



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUÉRETARO

FACULTAD DE QUIMICA

PROGRAMA DE POSGRADO EN ALIMENTOS DEL CENTRO
DE LA REPUBLICA (PROPAC)

MAESTRIA EN CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

POSIBLE ACOMPLEJAMIENTO DE LA AFLATOXINA B₁
CON PROTEINAS, CARBOHIDRATOS Y LIPIDOS
MAYORITARIOS PRESENTES EN MAIZ

TESIS

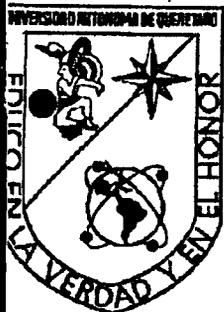
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN
CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

PRESENTA:

Q. en A. SILVIA TREJO GONZALEZ

Santiago de Querétaro, Qro., Mayo del 2001

No. Adm. H65069
No. Título _____
Clas. T5
664.725
T787p
Ej01



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

MAESTRIA EN CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS (PROPAC)

POSIBLE ACOMPLEJAMIENTO DE LA AFLATOXINA B₁ CON PROTEINAS, CARBOHIDRATOS Y LIPIDOS MAYORITARIOS PRESENTES EN MAIZ

TESIS

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL TITULO DE
MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA DE LOS ALIMENTOS

PRESENTA:

Q. en A. SILVIA TREJO GONZALEZ

DIRIGIDA POR:

DRA. Ma. GUADALUPE FLAVIA LOARCA PIÑA

SINODALES

Dra. MA. GUADALUPE FLAVIA LOARCA PIÑA
Presidente

Dr. EDUARDO CASTAÑO TOSTADO
Secretario

DR. ERNESTO MORENO MARTINEZ
Vocal

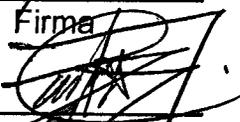
M. en C. Ma. DE LOS ANGELES MUÑOS URQUIZA
suplente

M. en C. CRISTINA CABRERA MUÑOZ
Suplente

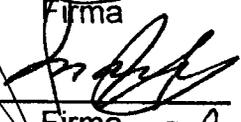
M.C. GUSTAVO PEDRAZA ABOYTES
Director de la Facultad de Química

DR. SERGIO QUESADA ALDANA
Director de Investigación y Posgrado


Firma


Firma


Firma


Firma


Firma

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Querétaro y el Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos (DIPA), por haberme dado la oportunidad de realizar este nuevo reto.

A la Dra. Ma. Gpe. Flavia Loarca Piña por la oportunidad de realizar esta tesis bajo su dirección y por su gran apoyo incondicional.

A todos los del departamento de Toxicología que hicieron mi estancia más agradable.

DEDICATORIA

A Dios por haberme permitido finalizar esta etapa de mi vida.

A ti Moisés que llegaste en esta etapa de mi vida y la llenaste de alegría y a tu papá por su apoyo y cariño.

SUMMARY

In America, the maize crop is important because is the basis of diet for Latin countries. In Mexico the maize is important due to nutritional value and represents one of the main source of energy (70%), and proteins (50%) for an important part of the population. Corn can be to infected frequently by fungi such as *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*. Aflatoxin B₁ (AFB₁) is a micotoxin produced for *Aspegillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* and it is up to know the most potent naturally occurring carcinogen. AFB₁ exposure can produce alterations of carbohydrate and lipid metabolism and mitochondrial respiration, and these are apparently due to the interaction of aflatoxin with some macromolecules such as nucleic acid and proteins and subcellular organelles. The *per cápita* dietary intake in Mexico of maize as tortilla is about 325 g/day. Actually the use instaneous flour in the process of the tortillas is increasing due to the economic crisis. More than 80% of the tortillerias processing the tortilla use a mixture of nixtamal and instaneous flour. Preliminary studies in our laboratory showed that free AFB₁ decreased after the maize is milled, so the objective of our project was to study the possible interaction(s) of AFB₁ and the main maize components (zein, starch and phospholipids). Our results showed that with zein, AFB₁ and 8,9- AFB₁ dihydrodiol concentration decreased, while with starch and phospholipids there was not a decrease. These results suggest that zein can formed interaction with AFB₁ decreasing its bioavailability.

Key Words: Aflatoxins B₁, maize, zein

RESUMEN

En el continente Americano, principalmente en México, el cultivo del maíz es importante porque en él se basa la dieta de muchos habitantes. Su importancia en cuanto a la dieta del mexicano radica en su valor nutricional pues representa una de las principales fuentes de energía (70%) y de proteínas (50%). El grano de maíz puede ser invadido frecuentemente por especies de hongos de los géneros *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*, géneros que pueden sintetizar metabolitos secundarios como las micotoxinas. La aflatoxina B₁ (AFB₁) es una micotoxina producida por *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* y es el más potente carcinógeno conocido que se encuentra en la naturaleza. Alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y respiración mitocondrial, se sabe que resultan de la exposición a la AFB₁, y esto aparentemente es debido a las interacciones de las aflatoxinas con macromoléculas (como ácidos nucleicos y proteínas) y organelos subcelulares (como mitocondria y ribosomas), e interfiriendo con la producción de enzimas y otros reguladores celulares. En México el consumo de maíz en forma de tortilla es muy elevado, siendo el consumo *per cápita* de 325 g/día; actualmente se emplean grandes cantidades de harinas instantáneas en la preparación de las tortillas, debido a la situación económica y a la escasez del grano de maíz en ciertas épocas del año. Por ello, en la mayoría de las tortillerías la elaboración de tortillas se hace con una mezcla de nixtamal y harina instantánea. En estudios preliminares en el laboratorio se mostró que existe disminución en la concentración de la AFB₁ libre cuando el maíz es particularizado (molido), por lo que se propuso el conocer la(s) posible(s) interacción(es) que pudieran darse entre la AFB₁ y algunos componentes mayoritarios del maíz al quedar expuestos debido a la molienda. Debido a esto el objetivo del presente trabajo fue el estudiar la formación de complejos AFB₁ con zeína, con almidón y con lípidos totales de maíz; para ello se incubaron los diferentes componentes con AFB₁ a diferentes tiempos y concentraciones, y se verificó el posible acomplejamiento de estos componentes con AFB₁. La zeína mostró un acomplejamiento no covalente con AFB₁ a las concentraciones de 1 µg/mL y 50 µg/mL, así como también el metabolito 8,9-dihidrodiol AFB₁, mientras que el almidón y los fosfolípidos no mostraron interacción con la micotoxina a las condiciones probadas.

