadieron a cada frasco para posteriormente ser agitados. De esta solución, 1.5 mL fueron pasados a través de filtros de jeringa de 0.25 µm y el filtrado fue colectado en un frasco de 2 mL para inyección en el HPLC. Estándares apropiados fueron usados y derivatizados de la misma manera que las muestras.

La FB₁ también fue detectada con HPLC fase-reversa usando una columna µBondapack™ C18 (Waters, Milford Massachusetts) con 10 µm de tamaño de partícula (3.9x150mm, Waters). Las longitudes de onda de excitación y emisión fueron establecidas a 420 y 500 nm, respectivamente. La fase móvil consistió en una solución de acetonitrilo, agua: ácido acético en proporción 57:42:1 con una velocidad de flujo de 1.0 mL/min. El tiempo de corrida fue de 8 min con un

volumen de inyección de 10 µl. Los tiempos de retención exhibidos para fumonisina variaron entre 4.7 y 5.8 min bajo estas condiciones.

3.4. Inclusión de la arcilla en la masa de nixtamal

Para verificar si la adición de arcilla podría tener un efecto en la reducción de aflatoxinas y fumonisinas, se realizó un estudio preliminar en el que arcilla NovaSil Plus® (Selko, The Netherlands) fue adicionada al 2% (0.4 g) en cada muestra de 20 g de masa nixtamalizada (en polvo), y se mezclaron mediante agitación en un frasco de plástico. Para este estudio se usaron las muestras de masa nixtamalizada que resultaron con niveles superiores a los límites permisibles bajo la NOM-188-SSA1-2002 (12 µg/kg). Posterior a la adición y mezclado de la arcilla con la masa, se realizó la extracción metanólica y se utilizó el estuche comercial de ELISA de AgraQuant® para aflatoxinas y fumonisinas, con el mismo procedimiento anteriormente mencionado (ver sección 3.2.2. Procedimientos) en la cuantificación de niveles de ambas micotoxinas para su análisis por ELISA.

3.5. Análisis estadístico

Los resultados de los estudios de las pruebas de ELISA para determinar las concentraciones preliminares de ambas micotoxinas fueron analizados con el software PAST 3.X (Øyvind Hammer, Natural History Museum, University of Oslo), mediante pruebas de Kruskal-Wallis y Mann-Whitney para comparar los resultados de aflatoxinas y fumonisinas totales en los diferentes municipios.

Los datos obtenidos del estudio preliminar de efectividad de la arcilla fueron evaluados mediante la prueba de T, utilizando el software mencionado anteriormente.

4.- RESULTADOS

4.1. Resultados de los cuestionarios aplicados de consumo de maíz

El cuestionario de consumo de productos de maíz fue revisado por tres nutriólogos y fue sometido a la prueba de alfa de Cronbach para su validación como instrumento en el aspecto de consistencia de las preguntas. Se realizó también una prueba piloto en la que 10 cuestionarios fueron respondidos antes de la aplicación final para revisar la redacción y claridad de las preguntas. No se tuvieron que hacer ajustes al instrumento después de la prueba piloto. En la prueba de consistencia del cuestionario, la cual está relacionada con la fiabilidad del instrumento, se registró un valor de alfa de 0.85. Si el valor de alfa (α) es igual o superior a 0.8, el diseño del instrumento en cuanto a consistencia es aceptable, La ecuación de la prueba de alfa de Cronbach y su resolución para este estudio fue la siguiente:

$$\alpha = \frac{K}{K-1} \left[1 - \frac{\sum Vi}{\sum Vt} \right]$$
$$\alpha = \frac{62}{62-1} \left[1 - \frac{8.18340271}{51.10784314} \right]$$
$$\alpha = \frac{62}{61} [1 - 0.16012029]$$
$$\alpha = (1.01639344)(0.8398797)$$
$$\alpha = \underline{0.85364822}$$

Dónde:

α = valor de Alfa de Cronbach

K= número de encuestas aplicadas

$\sum Vi$ =varianza del número de encuestas

$\sum Vt$ = varianza total

Los resultados de las encuestas de consumo de productos de maíz evidenciaron que los productos de mayor consumo por la población fueron la tortilla y la tostada. En cuanto al conocimiento acerca del proceso de nixtamalización, los datos muestran que poca gente conoce el método ancestral y el procedimiento específico varía de molino a molino. Las preguntas con sus respuestas más frecuentes se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Respuestas más frecuentes del cuestionario de consumo de productos de maíz.

Pregunta	Respuesta más frecuente
¿Con qué frecuencia consume en el desayuno cereal de maíz?	1 vez por semana
¿Con qué frecuencia consume elotes (vaso o entero)?	1 vez al mes
¿Con qué frecuencia consume frituras de maíz?	1 vez al mes
¿Qué tan frecuentemente consume tortillas?	2-3 veces al día
¿Cuántas tortillas consume en cada comida?	2-5 tortillas
¿Qué tan frecuentemente consumes productos de maíz preparado en molino?	1 vez al mes
¿Preparas tu propio maíz y lo traes al molino o lo compras?	Lo compra preparado en molino
¿Conoce la historia del proceso de nixtamalización?	No
¿Consumes maicena u otro atole que lleve maíz?	Si
¿Con qué frecuencia por semana?	1 vez por semana
¿Consumes usted algún otro producto elaborado con maíz? ¿Cuál? (otras opciones: gorditas, palomitas, sopes, tamales)	Si, tostadas
¿Con qué frecuencia?	1 vez por semana

Cuestionario revisado y avalado por profesionistas en nutrición. Prueba de alfa de Cronbach fue usada para validar el instrumento (alfa=0.85).

4.2. Resultados de cuantificación de micotoxinas por ELISA

Los resultados de las pruebas de ELISA realizadas para la detección de micotoxinas demostraron la presencia de aflatoxinas y fumonisinas en la mayoría de las muestras. Del total de 62 muestras, 52 muestras resultaron con cantidades detectables de aflatoxinas y 50 muestras con niveles detectables de fumonisinas. Del total, solo 5 muestras excedieron los límites para aflatoxinas establecidos en la NOM-188-SSA1-2002 (12 µg/kg) y para fumonisina 8 muestras excedieron los límites establecidos por la FAO (4 mg/kg). El municipio con la mayor cantidad de muestras positivas para el caso de aflatoxinas fue Guadalupe, para fumonisinas fue General Escobedo. En la Tabla 2 se presentan los resultados (medianas y otros valores estadísticos descriptivos) de concentraciones de aflatoxinas distribuidos por municipio.

Tabla 2. Estadística descriptiva de aflatoxinas totales por municipio.

Ciudad	Medianas	Rangos		n
		Inferior	Superior	
Apodaca	2.3 ^a	0.0	16.9	10
Gral. Escobedo	0.0 ^b	0.0	6.3	10
Guadalupe	2.8 ^a	2.2	22.6	10
Monterrey	2.4 ^a	0.0	9.8	10
San Nicolás	2.7 ^a	0.0	16.1	10
San Pedro	9.9 ^{ab}	0.5	19.2	02
Santa Catarina	3.9 ^a	1.1	6.6	10

Medianas con distintos superíndices denotan diferencias significativas ($P < 0.05$) usando pruebas de Kruskal-Wallis y Mann-Whitney.

Para el caso de fumonisinas totales, en la Tabla 3 se exponen los valores estadísticos, indicando las diferencias detectadas con los modelos estadísticos utilizados. Los valores de cada muestra analizada para ambas micotoxinas (aflatoxinas y fumonisinas totales) se presentan en el Anexo 8.3.