Palabras Claves: Aflatoxina B₁, maíz, zeína

INDICE GENERAL

| | Página |
|---|---------------|
| I. INTRODUCCION | i |
| II. JUSTIFICACION | iv |
| III. ANTECEDENTES | 1 |
| A. MAIZ | 1 |
| 1. Generalidades | 1 |
| 2. Estructura del grano | 3 |
| 3. Composición química | 7 |
| 4. Aplicaciones del maíz | 18 |
| 5. Contaminación | 20 |
| B. AFLATOXINAS | 22 |
| 1. Generalidades | 22 |
| 2. Estructura y sitios de acción | 22 |
| 3. Actividad biológica | 23 |
| a. Toxicidad | 23 |
| b. Efecto inmunosupresor | 27 |
| c. Mutagenicidad | 28 |
| d. Carcinogenicidad | 29 |
| e. Teratogenicidad | 29 |
| 4. Acomplejamiento de aflatoxinas con otros componentes | 30 |

| | | |
|--------------|---|-----------|
| IV. | OBJETIVOS | 33 |
| V. | HIPOTESIS | 34 |
| VI. | MATERIALES Y METODOS | 35 |
| | A. MATERIALES | 35 |
| | B. METODOS | 35 |
| | 1. Solubilidad de la zeína | 35 |
| | 2. Estrategía general | 35 |
| | 3. Interaccion de los metabolitos de AFB₁ con zeína | 38 |
| | 4. Extracción de los fosfolípidos | 38 |
| VII. | ANALISIS ESTADISTICO | 43 |
| VIII. | RESULTADOS | 44 |
| | A. SOLUBILIDAD DE LA ZEINA | 44 |
| | B. INTERACCION DE LA ZEINA CON AFB₁ | 44 |
| | C. INTERACCION DE LA ZEINA CON METABOLITOS DE LA AFB₁ | 54 |
| | D. INTERACCION DEL ALMIDON CON AFB₁ | 58 |
| | E. INTERACCION DE LOS FOSFOLIPIDOS CON AFB₁ | 62 |
| IX. | CONCLUSIONES | 74 |
| X. | REFERENCIAS | 75 |

LISTA DE CUADROS

| | Página |
|--|--------|
| 1. Distribución ponderal de las principales partes del grano | 6 |
| 2. Composición química proximal de las partes del grano de maíz (%) | 8 |
| 3. Composición química general de distintos tipos de maíz | 9 |
| 4. Fraccionamiento de proteínas Blanco Dentado-1MPC y Tuxpeño 1 | 12 |
| 5. Contenido de aminoácidos de maíz común y del MPC (%) | 13 |
| 6. Fibra soluble e insoluble del maíz común y del MPC (%) | 15 |
| 7. Contenido de minerales del maíz | 17 |
| 8. Solución amortiguadora de diferentes pH | 36 |
| 9. Solubilidad de la zeína en diferentes amortiguadores pH=12 | 46 |
| 10. Pérdida de la AFB ₁ en el amortiguador de pH=12 | 47 |
| 11. Interacción de la zeína con los metabolitos de la AFB ₁ | 56 |

LISTA DE FIGURAS

| | Página |
|--|--------|
| 1. Estructura del grano de maíz | 4 |
| 2. Partes de una planta de maíz | 21 |
| 3. Estructura química de la AFB ₁ | 24 |
| 4. Reacciones de degradación de la AFB ₁ | 25 |
| 5. Sitios de acción de las micotoxinas sobre diferentes mecanismos celulares | 26 |
| 6. Reacciones de acomplejamiento de la AFB ₁ con otros componentes celulares | 31 |
| 7. Estrategia general | 37 |
| 8. Diagrama de interacción de los metabolitos de la AFB ₁ con zeína | 39 |
| 9. Obtención de la fracción de los fosfolípidos | 41 |
| 10. Diagrama de interacción de los fosfolípidos con AFB ₁ | 42 |
| 11. Solubilidad de la zeína en diferentes amortiguadores de pH | 45 |
| 12. Efecto de la zeína sobre la concentración de AFB ₁ (1:1) | 48 |
| 13. Efecto de la zeína sobre la concentración de AFB ₁ (2:1) | 49 |
| 14. Efecto de la zeína sobre la concentración de AFB ₁ (100:1) | 51 |
| 15. Cromatograma de la incubación de AFB ₁ y zeína (tiempo de incubación 90 minutos) (HPLC) | 52 |
| 16. Cromatograma del control de AFB ₁ (tiempo de incubación 90 minutos)(HPLC). | 53 |
| 17. Reacciones de acomplejamiento del 8, 9-epóxido AFB ₁ | 55 |
| 18. Estructura de metabolitos de la AFB ₁ | 57 |

| | |
|---|-----------|
| 19. Cromatograma de los metabolitos de la AFB₁ (tiempo de incubación 90 minutos) | 59 |
| 20. Efecto del almidón sobre la concentración de la AFB₁ (1:1) | 60 |
| 21. Efecto del almidón sobre la concentración de la AFB₁ (2:1) | 61 |
| 22. Efecto del almidón sobre la concentración de la AFB₁ (100:1) | 63 |
| 23. Cromatograma de la AFB₁ cuando esta en contacto con el almidón (tiempo de incubación de 90 minutos) | 64 |
| 24. Efecto del almidón waxy sobre la concentración de la AFB₁ (1:1) | 65 |
| 25. Efecto del almidón waxy sobre la concentración de la AFB₁ (2:1) | 66 |
| 26. Efecto del almidón waxy sobre la concentración de la AFB₁ (100:1) | 67 |
| 27. Cromatograma de incubación de AFB₁ y almidón waxy (tiempo de incubación 90 minutos) (HPLC) | 68 |
| 28. Efecto de los fosfolípidos sobre la concentración de AFB₁ (1:1) | 69 |
| 29. Efecto de los fosfolípidos sobre la concentración de AFB₁ (2:1) | 71 |
| 30. Efecto de los fosfolípidos sobre la concentración de AFB₁ (100:1) | 72 |
| 31. Cromatograma de incubación de AFB₁ y los fosfolípidos (tiempo de incubación 90 minutos)(HPLC) | 73 |

I. INTRODUCCION

El maíz se clasifica como una planta herbácea, monocotiledonea perteneciente a la familia de las gramíneas. Los principales componentes del maíz son: almidón, proteínas, lípidos y fibra cruda; además contiene azúcares libres, minerales y vitaminas (Watson, 1987).

El maíz y su grano puede ser infectado por especies de hongos de los géneros *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*; géneros importantes en la producción de toxinas. Las micotoxinas más estudiadas por su impacto en pérdidas económicas e implicaciones en la salud, son las producidas por el género *Aspergillus*, principalmente *A. flavus* y *A. parasiticus* y se les denomina aflatoxinas (Moreno, 1996).