Tabla 3. Estadística descriptiva de fumonisinas totales por municipio.

Ciudad	Mediana	Rangos		n
		Inferior	Superior	
Apodaca	2.5 ^a	0.0	10.1	10
Gral. Escobedo	1.3 ^b	0.1	16.7	10
Guadalupe	0.3 ^b	0.0	1.5	10
Monterrey	0.7 ^{bc}	0.0	4.2	10
San Nicolás	0.3 ^{bc}	0.0	3.0	10
San Pedro	0.0 ^c	0.0	0.0	02
Santa Catarina	0.1 ^c	0.0	3.3	10

Medianas con distintos superíndices denotan diferencias significativas ($P < 0.05$) usando pruebas de Kruskal-Wallis y Mann-Whitney.

Los valores de cada muestra analizada para ambas micotoxinas (aflatoxinas y fumonisinas totales) se presentan en el Anexo 8.3.

4.3. Resultados de la medición de pH

La medición del pH de las muestras fue relevante ya que la alcalinidad residual del proceso de nixtamalización puede afectar los resultados de cuantificación por ELISA. En este sentido los niveles de pH determinados oscilaron en un rango de 5.34 a 7.55; con esto se demostró que las muestras se encontraban ligeramente ácidas o neutras al momento de realizar las extracciones para la determinación por ELISA. Estas condiciones de pH no afectan la cuantificación de aflatoxinas ni fumonisinas por el método de ELISA.

4.4. Resultados de cuantificación de micotoxinas por HPLC

Las muestras que excedieron los niveles permisibles de aflatoxinas y fumonisinas mediante ELISA fueron también analizadas con HPLC para verificar la presencia de AFB₁ y FB₁, los congéneres de aflatoxinas y fumonisinas más importantes y tóxicos. En este sentido, los resultados de la cuantificación por HPLC se presentan en la Tabla 4. Ninguna de las muestras que por ELISA mostraban niveles elevados de aflatoxinas y fumonisinas registró niveles que excedieran los límites permisibles de la NOM-188-SSA1-2002 al ser analizadas por HPLC. EL valor más alto de AFB₁ (6.1 ppb) fue registrado para una muestra del municipio de Guadalupe. Mientras que para fumonisina, las muestras con niveles más altos de esta micotoxina (1.2 ppm) resultaron provenientes del municipio de Apodaca y Monterrey.

Tabla 4. Concentraciones de aflatoxina B₁ y fumonisina B₁ de muestras que excedieron los niveles permisibles mediante ELISA.

Toxina	Muestra No.	Concentración de micotoxinas totales (ELISA)	Concentración de AFB₁/FB₁ (HPLC)
Aflatoxina (µg/kg)	16	16.9	No detectado
	22	16.1	1.9
	23	18.5	5.5
	39	22.6	6.1
	50	19.1	1.7
Fumonisin (mg/kg)	08	10.1	1.2
	16	4.3	0.8
	19	4.2	1.2
	54	4.7	1.0
	56	13.5	0.9
	57	16.6	0.9
	59	9.7	0.7
	61	8.5	1.0

El método utilizado fue por cromatografía líquida de alta resolución HPLC con detector de fluorescencia.

4.5. Resultados de la inclusión de la arcilla en la masa de nixtamal

Se realizó un estudio preliminar para determinar si la inclusión de arcilla esmectita en las masas pulverizadas era efectiva en la reducción de aflatoxinas y fumonisinas. Para esto, se seleccionaron las masas que habían resultado con niveles que excedían los límites permisibles de ambas micotoxinas de acuerdo a la NOM-188-SSA1-2002 y la FDA. Las micotoxinas fueron cuantificadas mediante ELISA. Los resultados mostraron que la inclusión de arcilla al 2% fue capaz de reducir hasta en un 91% los niveles de aflatoxinas y de hasta 82% de fumonisinas (Tablas 5 y 6).

Tabla 5. Eficacia de la arcilla esmectita en la reducción de aflatoxinas en masa.

No. de muestra	Masa (AF totales µg/kg)	Masa + arcilla (AF totales µg/kg)	Porcentaje de reducción (%)
16	16.9	1.4*	91
22	16.1	2.9*	82
23	18.4	1.8*	90
39	22.6	5.6*	75
50	19.1	3.8*	80

*Resultados significativamente diferentes al primer análisis de acuerdo a la prueba de T ($P<0.05$).

Sin embargo, en el caso de las fumonisinas, en tres de las muestras adicionadas con arcilla se registró un incremento en el nivel de fumonisinas, con respecto al nivel de estas toxinas en las muestras sin adición de arcilla esmectita (Tabla 6).

Tabla 6. Eficacia de la arcilla esmectita en la reducción de fumonisinas en masa.

No. de muestra	Masa (FB totales mg/kg)	Masa + arcilla (FB totales mg/kg)	Porcentaje de reducción (%)
8	10.1	1.7	83
16	4.3	8.1*	NA
19	4.2	1.3	69
54	4.7	6.0*	NA
56	13.5	3	78
57	16.6	15.7	5
59	9.7	23.4*	NA
61	8.5	6.9	19

NA: No aplica (La concentración de fumonisinas fue superior comparado al primer análisis).

* Valores superiores comparados con el primer análisis. Resultados no fueron significativamente diferentes al primer análisis de acuerdo a prueba de T ($P>0.05$).

5.- DISCUSIÓN

La contaminación de alimentos basados en maíz ha sido reportada previamente en México por algunos autores como Valdivia-Flores y colaboradores (1999), quienes ya han evidenciado la presencia de aflatoxinas en maíz para consumo humano en nuestro país. Torreblanca y colaboradores (1987) realizaron estudios pioneros en molinos del área de la Ciudad de México colectando muestras de maíz y tortillas de estos establecimientos. En sus resultados se reportó la presencia de aflatoxinas en un 72% de los molinos muestreados, con 64% de las muestras rebasando los límites permitidos por las legislaciones mexicanas en aquella época ($> 20 \mu\text{g}/\text{kg}$). En el presente estudio, el 82% de un total de 62 molinos muestreados demostraron niveles detectables de aflatoxinas, aunque sólo el 8% de las muestras superaron el límite permitido actual ($12 \mu\text{g}/\text{kg}$) por las legislaciones mexicanas.

En nuestro estudio, el rango de niveles aflatoxinas totales obtenidos mediante pruebas de ELISA fue de 0 a $22.6 \mu\text{g}/\text{kg}$. Otros estudios, como el realizado en Tamaulipas en el año de 1989 en el que se analizaron muestras de maíz recién cosechado, han documentado niveles de contaminación de entre 68 y $102 \mu\text{g}/\text{kg}$ de aflatoxinas. Así mismo, investigaciones en maíz blanco y amarillo recién cosechado en siete municipios del norte del estado de Tamaulipas, encontraron niveles de contaminación que variaban de $34 \mu\text{g}/\text{kg}$ a $125 \text{mg}/\text{kg}$ (Guzmán de Peña, 1989). Ninguno de nuestros resultados fue similar a los de estos estudios realizados en maíz recién cosechado. Sin embargo, nuestros datos

sí son similares a los niveles bajos de AFB₁ que han sido reportados históricamente por Guzmán de Peña (1977). Este autor analizó muestras de alimentos basados en maíz de diversos estados de la República y reportó concentraciones de AFB₁ que variaron entre 0.32 y 465.31 µg/kg (Guzmán de Peña, 1997). En este sentido, los niveles menores a los límites permisibles para AFB₁ y aflatoxinas totales (< 20 µg/kg) pueden no representar un problema significativo de salud pública. Sin embargo, aún los niveles bajos pueden potencialmente representar un riesgo para poblaciones vulnerables como lo son los infantes, mujeres embarazadas y personas con deficiencias para el metabolismo de las aflatoxinas. Así mismo, aunque las cantidades de estas toxinas parecen ser bajas en estos alimentos, el alto consumo de ellos y otros alimentos que contienen aflatoxinas puede incrementar las dosis a las que la población se expone.