Los productos que más frecuentemente se encuentran contaminados con aflatoxinas son el maíz, la semilla del algodón, la copra y el cacahuete. La soya, el frijol, el sorgo y la cebada son granos que aparentemente no son de los substratos preferidos por estos hongos para la producción de toxinas (Moreno, 1996).

La prevención de la contaminación del maíz en el campo está dada por medidas que eviten que el hongo se establezca en los granos, y para ello se requeriría de plantas vigorosas que resistan el estrés por el agua y temperatura. Lo anterior se debe a que el hongo es un patógeno débil y, como consecuencia, para poder colonizar a los granos de maíz, requieren que la planta se encuentre en un estado de estrés o debilitamiento (Moreno, 1996).

Las aflatoxinas más comúnmente producidas por el *A. flavus* son la aflatoxina B₁ (AFB₁) y la aflatoxina B₂ (AFB₂), mientras que *A. parasiticus* puede también producir dos aflatoxinas adicionales: la aflatoxina G₁(AFG₁) y la aflatoxina G₂(AFG₂). La AFB₁ es la micotoxina más estudiada debido a su toxicidad, mutagenicidad y teratogenicidad (Gary *et al.* , 1992).

El estudio formal de las aflatoxinas se inicia en los años 60' cuando hubo un brote de la llamada enfermedad "X" en pavos en Inglaterra muriendo cerca de 100 000 pavos y otros animales. La causa de esta enfermedad fue atribuida a componentes del alimento formado a base de cacahuate, los cuales resultaron infestados abundantemente con *Aspergillus flavus* en el análisis del alimento, se descubrieron una serie de compuestos fluorescentes, más tarde llamados aflatoxinas, siendo estos los responsable del brote (Ellis *et al.*, 1991).

Los efectos tóxicos de AFB₁ se manifiestan después de que ésta ha sido metabolizada a sus diferentes metabolitos por un complejo enzimático. Esas reacciones enzimáticas involucran metabolismo y detoxificación (Ellis *et al.*, 1991). Sin olvidar que el metabolismo de la AFB₁ a su forma más tóxica se lleva a cabo por el complejo enzimático P450.

Por lo tanto hay la necesidad de prevenir la contaminación de productos por hongos que producen aflatoxina o un control sobre el crecimiento del hongo por manipulación de su microambiente. Otro método de control debería ser el de reducir la concentración de aflatoxinas para asegurar los niveles y/o producir degradación no tóxica de productos sin reducir valor nutricional (Ellis *et al.*, 1991).

Debido a las repercusiones que conlleva ingerir alimentos contaminados por AFB₁, y que lo ideal sería controlar los brotes de hongos toxigénicos tanto en el campo como en almacén, situación que desgraciadamente es difícil de cumplir, por tal motivo es necesario usar métodos de detoxificación, entre los que se encuentran los físicos, los químicos y los biológicos, que permitan reducir la concentración de aflatoxinas a niveles permisibles pero que deban tener la característica de no reducir el valor nutricional y no representar un riesgo a la salud (Ellis *et al.*, 1991).

En estudios preliminares se ha mostrado que la concentración de AFB₁ libre en maíz varía con el solo hecho de moler (particularizar) el grano. En otras palabras la simple molienda de la semilla de maíz para tener una muestra homogénea,

disminuye la concentración detectada de AFB₁ libre. Por ello se propone estudiar el posible acomplejamiento de la AFB₁ con algunos de los constituyentes principales del maíz, ya que se ha observado que la molienda del maíz (particularización) disminuye la concentración de la AFB₁ libre y que esta disminución se puede deber a la interacción de esta micotoxina con algunos componente del maíz, con proteínas principalmente, sin descartar la posibilidad de interacción con los otros componentes. Del acomplejamiento o interacción de la AFB₁ con proteínas como albúmina ya ha sido informada (Sheabar *et al.*, 1993), lo cual nos lleva a investigar sobre las interacciones de esta micotoxinas con los diferentes componentes del maíz, debido a su afinidad electrolítica por moléculas proteicas principalmente.

II. JUSTIFICACION

En México el consumo de maíz en forma de tortilla es muy elevado, siendo el consumo *per cápita* de 325 g/día, y el proceso para la obtención de la misma en la mayoría de los casos es por nixtamalización. Actualmente se emplea mucho harinas instantáneas en la preparación de las tortillas debido a la situación económica y la escasez del grano de maíz en ciertas épocas del año, casi en la mayoría de las tortillerías se emplea una mezcla de nixtamal y harina instantánea para la elaboración de las tortillas. Las harinas instantáneas comerciales si bien se les prepara previa nixtamalización el procedimiento exacto de su preparación se desconoce y también es muy probable que la particularización (molienda) modifique a la AFB₁ libre a AFB₁ acomplejada o unida a moléculas electrofílicas como las proteínas, carbohidratos y lípidos.

El presente trabajo estudia el posible acomplejamiento de la AFB₁ con algunos de los constituyentes principales del maíz, con el fin de determinar si la reducción de aflatoxina con la molienda se debe a un acomplejamiento con algún constituyente principal del maíz, para posteriormente elaborar recomendaciones para la extracción y cuantificación de la AFB₁ presente en el maíz.

III. ANTECEDENTES

A. MAIZ

1. Generalidades

Maíz, palabra de origen indio caribeño, significa literalmente "lo que sustenta la vida". El maíz, que es junto con el trigo y el arroz uno de los cereales más importantes del mundo, suministra elementos nutritivos a los seres humanos y a los animales y es una materia prima básica de la industria de la transformación, con la que se producen almidón, aceite y proteínas, bebidas alcohólicas, edulcorantes alimenticios y, desde hace poco tiempo, combustible (FAO). El maíz se clasifica como una planta herbácea, monocotiledonea perteneciente a la familia de las gramíneas. EL grano de maíz se conoce botánicamente como caryopsis, una baya en la cual la cáscara de la fruta está fusionada con la semilla, formando un solo grano. La estructura del grano lo componen pericarpio, endospermo, germen y pedicelo (Watson, 1987). A menudo es de color blanco o amarillo, aunque también hay variedades de color negro, rojo y jaspeado. Hay varios tipos de grano, que se distinguen por las diferencias de los compuestos químicos depositados o almacenados en él (FAO).

En el continente Americano, principalmente en México, el cultivo del maíz es importante porque en él se basa la dieta alimentaria de muchos habitantes, y a la vez su valor nutricional adquiere un enfoque primordial, pues representa una de las principales fuentes de energía (70%) y de proteínas (50%) para muchos mexicanos (Gordillo, 1990). Es el principal cultivo agrícola en nuestro país, ya que la superficie destinada a éste representa la mitad de la tierra cultivable y aproximadamente una cuarta parte de la población mexicana depende de él (Iturriga, 1987).

El maíz es una planta muy evolucionada productora de una mazorca perfecta, sin paralelo con otro vegetal, cuyo origen ha recibido mucha atención en los últimos cien años. El maíz ha sido alimento, moneda y religión para el pueblo de México y,

sin embargo, la memoria histórica del origen del maíz parece haber desaparecido para algunos mexicanos, inclusive hay quienes tienen la idea de que el maíz proviene de Asia. El maíz es la planta más domesticada y evolucionada. Según Warman ocupa una posición equiparable a la que tiene el hombre en el reino animal. El origen del maíz ha sido un misterio por qué ha llegado a nosotros altamente evolucionada, sin conocerse formas intermedias. Mientras que los cereales del Viejo Mundo tienen variedades silvestres que se preservan en la naturaleza, el maíz es conocido solamente por la especie cultivada (*Zea mays*), el ancestro silvestre, el teocintle, es también su más cercano pariente (Figueroa y Aguilar, 1997).

La domesticación de las plantas y la invención de la agricultura fueron la base del surgimiento y desarrollo de las grandes civilizaciones, un evento excepcional que ocurrió hace alrededor de 10,000 años en muy pocos lugares. Según Vavilov (1951), pueden reconocerse ocho centros primarios de domesticación de las plantas y dos de ellos se localizaron en el hemisferio occidental, específicamente en México y el Perú. A partir de esos centros se extendió su agricultura, ya fuera por imitación o cultura. No existen pruebas del origen histórico del maíz, puesto que en Mesoamérica las evidencias escritas del período precolombino fueron destruidas por la conquista, y las existentes se basan en relatos posteriores. En Europa y Asia no se cita el maíz antes del descubrimiento de América. En particular, no se le menciona en *la Biblia*, ni en hebreo ni en griego, además ni la espiga ni la planta figuran en las representaciones egipcias. Sin embargo, los arqueólogos y etnólogos sugieren que las antiguas civilizaciones de Perú, América Central y México basaban su alimentación en el maíz y que dicho cereal jugaba parte importante en las ceremonias religiosas (Figueroa y Aguilar, 1997).

El maíz como ya se mencionó ha sido alimento, moneda y religión para el pueblo de México. Además era tan importante en las sociedades mesoamericanas que muchas ceremonias se dedicaban a Centéotl, Dios azteca del maíz, o a Yum Kaak, Dios del

maíz y la vegetación en la cultura maya. La representación de plantas de maíz o partes de ella, en esculturas, códices y cerámicas prehistóricas, así como estudios de fósiles, indican que en México fue el centro primario de su origen, domesticación y dispersión a otras regiones de América del Sur hace 5 o 6 mil años, y se piensa que el progenitor silvestre del maíz debió de haber existido desde hace 8000 años. Una hipótesis que favorece esta versión asegura que el maíz es un híbrido natural entre el teocintle y una gramínea ya extinguida. A parte de su domesticación, el maíz ha influido en el desarrollo de las grandes civilizaciones de Mesoamérica. En el México moderno, el maíz representa el componente más importante de la producción agrícola, pues ocupa aproximadamente la mitad de la superficie destinada a la agricultura. En México 2.6 millones de personas se dedican al cultivo del maíz, cifra que equivale al 68 % de la población ocupada en todo el sector agropecuario (Figueroa et al., 1994).

Los países en desarrollo dedican más tierra al cultivo de maíz que los países desarrollados, pero éstos obtienen un rendimiento aproximadamente cuatro veces mayor. Mientras que la mayor parte de la producción de los países en desarrollo se dedica al consumo humano, la del mundo desarrollado sirve fundamentalmente para la elaboración industrial (FAO).

2. Estructura del grano

El grano de maíz se conoce botánicamente como caryopsis, una baya en la cual la cáscara de la fruta está fusionada con la semilla, formando un solo grano. El grano está unido al elote mediante el pedicelo por el cual, através de conductos internos, llegan los productos de la fotosíntesis al mismo, durante su desarrollo (Cortéz y Wild-Altamirano, 1972).

El grano de maíz está compuesto por cuatro partes principales: pericarpio, germen, endospermo y pedicelo como se muestra en la Figura 1 (Inglett, 1970). La