Para el caso de fumonisinas, existen reportes del año 1999 por Robledo-Marengo y colaboradores (2012) en el estado de Nayarit en donde se realizaron estudios con maíz forrajero para consumo humano y animal que era producido en 20 municipios. En ese estudio se encontraron niveles detectables de FB₁ en el 100% de las muestras con concentraciones promedio de 2.54 ± 2.2 mg/kg, estos niveles son mucho más altos que los encontrados en nuestro estudio donde los niveles de FB₁ variaron entre 700 y 1200 µg/kg de masa. También se ha reportado la presencia de fumonisinas en algunas especies de maíz híbrido en México por Reyes-Velazquez y colaboradores (2011) en donde se analizaron en total 28 muestras de siete híbridos de maíz fresco, y se reportaron concentraciones de FB₁

de entre 13.8 - 4,860 $\mu\text{g/g}$, lo cual puede representar riesgos considerables a la salud pública ya que exceden los límites de 4 ppm ó 4 $\mu\text{g/g}$.

En otros países en desarrollo se ha investigado la co-ocurrencia de ambas micotoxinas, AF y FB, en alimentos. Por ejemplo Kimanya y colaboradores en 2014 en Tanzania, analizaron muestras de harina de maíz mediante HPLC, y mostraron que las AF totales variaron entre 0.11 - 386 ppb (media de 0.91 ppb), mientras que la AFB₁ estuvo en un rango de concentración de 0.53 - 364 ppb (media de 1.27 ppb). Para FB totales se obtuvieron rangos de 0.06 - 2.28 ppm y un promedio de 0.36 ppm mientras que para FB₁ se reportó un rango entre 0.05 - 1.67 ppm y un promedio de 0.32 ppm. Estos resultados son parcialmente similares a los revelados en nuestro estudio donde se obtuvieron rangos de 0.3 ppb a 22 ppb para AF totales y de 1.7 - 6.1 ppb para AFB₁, mientras que para FB totales se registraron rangos de 0.1 - 17 ppm y de 0.7 - 1.2 ppm para FB₁. En resumen, los niveles bajos de ambas micotoxinas en ambos estudios fueron muy similares. Sin embargo, los niveles altos de las micotoxinas fueron diferentes en ambos estudios.

Una pregunta difícil de contestar es que tan relevante es la exposición a estos niveles de micotoxinas y si esto es de importancia en salud pública. En este sentido, con los datos obtenidos en el presente estudio y considerando que el consumo de masa nixtamalizada se usa principalmente para la elaboración de tamales, se pudiera realizar un cálculo de los niveles a los que se expondría un individuo si consumiera una ración de masa de 500 g, lo equivalente a una ración de 4 o 5 tamales. De esta manera, usando el nivel máximo de consumo por

kilogramo de peso (PMTDI) para un adulto promedio de 70 kg establecido por la WHO (1 ng de AF/kg de peso corporal), se pueden cotejar con los niveles a los que un individuo se expone en México en algunas situaciones, tal como se presentan en la Tabla 7. De esta manera, usando el PMTDI para AF, el máximo nivel tolerable para un adulto de 70 kg sería 70 ng por día. Suponiendo que esta persona consume 500 g de la masa más contaminada (22.6 µg/kg), esta persona estaría consumiendo $(22.6 \times 0.5)/70 = 0.16$ µg de AF por kg de peso corporal, es decir 161 ng por kg de peso corporal, cuando lo tolerable para ella es de 70 ng.

Tabla 7.-Cantidades de AF y FB posibles en una ración de 500 g de masa.

Método	Toxina	Rango detectado		Cantidad posible en una comida	
		Min	Máx	Min	Máx
ELISA	AF totales (µg/kg)	0.3	22.6	0.15 µg	11.3 µg
	FB totales (mg/kg)	0.1	16.7	0.05 mg	8.35 mg
HPLC	AFB ₁ (µg/kg)	1.7	6.1	0.85	3.05 µg
	FB ₁ (mg/kg)	0.7	1.2	0.35	0.6 mg

Los rangos mínimos presentados son las cantidades mínimas detectadas que son diferentes a cero.

Para FB, el máximo nivel provisional establecido de exposición diaria es de 2 µg/kg de peso corporal. Entonces para una persona de 70 kg el nivel máximo tolerable diario sería de 140 µg totales. En nuestro estudio, en el escenario del consumo de la masa más contaminada (16.7 mg/kg) con esta toxina esta persona estaría consumiendo 8.35 mg diarios, lo equivalente a 119 µg por kilogramo de peso por día, claramente sin exceder el límite máximo provisional. En nuestro estudio, el rango de peso de los encuestados fue de 44-105 kg; dependiendo de su nivel de consumo de alimento, algunas de ellas pueden estar ingiriendo mayor cantidad de micotoxinas por kg de peso corporal de lo que indica la WHO como PMTDI.

De acuerdo a la WHO, la exposición a ambas micotoxinas, AF y FB, debe tratar de eliminarse o mantenerse al mínimo. Estrategias capaces de reducir ambos niveles de micotoxinas en los alimentos son altamente deseables. En este sentido y de acuerdo con varios autores (Dixon *et al.*, 2008; Mitchell *et al.*, 2013; Phillips *et al.*, 2008) la inclusión de arcillas basadas en esmectitas es una alternativa para reducir los niveles de algunas micotoxinas. De manera particular es interesante comparar los resultados del presente trabajo con los de Jaynes y colaboradores (2007), quienes emplearon NovaSil® (2-2.5%) en soluciones de harina de maíz altamente contaminada y agua; la arcilla fue capaz de reducir considerablemente estos niveles de contaminación. En el presente trabajo, cinco muestras que excedían los niveles máximos permitidos en México para AF (12 ppb) y ocho muestras que excedían los niveles de FB (4 ppm) permitidos por la FAO, fueron adicionados con arcilla NovaSil al 2% y la eficacia de esta adición fue

evaluada mediante ELISA. Para el caso de AF se observó una reducción de AF en todas las muestras contaminadas (n=5), teniendo un rango de reducción desde un 75 a un 91.3%. En el caso de FB se observó un rango de reducción que varió entre el 5.3 al 82.4% en solo cinco de las muestras contaminadas con FB. En las 3 muestras restantes contaminadas con FB se observó un aumento en la cantidad de FB detectada. Este aumento fue de 27.5 hasta 140.9% comparado con los niveles detectados en la masa sin arcilla. Jaynes y colaboradores (2007) muestran resultados similares a los nuestros con respecto a la eficacia de la arcilla en cuanto a la reducción de AF en harina de maíz, y sugieren que posiblemente el metanol que se usa para la extracción de las micotoxinas interactúe con la arcilla y esta no pueda adsorber la AF en un 100%. En cuanto a nuestras observaciones con FB, estudios *in vitro* realizados por Brown y colaboradores (2012) han demostrado que la arcilla NovaSil es capaz de adsorber FB aunque en un grado menor que para AF. Esto también ha sido demostrado en estudios *in vivo* reportados por Robinson y colaboradores (2012) en donde los participantes de Ghana consumieron cápsulas de arcilla NovaSil por un período de tres meses y los niveles de FB en orina fueron reducidos de manera significativa debido al tratamiento con la arcilla. Sin embargo, más estudios son requeridos para conocer a detalle el mecanismo específico de la arcilla sobre la FB y poder explicar las posibles causas de los resultados observados en nuestro estudio.