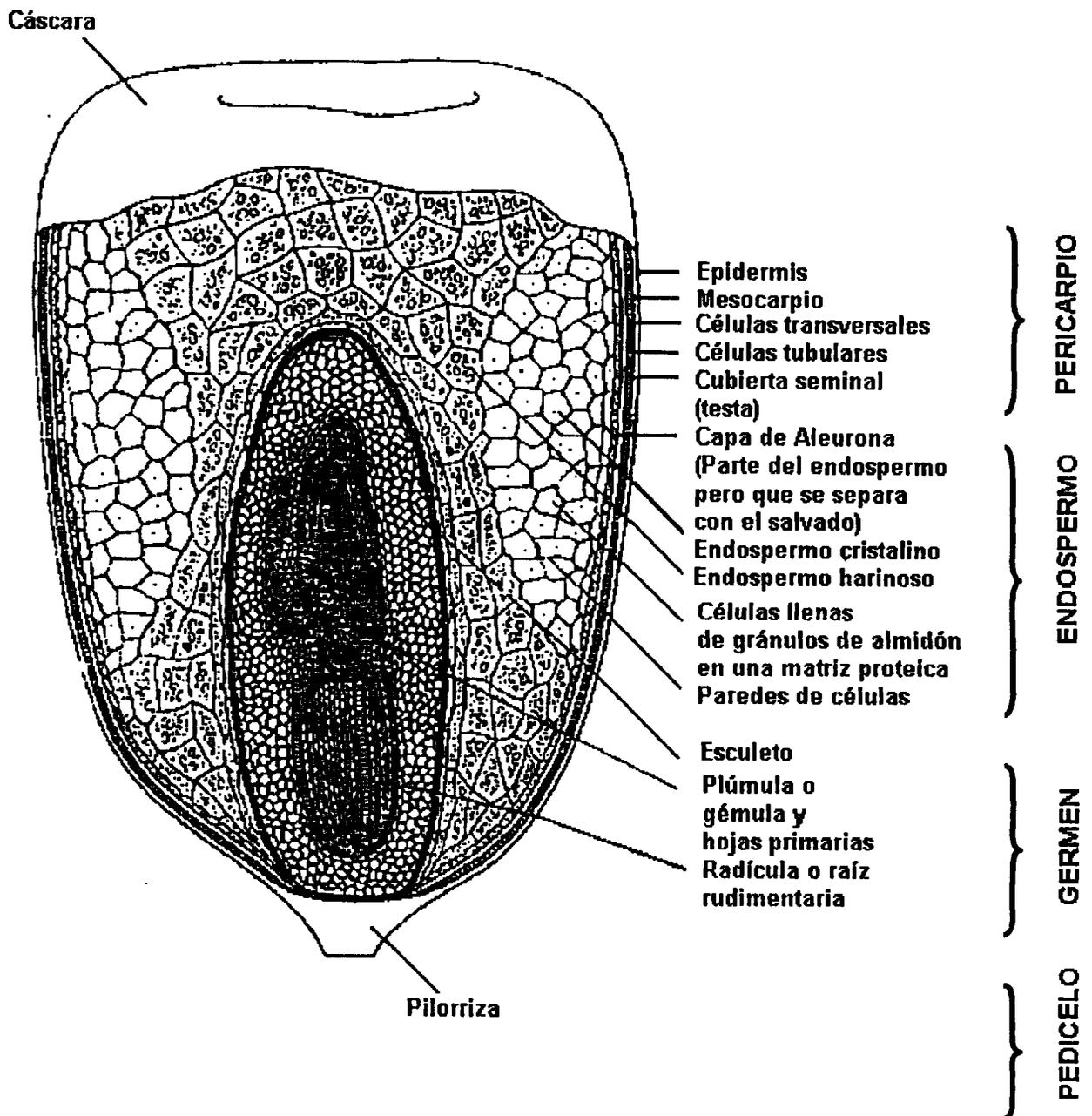


Figura1. Estructura del grano de maíz (Inglett, 1970)

distribución ponderada de las distintas partes del grano se indican en el Cuadro 1 (Bressani y Mertz, 1958).

A continuación se hará una breve descripción de los componentes.

Pericarpio. Este es la verdadera cubierta o cáscara del grano, compuesta por todas las capas exteriores del grano. El pericarpio está formado por una capa de cutícula cerosa que cubre a la epidermis, ambas retardan la absorción de humedad al interior del grano. El mesocarpio (constituyente del pericarpio) compuesto por células alargadas y estrechamente adheridas con numerosas cavidades que proveen interconexiones capilares entre todas las células y facilitando la absorción de agua. La porción más interna del pericarpio está compuesta por células cilíndricas unidas estrechamente a la capa aleurona (capa celular que rodea completamente al grano y cubre tanto al endospermo como al germen). El pericarpio constituye aproximadamente el 5.3 % en peso seco del grano (Watson, 1987; Jackson y Shandera, 1995).

Pedicelo. Representa aproximadamente el 0.8% del grano y es la estructura celular con la que el grano se encuentra unida al olote. Está compuesta de haces vasculares que terminan en la proporción basal del pericarpio, consta de una capa exterior de absición que sella la punta del grano maduro, a esta capa le sigue una serie de células parenquimatosas en forma de estrellas, ligadas por sus puntas, formando una estructura frágil y porosa, conectadas con la capa de células cruzadas del pericarpio. Esta estructura es responsable de la absorción de líquidos del pedicelo al pericarpio (Watson, 1987; Jackson y Shandera, 1995).

Endospermo. Constituye la mayor proporción del grano, con aproximadamente 82% del peso total, del cual el 86.4% es almidón. Está compuesto por células alargadas con delgadas paredes de material celulósico, empacadas con gránulos de almidón (de 5 a 30 μm) sumergidos en una continua matriz proteica (almidón-proteína). La unión e integridad estructural entre la proteína y los gránulos de almidón hace

Cuadro 1. Distribución ponderal de las principales partes del grano

| Estructura | Porcentaje de distribución ponderal |
|------------|-------------------------------------|
| Pericarpio | 5-6 |
| Aleurona | 2-3 |
| Endospermo | 80-85 |
| Germen | 10-12 |

(Bressani y Mertz, 1958)

completamente duro al grano de maíz. El endospermo está compuesto de dos regiones: una harinosa y otra córnea. Generalmente la relación harinosa:córnea es de 2:1. La región harinosa del endospermo se caracteriza por células grandes, por gránulos grandes y redondos, y una delgada matriz proteica, la cual se rompe durante el secado, formando espacios intercelulares vacíos, a los que se les atribuye la apariencia blanca y harinosa del grano. En el endospermo córneo, las células cercanas a la capa aleurona son muy pequeñas y se encuentran empacadas en una pared celular densa, que contiene un alto porcentaje de glutenina, la cual envuelve a los gránulos de almidón. El endospermo del maíz contiene el 75% del total de las proteínas que se encuentran en el grano entero y son principalmente del tipo insolubles, a las que se les atribuye la dureza del endospermo. (Watson, 1987; Jackson y Shandera, 1995).

Germen. El germen representa aproximadamente el 11.4% del grano. Es el embrión u órgano reproductor del grano y está compuesto por plúmula, radícula y escutelo. El escutelo constituye el 90 % del germen y funciona como un órgano o almacén de nutrientes que son movilizados durante la germinación hacia la plúmula (Watson, 1987; Jackson y Shandera, 1995).

3. Composición química

Como se muestra en el Cuadro 2 las partes principales del grano de maíz difieren considerablemente en su composición química. La cubierta seminal o pericarpio se caracteriza por un elevado contenido de fibra cruda, aproximadamente el 87%, la que a su vez está formada fundamentalmente por hemicelulosa (67%), celulosa (23%) y lignina (0.1%) (Burge y Duensing, 1989). El endospermo, en cambio, contiene un nivel elevado de almidón (87%), aproximadamente 8 % de las proteínas y un contenido de grasa relativamente bajo. Por último, el germen se caracteriza por un elevado contenido de grasas crudas, el 33% por término medio, y contiene también un nivel relativamente elevado de proteínas (próximo al 20%) y minerales (Watson, 1987). En el Cuadro 3 se muestra la composición química de

Cuadro 2. Composición química promedio en base seca (%) del grano de maíz

| Fracción | Grano entero | Almidón | Proteína | Lípidos | Azúcares | Cenizas |
|-----------------|---------------------|----------------|-----------------|----------------|-----------------|----------------|
| Grano entero | 100 | 71.5 | 10.3 | 4.8 | 2.0 | 1.4 |
| Endospermo | 82.3 | 86.4 | 9.4 | 0.8 | 0.6 | 0.3 |
| Germen | 11.5 | 8.2 | 18.8 | 34.5 | 10.8 | 10.1 |
| Pericarpio | 5.3 | 7.3 | 3.7 | 1.0 | 0.3 | 0.8 |
| Pedicelo | 0.8 | 5.3 | 9.1 | 3.8 | 1.6 | 1.6 |

(Inglett, 1970)