6.- CONCLUSIONES

1. Aflatoxinas y fumonisinas están presentes a niveles detectables en muestras de masa nixtamalizada de molinos del área metropolitana de Monterrey.
2. Usando métodos de ELISA, 5 de las 62 muestras analizadas excedieron los límites permitidos para AF en México, y 8 de las 62 muestras analizadas excedieron los límites de FB permitidos por la FAO internacionalmente. Usando HPLC, ninguna de las muestras excedió los límites permisibles recomendados en México o establecidos por la FAO para AFB₁ y FB₁, respectivamente. Sin embargo, considerando los PMTDIs establecidos por la WHO, algunas muestras pueden aun presentar un riesgo para poblaciones vulnerables.
3. En los estudios de eficacia *in vitro*, la arcilla esmectita fue capaz de reducir significativamente ($P < 0.05$) los niveles de AF en la masa nixtamalizada. Para FB, los resultados muestran un patrón que sugieren que la arcilla puede ser efectiva para reducir FB en masa nixtamalizada. Sin embargo los resultados no fueron significativos en el caso de esta micotoxina ($P > 0.05$) y más estudios son requeridos para explicar este fenómeno.

7.- LITERATURA CITADA

- Afriyie Gyawu, E., Ankrah, N., Hueber, H., Ofosuhene, M., Kumi, J., Johnson, N., Phillips, T. (2008 a). NovaSil clay intervention in Ghanaians at high risk for aflatoxicosis: I Study desing and clinical outcomes. *Food Additional Contamination*, 76-87.
- Afriyie Gyawu, E., Wang, Z., Ankrah, N.-A., Xu, L., Johnson, N., Tang, L., Phillips, T. (2008 b). NovaSil clay dpes nos affect the concentrations of vitamins A and E and nutrien minerals in serum samples from Ghanaians at high risk for aflatoxicosis. *Food Addition Contamination: Part A*, 872-884.
- Arrúa-Alvarenga, A.A., Quezada-Viay, M.Y., Vázquez-Badillo, M.E., & Flores-Olivas, A. (2012). Incidencia de hongos potencialmente toxigénicos en maiz (*Zea mays* L.) de diferentes orígenes geográficos en México. *Fitosanidad*, 16;49-50.
- Bezerra da Rocha, M.E., Oliveira-Freire, F.d.C., Feitosa-Maia, F.E., Florindo-Guedes, M. I., & Rondina, D. (2014). Mycotoxins and their effects on human and animal health. *Food Control*, 36(1), 159-165. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.08.021>
- Bennett, J.W. y Richard, J.L. 1994. Liquid Chromatographic Method for Analysis of the Naphthalene Dicarboxialdehyde Derivative of Fumonisin. *J. AOAC Int.*, 77, 2, 501-505
- Bondy, G., Mehta, R., Caldwell, D., Coady, L., Armstrong, C., Savard, M., Riley, R. T. (2012). Effects of long term exposure to the mycotoxin fumonisin B1 in p53 heterozygous and p53 homozygous transgenic mice. *Food and Chemical Toxicology*, 50(10), 3604-3613. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2012.07.024>
- Cabello, E., & Chirinos, J.L. (2012). Validación y aplicabilidad de encuestas SERVQUAL modificadas para medir la satisfacción de usuarios externos en servicios de salud. *Revista Medica Herediana*, 23, 88-95.
- Cano-Sancho, G., Sanchis, V., Marín, S., & Ramos, A.J. (2013). Occurrence and exposure assessment of aflatoxins in Catalonia (Spain). *Food and Chemical Toxicology*, 51(0), 188-193. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2012.09.032>
- Carvajal, M., & Arroyo, G. (1997). Managment of Aflatoxin contaminated maize in Tamaulipas, Mexico. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45 (44) 1301-1305.
- Carvajal, M., Rosiles, R., Abbas, H.K., & Moricha, C.J. (1987). Mycotoxin carryover from grain to tortillas *Aflatoxin in maize, proceedings of the workshop* (pp. 318-319). México, D.F.: CIMMYT.
- CAST. (2003). Mycotoxins: Risks in plant, animal and human systems *Task force report*. Ames, Iowa: Council of Agriculture, Science and Technology
- Castillo-Urueta, P., Carvajal, M., Mendez, I., Meza, F., & Galvez, A. (2011). Survey of aflatoxins in maize tortillas from Mexico City. *Food Addit Contam Part B Surveill*, 4(1), 42-51. doi: 10.1080/19393210.2010.533390

- Cerf, O., & Donnat, E. (2011). Application of hazard analysis – Critical control point (HACCP) principles to primary production: What is feasible and desirable? *Food Control*, 22(12), 1839-1843.
doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.04.023>
- Daković, A., Kragović, M., Rottinghaus, G.E., Sekulić, Ž., Milićević, S., Milonjić, S. K., & Zarić, S. (2010). Influence of natural zeolitic tuff and organozeolites surface charge on sorption of ionizable fumonisin B1. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 76(1), 272-278.
doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.11.003>
- Daković, A., Matijašević, S., Rottinghaus, G.E., Ledoux, D.R., Butkeraitis, P., & Sekulić, Ž. (2008). Aflatoxin B1 adsorption by natural and copper modified montmorillonite. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 66(1), 20-25. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2008.05.008>
- Degola, F., Dall'Asta, C., & Restivo, F.M. (2012). Development of a simple and high-throughput method for detecting aflatoxins production in culture media. *Lett Appl Microbiol*, 55(1), 82-89. doi: 10.1111/j.1472-765X.2012.03264.x
- Deng, Y., Barrientos-Velázquez, A.L., Billes, F., & Dixon, J.B. (2010). Bounding mechanisms between aflatoxin B1 and smectite. *Applied Clay Science*, 92-98.
- Deng, Y., & Dixon, J.B. (2002). *Soil Mineralogy with Environmental Applications*. New York: Dixon, J.B., Schulze, D.G. Ed.
- Deng, Y., & Szczerba, M. (2011). Computational evaluation of bonding between aflatoxin B1 and smectite. *Applied Clay Science*, 54(1), 26-33. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clay.2011.07.007>
- Deng, Y., Barrientos-Velázquez, A.L., Billes, F., & Dixon, J.B. (2010). Bonding mechanisms between aflatoxin B1 and smectite. *Applied Clay Science*, 50(1), 92-98. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clay.2010.07.008>
- Desheng, Q., Fan, L., Yanhu, Y., Niya, Z. (2005). Adsorption of aflatoxin B1 on montmorillonite. *Poultry Science* 84, 959-961.
- Dixon, J.B., Kannewischer, I., Tenorio -Arvide, M.G., & Barrientos-Velazquez, A.L. (2008). Aflatoxin sequestration in animal feeds by quality-labeled smectite clays: An introductory plan. *Applied Clay Science*, 40(1-4), 201-208. doi: 10.1016/j.clay.2007.10.010
- Domijan, A.M. (2012). Fumonisin B(1): a neurotoxic mycotoxin. *Arh Hig Rada Toksikol*, 63(4), 531-544. doi: 10.2478/10004-1254-63-2012-2239
- Eaton, D.L., Beima, K.M., Bammler, T.K., Riley, R.T., & Voss, K.A. (2010). 9.24 - Hepatotoxic Mycotoxins. In C. A. McQueen (Ed.), *Comprehensive Toxicology (Second Edition)* (pp. 527-569). Oxford: Elsevier.
- EFSA. (2007). Opinion of the Scientific Panel on contaminants in the food related to the potential increase of consumer health risk by a possible increase of the existing maximum levels for aflatoxins in almonds, hazelnuts and pistachos and derived products. *EFSA J.*, 446. 441-127.
- Elias-Orozco, R., Castellanos-Nava, A., Gaytan-Martinez, M., Figueroa-Cardenas, J.D., & Loarca-Pina, G. (2002). Comparison of nixtamalization and extrusion processes for a reduction in aflatoxin content. *Food Addit Contam*, 19(9), 878-885. doi: 10.1080/02652030210145054

- Ellis, W.O., Smith, J.P., Simpson, B.K., & Oldham, J.H. (1991). Aflatoxins in food: occurrence, biosynthesis, effects on organisms, detection, and methods of control. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 30(4), 403-439. doi: 10.1080/10408399109527551
- FAO. (2011). www.fao.org Worldwide regulations for micotoxins in food and in feed in 2003, FAO. *Food and Nutrition Paper*, 81.
- FDA (Producer). (2001). US Food and Drug Administration. (2001) Guidance for Industry: Fumonisin Levels. FDA. Retrieved from <http://www.fda.gov/food/guidanceregulation/guidancedocumentsregulatoryinformation/chemicalcontaminantsmetalsnaturaltoxinspesticides/ucm109231.htm>
- Fountain, J.C., Scully, B.T., Ni, X., Kemerait, R.C., Lee, R.D., Chen, Z.Y., & Guo, B. (2014). Environmental influences on maize- interactions and aflatoxin production. *Front Microbiol*, 5, 40. doi: 10.3389/fmicb.2014.00040
- Frisvad, J.C., Smedsgaard, J., Samson, R.A., Larsen, T.O., Thrane, U. (2007). Fumonisin B2 production by *Aspergillus niger*. *J. Agric. Food Chem*, 55: 9727-9732.
- García-Cela, E., Ramos, A.J., Sanchis, V., Marin, S. (2012). Emerging risk management metrics in food safety: FOS, PO. How do they apply to the mycotoxin hazard. *Food Control*, 25(22), 797-808.
- Gelderblom, W.C., & Marasas, W.F. (2012). Controversies in fumonisin mycotoxicology and risk assessment. *Hum Exp Toxicol*, 31(3), 215-235. doi: 10.1177/0960327110395338
- Gelderblom, W.C., Marasas, W.F., Lebepe-Mazur, S., Swanevelder, S., & Abel, S. (2008). Cancer initiating properties of fumonisin B1 in a short-term rat liver carcinogenesis assay. *Toxicology*, 250(2-3), 89-95. doi: 10.1016/j.tox.2008.06.004
- Giray, B., Girgin, G., Engin, A.B., Aydın, S., Sahin, G. (2007). Aflatoxin levels in wheat samples consumed in some regions of Turkey. *Food Control*, 23-29.
- Goossens, J., Vandenbroucke, V., Pasmans, F., De Baere, S., Devreese, M., Osselaere, A., Croubels, S. (2012). Influence of Mycotoxins and a Mycotoxin Adsorbing Agent on the Oral Bioavailability of Commonly Used Antibiotics in Pigs. *Toxins*, 4(4), 281-295. doi: 10.3390/toxins4040281
- Grenier, B., Bracarense, A.P., Schwartz, H.E., Trumel, C., Cossalter, A.M., Schatzmayr, G., Kolf-Clauw, M., Moll, W.D., Oswald, I.P. (2012). The low intestinal and hepatic toxicity of hydrolyzed fumonisin B1 correlates with its inability to alter the metabolism of sphingolipids. *Biochemical Pharmacology*, 83(10), 1465-1473. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2012.02.007>
- Groopman, J.D., Johnson, D., & Kensler, T.W. (2005). Aflatoxin and hepatitis B virus biomarkers: a paradigm for complex environmental exposures and cancer risk. *Cancer Biomark*, 1(1), 5-14.
- Gross-Steinmeyer, K., & Eaton, D.L. (2012). Dietary modulation of the biotransformation and genotoxicity of aflatoxin B(1). *Toxicology*, 299(2-3), 69-79. doi: 10.1016/j.tox.2012.05.016

- Guarisco, J.A., Hall, J.O., & Coulombe Jr, R.A. (2008). Butylated hydroxytoluene chemoprevention of aflatoxicosis – Effects on aflatoxin B1 bioavailability, hepatic DNA adduct formation, and biliary excretion. *Food and Chemical Toxicology*, 46(12), 3727-3731. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2008.09.050>
- Guarisco, J.A., Hall, J.O., & Coulombe Jr, R.A. (2008). Mechanisms of butylated hydroxytoluene chemoprevention of aflatoxicosis—inhibition of aflatoxin B1 metabolism. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 227(3), 339-346. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2007.11.017>
- Guzmán de Peña, D., Trudel, L., & Wogan, G.N. (1995). Corn "nixtamalización" and the fate of radiolabelled aflatoxin B1 in the tortilla making process. *Bull Environ Contam Toxicol*, 55(6), 858-864.
- Guzmán de Peña, D. (1989). *La aflatoxinas en maíz: un reto a los mexicanos*. Paper presented at the En Memorias de la IV Mesa Redonda Latinoamericana sobre la prevención de pérdidas postcosecha de granos., Texcoco, México.
- Guzmán de Peña, D. (1997). Perspectivas de la microbiología en México. *Estudio de las aflatoxinas en México*, 181-199.
- Heinl, S., Hartinger, D., Thamhesl, M., Vekiru, E., Krska, R., Schatzmayr, G., Grabherr, R. (2010). Degradation of fumonisin B1 by the consecutive action of two bacterial enzymes. *J Biotechnol*, 145(2), 120-129. doi: 10.1016/j.jbiotec.2009.11.004
- IARC. (2012). *A review of human carcinogens* (Vol. 100F). Lyon, France: IARC.
- Jaynes, W.F., Zartman, R.E., & Hudnall, W.H. (2007). Aflatoxin B1 adsorption by clays from water and corn meal. *Applied Clay Science*, 36(1–3), 197-205. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clay.2006.06.012>
- Karuna, R., & Rao, B.S. (2013). Lack of micronuclei induction by fumonisin B(1) mycotoxin in BALB/c mice. *Mycotoxin Res*, 29(1), 9-15. doi: 10.1007/s12550-012-0149-4
- Kimanya, M.E., Shirima, C.P., Magoha, H., Shewiyo, D.H., De Meulenaer, B., Kolsteren, P., & Gong, Y.Y. (2014). Co-exposures of aflatoxins with deoxynivalenol and fumonisins from maize based complementary foods in Rombo, Northern Tanzania. *Food Control*, 41(0), 76-81. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.12.034>
- Klich-Maren, A. (2007). *Aspergillus flavus*: the major producer of aflatoxins. *Molecular Plant Pathology*, 8: 713-722.
- Kuiper-Goodman, T. (1995). Mycotoxins: risk assessment and legislation. *Toxicol Lett*, 82-83, 853-859.
- Lazzaro, I., Falavigna, C., Dall'Asta, C., Proctor, R.H., Galaverna, G., & Battilani, P. (2012). Fumonisin B, A and C profile and masking in *Fusarium verticillioides* strains on fumonisin-inducing and maize-based media. *International Journal of Food Microbiology*, 159(2), 93-100. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.08.013>
- Liu, Y., Wu, F. (2010). Global burden of aflatoxin-induced hepatocellular carcinoma: a risk assessment. *Environmental Health Perspectives*, 118(116), 818-824.