Cuadro 3. Composición química general de distintos tipos de maíz (%)

| Tipo | Humedad | Cenizas | Proteínas | Fibra Cruda | Extracto etéreo | Hidratos de carbono |
|-------------|----------------|----------------|------------------|--------------------|----------------------------|--------------------------------|
| Salpor | 12.2 | 1.2 | 5.8 | 0.8 | 4.1 | 75.9 |
| Cristalino | 10.5 | 1.7 | 10.3 | 2.2 | 5.0 | 70.3 |
| Harinas | 9.6 | 1.7 | 10.7 | 2.2 | 5.4 | 70.4 |
| Amiláceo | 11.2 | 2.9 | 9.1 | 1.8 | 2.2 | 72.8 |
| Dulce | 9.5 | 1.5 | 12.9 | 2.9 | 3.9 | 69.3 |
| Reventador | 10.4 | 1.7 | 13.7 | 2.5 | 5.7 | 66.0 |
| Negro | 12.3 | 1.2 | 5.2 | 1.0 | 4.4 | 75.9 |

(Cortéz y Wild-Altamirano, 1972)

distintos tipos de maíz, adaptados de un estudio que resume datos de diversas publicaciones. La variabilidad observada es tanto genética como ambiental y puede influir en la distribución ponderal y en la composición química específica del endospermo, germen y la cáscara de los granos (Orr y Watt, 1957).

El componente químico principal del grano de maíz es el almidón; otros hidratos de carbono son azúcares sencillos en forma de glucosa, sacarosa y fructosa en cantidades que varían del 1 al 3 % del grano (Boyer y Shannon, 1987). Los gránulos del almidón en maíz normal contiene dos clases de moléculas –amilosa y amilopectina. La proporción es aproximadamente 27% de amilosa y 73% de amilopectina. Ambas moléculas son polímeros de alto peso molecular formadas por unidades de glucosa. La amilopectina es una molécula ramificada, puede llegar a contener 40,000 o más unidades de glucosa. La amilosa es esencialmente una molécula lineal, de hasta alrededor de 1000 unidades de glucosa. La amilosa puede ser precipitada selectivamente de una dilución de almidón por la adición de alcohol butílico, o por un número de compuestos orgánicos polares (Inglett, 1970). La composición del almidón viene determinada genéticamente. En el maíz común, ya sea con un endospermo de tipo dentado o córneo, el contenido de amilosa y amilopectina del almidón es tal como se ha descrito anteriormente, pero el gen que produce maíz ceroso (Waxy) contiene un almidón formado totalmente por amilopectina (Boyer y Shannon, 1987).

Después del almidón, las proteínas constituyen el siguiente componente químico por orden de importancia. En las variedades comunes, el contenido de proteínas puede oscilar entre el 8 y el 11 por ciento del peso del grano, y en su mayor parte se encuentran en el endospermo (FAO). Estas sustancias se han clasificado por la Sociedad Americana de Fisiología de acuerdo a su solubilidad en: albúminas (solubles en agua), globulinas (solubles en sales), prolaminas (solubles 70-80% de etanol), glutelinas (solubles en soluciones de hidróxido de sodio), y escleroproteínas (insolubles en solventes acuosos). Las albúminas, las globulinas y el nitrógeno no

proteico totalizan aproximadamente el 18% del total del nitrógeno, con proporciones del 7%, 5% y 6%, respectivamente. La fracción de prolamina corresponde del 55% al 52% del nitrógeno del grano; de éstas la prolamina 1 o zeína 1 representa aproximadamente el 42%, y el restante 10% es prolamina 2 o zeína 2 (Landry y Moureaux; 1970, 1982). En el Cuadro 4 resumen los datos sobre el fraccionamiento de las proteínas de un maíz común (Tuxpeño-1) y un MPC (maíz con proteínas de elevada calidad) (Ortega *et al.*, 1986). Una característica importante de las fracciones de zeína es su elevadísimo contenido de leucina, aminoácido relacionado con la deficiencia de isoleucina (Patterson *et al.*, 1980). La zeína (prolamina) son las proteínas de almacenaje del maíz (*Zea mays*), son una mezcla de proteínas y constituyen del 50-70% de las proteínas del endospermo. Actúan como proteínas de almacenaje de nitrógeno para el desarrollo de la semilla. Las zeínas son ricas en aminoácidos como la glutamina y prolamina. Estas prolaminas son separadas en cuatro clases α , β , γ , δ de acuerdo a la diferencias en cuanto a su solubilidad y secuencia. La α -zeína constituye del 75-85% de la fracción total y comprende dos grupos, las zeínas Z19 y Z22 con masas moleculares por SDS-PAGE de aproximadamente 19 y 22 KDa, respectivamente (Tatham *et al.*, 1993).

El maíz como todos los cereales, es deficiente en aminoácidos esenciales lisina y triptófano. Sin embargo, tanto las albúminas, como las globulinas y las glutelinas del maíz contiene un apropiado balance de aminoácidos esenciales y presentan un alto contenido del aminoácido esencial leucina (Wright, 1987). Algunas variedades de maíces modificados o híbridos presentan un aumento considerable del valor de la lisina en maíz normal y también un aumento considerable en triptófano (Paredes-Lopez y Saharópulos-Paredes, 1983). La calidad nutritiva del maíz como alimento viene determinada por la composición de aminoácidos de sus proteínas. En el Cuadro 5 se indican los valores representativos de los aminoácidos, tanto del maíz común como del MPC. Para determinar la suficiencia del contenido de aminoácidos esenciales, en el cuadro figuran también el modelo de referencia de aminoácidos esenciales FAO/OMS. En el maíz común, son patentes las carencias de lisina y

Cuadro 4. Fraccionamiento de proteínas Blanco Dentado-1MPC y Tuxpeño-1

| Fracción | Blanco Dentado-1 MPC | | Tuxpeño-1 | |
|----------|----------------------|------|-----------------|------|
| | mg/g de semilla | % | mg/g de semilla | % |
| I | 6.65 | 31.5 | 3.21 | 16.0 |
| II | 1.25 | 5.9 | 6.18 | 30.8 |
| III | 1.98 | 9.4 | 2.74 | 13.7 |
| IV | 3.72 | 17.6 | 2.39 | 12.0 |
| V | 5.74 | 27.2 | 4.08 | 20.4 |
| Residuos | 1.76 | 8.3 | 1.44 | 7.1 |

Las fracciones II y III son zeína 1 y zeína 2 respectivamente
(Ortega *et al.*, 1986)

Cuadro 5. Contenido de aminoácidos del maíz y del teosinte (%)

| Aminoácidos | EE. UU | | | | Teosinte | MPC blando | Modelo FAO/OMS |
|-----------------|-------------------|----------------|------------------|----------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | 4251 (híbrido) | HO (blanco) | H5 (amarillo) | HP (blanco) | | | |
| (Nitrógeno) | 1.31 | 1.99 | 2.24 | 2.91 | 3.81 ^b | 1.71 ^d | - |
| Acido aspártico | 6.2 | 6.0 | 6.8 | 6.1 | 5.3 | 8.9 | - |
| Acido glutámico | 14.6 | 13.9 | 12.4 | 12.8 | 19.9 | 19.2 | - |
| Alanina | 8.9 | 6.4 | 10.8 | 9.9 | 8.5 | - | - |
| Arginina | 3.9 | 4.6 | 3.6 | 3.9 | 2.9 | 6.7 | - |
| Cistina | 1.6 | 1.5 | 1.2 | 1.4 | 1.1 | 1.9 | - |
| Fenilalanina | 4.5 | 2.9 | 5.3 | 5.7 | 5.7 | 4.1 | 6.0 ^d |
| Glicina | 3.3 | 3.4 | 2.6 | 2.8 | 2.2 | 4.6 | - |
| Histidina | 2.8 | 2.3 | 2.0 | 2.2 | 1.9 | 3.6 | - |
| Isoleucina | 3.3 | 3.5 | 3.7 | 4.0 | 4.7 | 3.5 | 4.0 |
| Leucina | 12.2 | 7.8 | 13.6 | 15.2 | 16.8 | 8.7 | 7.0 |
| Lisina | 2.9 | 3.2 | 2.1 | 2.0 | 1.3 | 4.4 | 5.4 |
| Metionina | 1.6 | 1.2 | 1.7 | 1.1 | 1.2 | 1.8 | 3.5 ^c |
| Prolina | 10.3 | 9.3 | 8.3 | 6.8 | 9.6 | 8.1 | - |
| Serina | 4.6 | 4.8 | 5.0 | 5.5 | 5.2 | 4.5 | - |
| Tirosina | 3.4 | 3.5 | 3.6 | 4.1 | 4.4 | 3.7 | - |
| Treonina | 3.3 | 3.2 | 3.1 | 3.3 | 3.0 | 3.7 | 4.0 |
| Triptofano | 0.49 | 0.56 | 0.43 | 0.44 | 0.38 | 1.0 | 1.4 |
| Valina | 4.6 | 2.1 | 4.3 | 4.6 | 4.8 | 5.3 | 5.0 |

HO: maíz can clavado contenido de aceite.

H5 ,HP: maíz con elevado contenido de proteínas.

^aPorcentaje de proteínas crudas (N x 6.25). g/16 g N.

^bDescascarado.

^cTotal de aminoácidos azufrados.

^dTotal de aminoácidos aromáticos.

(Bressani y Mertz, 1958; Mertz et al., 1975)

triptofano, en relación con el MPC. Otro rasgo importante es el elevado contenido de leucina del maíz común y el bajo contenido de este aminoácido en el MPC.

Los lípidos comprenden un grupo de sustancias que en general son solubles en éter, cloroformo, u otros solventes y poco solubles en agua. La mayoría de los lípidos son triacilgliceridos, ceras fosfatídicas, cerebrocidos, esteroides y caratenoides. Al menos el 85 % de los lípidos del maíz se encuentran en el germen, el cual es la fuente comercial del aceite del maíz (Inglett G. E., 1970). Casi todos los lípidos del maíz son triacilglicéridos libres y los principales ácidos grasos que lo componen son el linoléico que representa el 50 % de los lípidos del grano, el oleico con un 35 %, el palmítico 13 %, el esteárico menos del 4 % y el linolénico menos del 3 % (Jackson y Shandera, 1995).

Después de los hidratos de carbono (principalmente almidón), las proteínas y las grasas, la fibra dietética es el componente químico del maíz que se halla con cantidades mayores. Los hidratos de carbonos complejos del grano de maíz que se encuentran en el pericarpio y la piloriza, aunque también en las paredes celulares del endospermo y, en menor medida, en las del germen. El contenido total de fibra dietética soluble e insoluble de los granos de maíz se indica en el Cuadro 6 (Bressani *et al.*, 1989). Sandstead *et al.*, (1978) hallaron que el salvado de maíz está formado por unos 75% de hemicelulosa, un 25% de celulosa y 0.1% de lignina, en peso seco. El contenido de fibra dietética de los granos descarados será evidentemente menor que el de los granos enteros. El grano maduro contiene pequeñas cantidades de otros hidratos de carbono, además del almidón. El total de los azúcares del grano varían entre 1 al 3%, y la sacarosa, el elemento más importante, se halla esencialmente en el germen. En los granos en vías de maduración hay niveles más elevados de monosacáridos, disacáridos y trisacáridos. Conforme madura el grano, disminuyen los azúcares y aumenta el almidón (FAO).

Cuadro 6. Fibra soluble e insoluble del maíz común y del MPC (%)

| Tipo de maíz | Fibra dietética | | |
|------------------|-----------------|-----------|------------|
| | Insoluble | Soluble | Total |
| De sierra | 10.94±1.26 | 1.25±0.41 | 12.19±1.30 |
| De tierras bajas | 11.15±1.08 | 1.64±0.73 | 12.80±1.47 |
| MPC nutricia | 13.77 | 1.14 | 14.91 |

(Bressani *et al.*, 1989)

La concentración de cenizas en el grano de maíz es aproximadamente del 1.3%, sólo ligeramente menor que el contenido de fibra cruda. El contenido de minerales de algunas muestras de Guatemala se indican en el Cuadro 7. Los factores ambientales influyen probablemente en dicho contenido. El germen es relativamente rico en minerales, con un valor medio del 11 por ciento, frente a menos del 1% en el endospermo. El germen proporciona cerca del 78% de todos los minerales del grano. El mineral que más abunda es el fósforo, en forma de fitato de potasio y magnesio, encontrándose en su totalidad en el embrión con valores de aproximadamente 0.90% en el maíz común. Como sucede con la mayoría de los granos de cereal, el maíz tiene un bajo contenido de calcio y de oligoelementos (Bressani *et al.*, 1989).

El grano de maíz contiene dos vitaminas solubles en grasa, la provitamina A y la vitamina E. Los carotenoides se hallan sobre todo en el maíz amarillo en cantidades que pueden ser reguladas genéticamente, en tanto que el maíz blanco tiene un escaso o nulo contenido de ellos. La mayoría de los carotenoides se encuentran en el endospermo duro del grano y únicamente pequeñas cantidades en el germen. El β -caroteno es una precursor importante de vitamina A, aunque no totalmente aprovechada pues los seres humanos no consumen tanto maíz amarillo como maíz blanco (FAO). Los carotenoides del maíz amarillo pueden destruirse durante el almacenamiento; Watson (1962) encontró en el maíz recién cosechado valores de 4.8 mg/kg, que al cabo de 36 meses de almacenamiento habían disminuido a 1.0 mg/kg. Lo mismo sucedió con las xantofilas. Según estudios recientes, si se mejora la calidad proteínica del maíz aumenta la transformación de beta-caroteno en vitamina A (FAO).