- Lombard, M., Steyn, N., Burger, H.M., Charlton, K., & Gelderblom, W. (2014). A proposed method to determine fumonisin exposure from maize consumption in a rural South African population using a culturally appropriate FFQ. *Public Health Nutr*, 17(1), 131-138. doi: 10.1017/s1368980012004946
- Marasas W., Riley. R.T., Hendricks, K.A., Stevens, V.L., Sadler, T.W., Genileauvan Waes, J., Missmer, S.A., Cabrera, J.P., Torres, O., Gelderblom, W.C., Allegood, J., Martínez, C., Maddox, J., Miller, J.D., Starr, L., Sullards, M.C., Roman, A.V., Voss, K.A., Wang, E., Merrill, A.H., Jr. (2004). Fumonisin Disrupt Sphingolipid Metabolism, Folate Transport, and Neural Tube Development in Embryo Culture and In Vivo: A Potential Risk Factor for Human Neural Tube Defects among Populations Consuming Fumonisin-Contaminated Maize. *The Journal of Nutrition*, 711-716.
- Marin, S., Ramos, A.J., Cano-Sancho, G., & Sanchis, V. (2013). Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food and Chemical Toxicology*, 60(0), 218-237. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2013.07.047>
- Marroquín Cardona, A., Deng, Y., Taylor, J., Hallmark, C., Johnson, N., & Phillips, T. (2009). In vitro and in vivo characterization of mycotoxin-binding additives used for animal feeds in Mexico. *Food Additives & Contaminants*, 733-743.
- Marroquín-Cardona, A., Deng, Y., Garcia-Mazcorro, J.F., Johnson, N.M., Mitchell, N.J., Tang, L., Phillips, T.D. (2011). Characterization and safety of uniform particle size NovaSil clay as a potential aflatoxin enterosorbent. *Applied Clay Science*, 54(3-4), 248-257. doi: 10.1016/j.clay.2011.09.009
- Mary, V.S., Theumer, M.G., Arias, S.L., & Rubinstein, H.R. (2012). Reactive oxygen species sources and biomolecular oxidative damage induced by aflatoxin B1 and fumonisin B1 in rat spleen mononuclear cells. *Toxicology*, 302(2-3), 299-307. doi: 10.1016/j.tox.2012.08.012
- Matsuda, Y., Wakai, T., Kubota, M., Osawa, M., Sanpei, A., & Fujimaki, S. (2013). Mycotoxins are conventional and novel risk biomarkers for hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*, 19(17), 2587-2590. doi: 10.3748/wjg.v19.i17.2587
- McKenzie, K.S., Kubena, L.F., Denvir, A.J., Rogers, T.D., Hitchens, G.D., Bailey, R.H., Phillips, T.D. (1998). Aflatoxicosis in turkey poults is prevented by treatment of naturally contaminated corn with ozone generated by electrolysis. *Poult Sci*, 77(8), 1094-1102.
- Mitchell, N.J., Xue, K.S., Lin, S., Marroquin-Cardona, A., Brown, K.A., Elmore, S.E., Phillips, T.D. (2013). Calcium montmorillonite clay reduces AFB and FB biomarkers in rats exposed to single and co-exposures of aflatoxin and fumonisin. *J Appl Toxicol*. doi: 10.1002/jat.2942
- Moudgil, V., Redhu, D., Dhanda, S., & Singh, J. (2013). A review of molecular mechanisms in the development of hepatocellular carcinoma by aflatoxin and hepatitis B and C viruses. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*, 32(2), 165-175.
- Murphy, P.A., Hendrich, S., Hopmans, E.C., Hauck, C.C., Lu, Z., Buseman, G., & Munkvold, G. (1996). Effect of processing on fumonisin content of corn. *Adv Exp Med Biol*, 392, 323-334.

- Nepusz, T., Petróczi, A., & Naughton, D. (2008). Worldwide food recall patterns over an eleven month period: A country perspective. *BMC Public Health* 7 - 308, 8(1), 1-9. doi: 10.1186/1471-2458-8-308
- Nicolas-Vazquez, I., Mendez-Albores, A., Moreno-Martinez, E., Miranda, R., & Castro, M. (2010). Role of lactone ring in structural, electronic, and reactivity properties of aflatoxin B1: a theoretical study. *Arch Environ Contam Toxicol*, 59(3), 393-406. doi: 10.1007/s00244-010-9501-x
- Persson, C.E., Sewram, V., Evans, A. A., Thomas-London, W., Volkwyn, Y., Shen, Y.-J., Abnet, C.C. (2012). Fumonisin B1 and risk of hepatocellular carcinoma in two Chinese cohorts. *Food and Chemical Toxicology*, 50(3-4), 679-683. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2011.11.029>
- Phillips, T.D., Afriyie-Gyawu, E., Williams, J., Huebner, H., Ankrah, N.A., Ofori-Adjei, D., Wang, J.S. (2008). Reducing human exposure to aflatoxin through the use of clay: a review. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 25(2), 134-145. doi: 10.1080/02652030701567467
- Phillips, T.D., Afriyie-Gyawu, E., Wang, J.S., Williams, J.O., Huebner, H. (2006). The potential of aflatoxins sequestering clay. *Mycotoxn Factbook: Food and Feed Topics*, 329-346.
- Phillips, T.D., Lemke, S.L., Grant, P.G. (2002). Characterization of clay-based entrosorbents for the prevention of aflatoxicosis. *Mycotoxins and Food Safety*, 157-171.
- Phillips, T.D., Sarr, B.A., & Grant, P.G. (1995). Selective Chemisorption and Detoxification of Aflatoxins by Phyllosilicate Clay. *Natural Toxins* 3, 204-213.
- Pizzolitto, R.P., Salvano, M.A., & Dalcero, A.M. (2012). Analysis of fumonisin B1 removal by microorganisms in co-occurrence with aflatoxin B1 and the nature of the binding process. *International Journal of Food Microbiology*, 156(3), 214-221. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.03.024>
- Rawal, S., Kim, J.E., & Coulombe Jr, R. (2010). Aflatoxin B1 in poultry: Toxicology, metabolism and prevention. *Research in Veterinary Science*, 89(3), 325-331. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2010.04.011>
- Reddy, K.R., Reddy, C.S., Muralidharan, K. (2009). Detection of Aspergillus spp. and afltoxin B1 in rice in India. *Food Microbiology*, 26: 27-31.
- Reyes-Velazquez, W.P., Figueroa-Gomez, R.M., Barberis, M., Reynoso, M.M., Rojo, F.G., Chulze, S.N., & Torres, A.M. (2011). Fusarium species (section Liseola) occurrence and natural incidence of beauvericin, fusaproliferin and fumonisins in maize hybrids harvested in Mexico. *Mycotoxin Res*, 27(3), 187-194. doi: 10.1007/s12550-011-0095-6
- Robledo-Marenco, M.L., Rojas-García, A.E., Medina-Díaz, I.M., Barrón-Vivanco, B.S., Romero-Bañuelos, C.A., Rodríguez-Cervantes, C.H., Girón-Pérez, M.I. (2012). Micotoxinas en Nayarit, México; Estudio de casos. *Revista Biociencias*, 2, 92-98.
- Robinson, A., Johnson, N.M., Strey, A., Taylor, J.F., Marroquin-Cardona, A., Mitchell, N.J., Afriyie-Gyawu E., Ankrah, N.A., Williams, J.H., Wang, J.S., Jolly, P.E., Nachman, R.J., Phillips, T.D. (2012). Calcium montmorillonite clay reduces urinary biomarkers of fumonisin B1 exposure in rats and humans. *Food Addit Contam Part A. Chem Anal Control Expo Risk Assess* 29(5), 809-818.

- Scott, P. M. (2012). Recent research on fumonisins: a review. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 29(2), 242-248. doi: 10.1080/19440049.2010.546000
- Siloto, E. V., Oliveira, E. F., Sartori, J. R., Fascina, V. B., Martins, B. A., Ledoux, D. R., Sartori, D. R. (2013). Lipid metabolism of commercial layers fed diets containing aflatoxin, fumonisin, and a binder. *Poult Sci*, 92(8), 2077-2083. doi: 10.3382/ps.2012-02777
- Smela, M. E., Currier, S. S., Bailey, E. A., & Essigmann, J. M. (2001). The chemistry and biology of aflatoxin B(1): from mutational spectrometry to carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 22(4), 535-545.
- Smith, E., Phillips, T., Ellis, J., Harvey, R., Kubena, L., Thompson, J., & G, N. (1994). Dietary Hydrated sodium calcium aluminosilicate reduction on aflatoxin M1 residue in diary goat milk and effects on milk production and components. *Journal of Animal Science*, 677-682.
- Sozmen, M., Devrim, A. K., Tunca, R., Bayezit, M., Dag, S., & Essiz, D. (2013). Protective effects of silymarin on fumonisin B1 induced hepatotoxicity in mice. *J Vet Sci*.
- Suarez-Bonnet, E., Carvajal, M., Mendez-Ramirez, I., Castillo-Urueta, P., Cortes-Eslava, J., Gomez-Arroyo, S., & Melero-Vara, J. M. (2013). Aflatoxin (b1, b2, g1, and g2) contamination in rice of Mexico and Spain, from local sources or imported. *J Food Sci*, 78(11), T1822-1829. doi: 10.1111/1750-3841.12291
- Torreblanca, A., Bourges, H., & Morales, J. (1987). Aflatoxin in maize and tortillas in Mexico *Aflatoxin in maize, A proceedings of the workshop* (pp. 310-317). México, D.F.: El Batán, CIMMYT.
- Valdivia-Flores, A., Quezada Tristán, T., Ortíz Martínez, R., & Martínez De Anda, A. (1999). Implicaciones de la Contaminación de Alimentos por Aflatoxinas. *Investigación y Ciencia*, 2-10.
- Vekiru, E., Fruhauf, S., Sahin, M., Ottner, F., Schatzmayr, G., & Krska, R. (2007). Investigation of various adsorbents for their ability to bind aflatoxin B1. *Mycotoxin Res*, 23(1), 27-33. doi: 10.1007/bf02946021
- Viquez, O., Catell-Pérez, M., Shellby, R., & Brown, G. (1994). Aflatoxin Contamination in Corn Samples Due to Environmental Conditions, Aflatoxin Producing Strains and Nutrients in Grain Grown in Costa Rica. *J Agric Food Chem*, 42: 2551-2555.
- Voss, K.A., G. W. S., W.M. Haschek. (2007). Fumonisins: Toxicokinetics, mechanism of action and toxicity. *Animal Feed Science and Technology*, 299-325.
- Voss, K. A., Riley, R. T., Snook, M. E., & Waes, J. G. (2009). Reproductive and sphingolipid metabolic effects of fumonisin B(1) and its alkaline hydrolysis product in LM/Bc mice: hydrolyzed fumonisin B(1) did not cause neural tube defects. *Toxicol Sci*, 112(2), 459-467. doi: 10.1093/toxsci/kfp215
- Wang, J. S., Shen, X., He, X., Zhu, Y. R., Zhang, B. C., Wang, J. B., Kensler, T. W. (1999). Protective alterations in phase 1 and 2 metabolism of aflatoxin B1 by oltipraz in residents of Qidong, People's Republic of China. *J Natl Cancer Inst*, 91(4), 347-354.

- Wang, P., Afriyie Gyawu , E., Tang , Y., Johnson , N., Xu, L., Tang , L., Phillips , T. (2008). NovaSil clay intervention in Ghanaians at high risk for aflatoxicosis II. Reduction in biomarkers of aflatoxin exposure in blood and urine. *Food Additives and Contamination*, 622-634.
- Wiemann, P., & Keller, N. P. (2013). Strategies for mining fungal natural products. *J Ind Microbiol Biotechnol*. doi: 10.1007/s10295-013-1366-3
- Wild, C. P., & Gong , Y. Y. (2010). Mycotoxins and human disease: a largely ignored global health issue. *Carcinogenesis*, 31: 71-82.
- Wild, C. P., & Turner, P. C. (2002). The toxicology of aflatoxins as a basis for public health decisions. *Mutagenesis*, 17(6), 471-481.
- Wogan, G. N. (1966). Chemical nature and biological effects of the aflatoxins. *Bacteriol Rev*, 30(2), 460-470.
- Zain, M. E. (2011). Impact of mycotoxins on humans and animals. *Journal of Saudi Chemical Society*, 15(2), 129-144.
doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jscs.2010.06.006>

8.- ANEXOS

8.1. Cuestionario aplicado sobre el consumo de maíz.

1. ¿Cuál es su nacionalidad y localidad?
 - a) Mexicana Estado ? _____
 - b) Otra nacionalidad: _____
2. Género
 - a) Mujer b) Hombre
3. Lugar de residencia actual
 - a) Municipio: _____
4. Peso y estatura
 - a) Peso: _____ Estatura: _____
5. Edad: _____
6. ¿Con qué frecuencia consume en el desayuno de cereal de maíz?
 - a) 1 plato Día Semana Mes Año
 - b) 2 platos Día Semana Mes Año
 - c) 3 platos Día Semana Mes Año
 - d) Más de 3 platos Día Semana Mes Año
7. ¿Con qué frecuencia consume elotes (vaso o enteros)?
 - a) 1 vaso/elote Día Semana Mes Año
 - b) 2 vasos/elotes Día Semana Mes Año
 - c) 3 vasos/elotes Día Semana Mes Año
 - d) Más de 3 vasos/ Día Semana Mes Año
elotes
8. ¿Con qué frecuencia consume frituras de maíz (sabritas, por mencionar una)?
 - a) 1 bolsa Día Semana Mes Año
 - b) 2 bolsas Día Semana Mes Año
 - c) 3 bolsas Día Semana Mes Año
 - d) Más de 3 bolsas Día Semana Mes Año
9. ¿Qué tan frecuentemente consume tortillas?
 - a) 1 vez Día Semana Mes Año
 - b) 2-3 veces Día Semana Mes Año
 - c) 4-5 veces Día Semana Mes Año
 - d) Más de 6 veces Día Semana Mes Año
10. ¿Cuántas tortillas consumes en cada comida?
 - a) 1 b) 2-5 c) 5-10 d) Más de 10
11. ¿Qué tan frecuentemente consumes productos de maíz preparado en molino?
 - a) 1 Día Semana Mes Año
 - b) 2-5 Día Semana Mes Año
 - c) 5-10 Día Semana Mes Año
 - d) Más de 10 Día Semana Mes Año
12. ¿Preparas tu propio maíz y lo traes al molino o lo compras?
 - a) Sí lo preparo y voy al molino b) Lo compro
13. ¿Qué hace con el agua después de lavar o cocinar el maíz?

14. ¿Conoce la historia del proceso de nixtamalización?
 - a) Sí b) No
15. Describa el procedimiento de nixtamalización que utiliza?

16. ¿Consumes maicena u otro atole que lleve maíz?
 - a) Sí b) No
17. ¿Con qué frecuencia por semana?
 - a) 1 vez b) 2-3 veces c) 4-5 veces d) Más de 6 veces
18. Consume usted algún otro producto elaborado con maíz?
 - a) Sí b) No Describa cual: _____
19. Con qué frecuencia
 - a) 1 vez Día Semana Mes Año
 - b) 2-3 veces Día Semana Mes Año
 - c) 4-5 veces Día Semana Mes Año
 - d) Más de 6 veces Día Semana Mes Año

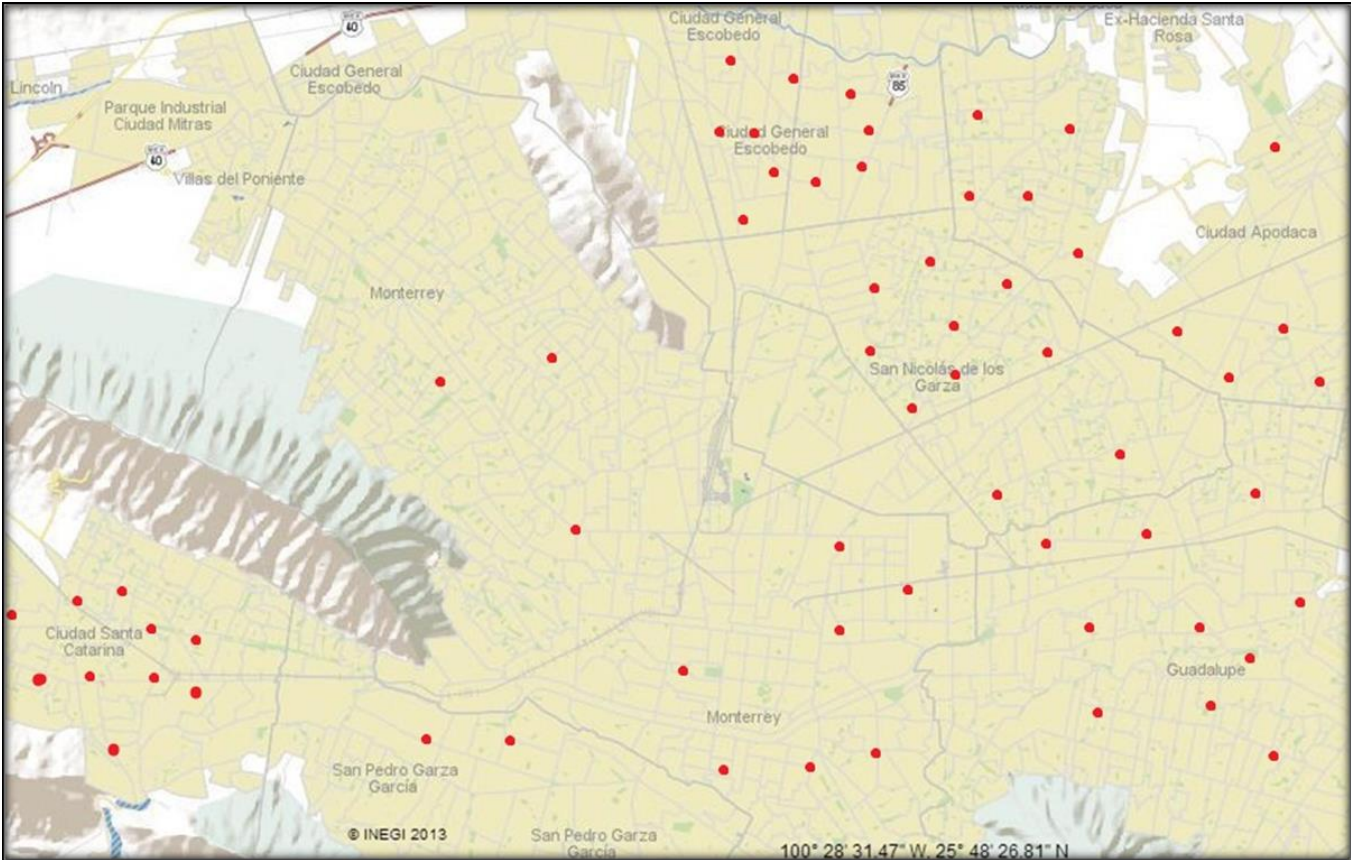
Como parte de esto se entregará un folleto o poster que describa el proceso de nixtamalización y su historia.

Certificó que he entendido el presente cuestionario y se explicó cada una de las preguntas, que no he realizado este cuestionario previamente y que las respuestas brindadas son reales.

Nombre: _____ Firma: _____

Fecha: _____

8.2. Mapa de los molinos del área metropolitana.



8.3. Concentraciones de aflatoxinas y fumonisinas totales por ELISA.

Municipio	Muestra	AF totales (µg/kg)	FB totales (mg/kg)
Apodaca	5	4.2	3.0
	7	2.4	1.0
	8*	1.7	10.1
	13	2.1	2.7
	15	1.3	0.3
	16**	16.9	4.3
	17	1.4	2.0
	18	9.1	2.3
	44	7.9	0.0
	54*	0.0	4.7
Gral. Escobedo	9	0.0	0.1
	10	0.0	0.0
	11	1.2	0.0
	55	2.8	0.1
	56*	0.0	13.5
	57*	6.2	16.6
	58	0.0	0.2
	59	0.3	9.7
	60	0.0	2.3
	61	0.0	8.5
Guadalupe	14	2.2	1.5
	23*	18.4	0.3
	24	2.4	0.5
	25	3.0	0.3
	39*	22.6	0.3
	40	2.7	0.0
	41	2.1	0.0
	42	2.7	0.4
	43	3.7	0.0
	62	2.8	0.2
Monterrey	19*	1.8	4.2
	20	2.3	0.3
	26	1.8	0.2
	27	1.0	0.0
	28	2.5	0.2
	29	3.0	2.7
	30	3.3	1.4
	31	9.7	2.1
	32	3.8	0.0
	53	0.0	1.2

8.4.Cont. Concentraciones de aflatoxinas y fumonisinas totales por ELISA.

Municipio	Número de muestra	Aflatoxinas totales (µg/kg)	Fumonisinias totales (mg/kg)
San Nicolás de los Garza	1	3	0.1
	2	1.2	0.1
	3	2.2	0.1
	4	4.6	2
	6	6.4	2.9
	12	1.4	0.2
	21	2.0	2.9
	22*	16.1	2
	38	8.3	0
	52	0	0.3
Santa Catarina	33	1.1	0.1
	34	1.4	3.3
	35	1.4	0
	36	2.6	0
	37	3.8	0.3
	45	4.4	0
	46	3.9	0
	47	6.6	0.2
	48	4.6	0
	49	6.6	1.4
San Pedro Garza García	50*	19.1	0
	51	0.5	0

Resultados superiores a 12 µg/kg para el caso de AF y 4 mg/kg para el caso de FB; **Muestra que contiene niveles superiores en ambas micotoxinas a los límites permitidos. (El método utilizado fue un ELISA indirecto, con un lector de micro Elisa a una longitud de onda de 450 nm y un filtro de 630 nm. Curva de calibración con un coeficiente de correlación de $R^2=0.9998$).