La otra vitamina liposoluble, la vitamina E, que es objeto de cierta regulación genética, se halla principalmente en el germen. La fuente de la vitamina E son cuatro tocoferoles; el más activo biológicamente es el tocoferol- α ; aunque el tocoferol- γ es probablemente más activo como antioxidante (FAO).

Cuadro 7. Contenido de minerales del maíz

| Mineral | Concentración (mg/100 g) |
|----------------|-------------------------------------|
| P | 299.6 ± 57.8 |
| K | 324.8 ± 33.9 |
| Ca | 48.3 ± 12.3 |
| Mg | 107.9 ± 9.4 |
| Na | 59.2 ± 4.1 |
| Fe | 4.8 ± 1.9 |
| Cu | 1.3 ± 0.2 |
| Mn | 1.0 ± 0.2 |
| Zn | 4.6 ± 1.2 |

(Bressani *et al.*, 1989)

Las vitaminas solubles en agua se encuentran sobre todo en la capa de aleurona del grano de maíz, y en menor medida en el germen y el endospermo. Se han encontrado cantidades variables de tiamina y riboflavina en el grano del maíz; su contenido está determinado en mayor medida por el medio ambiente y las prácticas de cultivo que por la estructura genética, aunque se han encontrado diferencias en el contenido de estas vitaminas entre las distintas variedades. La vitamina soluble en agua a la cual se han dedicado más investigaciones es el ácido nicotínico, a causa de su asociación con la pelagra, fenómeno muy difundido en las poblaciones que consumen grandes cantidades de maíz (Christianson *et al.*, 1968). Al igual que sucede con otras vitaminas, el contenido de niacina es distinto según las variedades, con valores medios de aproximadamente 20 µg/g de semilla. Una característica propia de la niacina, es que está ligada a la zeína y por lo tanto, el organismo animal no la puede asimilar; sin embargo existen algunas técnicas de elaboración que hidrolizan la niacina, por ejemplo nixtamalización, permitiendo su asimilación. La asociación de la ingesta de maíz con la pelagra se debe a los bajos niveles de niacina del grano, aunque se ha demostrado experimentalmente que también son importantes los desequilibrios de aminoácidos, por ejemplo la proporción entre la leucina y la isoleucina, y la cantidad de triptofano asimilable (Gopalan y Rao, 1975; Patterson *et al.*, 1980).

El maíz no tiene vitamina B12 y el grano maduro contiene ácido ascórbico sólo pequeñas cantidades. Otras vitaminas, como la colina, el ácido fólico y el ácido pantoténico, se encuentran en concentraciones pequeñísimas.

3. Aplicaciones del maíz.

El maíz tiene tres posibles usos: como alimento, como forraje y como materia prima para la industria. Como alimento, se puede utilizar todo el grano, maduro o no, o bien se puede procesar con técnicas de molienda en seco para obtener un número relativamente amplio de productos intermedios, como por ejemplo sémola de partículas de diferentes tamaños, sémola en escamas, harina y harina fina, que a su

vez tiene un gran número de aplicaciones en una amplia variedad de alimentos; se debe hacer notar que el maíz cultivado en la agricultura de subsistencia continúa siendo utilizado como cultivo alimenticio básico. En lo que respecta a su aplicación como forraje, en los países desarrollados más del 60 % de la producción se emplea para elaborar piensos compuestos para aves de corral, cerdos y rumiantes; en los últimos años, aun en los países en desarrollo en los que el maíz es un alimento fundamental, se utiliza un porcentaje más elevado de la producción como ingrediente para la fabricación de piensos. Los subproductos de la molienda en seco son el germen y la cubierta seminal; el primero se utiliza para obtener aceite comestible de elevada calidad mientras que la cubierta seminal, o pericarpio, se emplea fundamentalmente como alimento, aunque en los últimos años ha despertado interés como fuente de fibra dietética (Earll et al., 1988; Burge y Duensing, 1989). La molienda húmeda es un procedimiento que se utiliza fundamentalmente en el procesado industrial del maíz, aunque el procedimiento de cocción en solución alcalina empleado para elaborar tortillas también es una operación de molienda húmeda que sólo elimina el pericarpio (Bressani, 1990). La molienda húmeda produce almidón de maíz y subproductos entre los que figuran el gluten que se utiliza como ingrediente alimenticio. El germen de maíz elaborado para producir aceite da como subproducto harina de germen que se utiliza como pienso; ha habido algunos intentos de emplear dichos subproductos para el consumo humano en distintas mezclas y formulaciones alimenticias (FAO).

El aumento de los precios del petróleo ha impulsado la intensificación de las investigaciones sobre la fermentación del maíz para producir alcohol combustible, el cual tiene un uso muy difundido en algunas partes de los Estados Unidos de Norteamérica (EEUU). Con maíz fermentado se elaboran también algunas bebidas alcohólicas.

Por último, también tienen importancia las aplicaciones de los residuos de la planta de maíz, que se utilizan, entre otras cosas, como alimento para animales y como

base para extraer diversos productos químicos de las panojas, como por ejemplo, furfural y xilosa. Estos residuos también tienen importancia como elementos para mejorar los suelos (FAO).

5. Contaminación por hongos y toxinas.

El grano de maíz puede ser invadido frecuentemente por especies de hongos de los géneros *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*; y éstos son los más importantes en la producción de toxinas. La contaminación con aflatoxina del maíz se puede llevar a cabo en el campo por las condiciones climatológicas, particularmente por las condiciones de temperatura y estrés por el agua que se presenta durante la formación de los granos y también por las condiciones desfavorables de almacenamiento (Gary *et al.*, 1992).

La AFB₁ es el más potente carcinógeno conocido que se encuentra en la naturaleza. La Administración de Alimentos y Drogas (FDA) de los EEUU ha establecido como límite 20 µg de AFB₁/kg en granos para no rebasar el límite de AFM₁ en leche líquida 0.5 µg/L (Payne, 1992). En México se sigue como práctica común que granos en concentraciones superiores a 10 µg/kg. de AFB₁ se destinen a la alimentación de ganado lo que conlleva a un riesgo para la salud humana (Gary, *et al.*, 1992).

El *A. flavus* coloniza con facilidad los estigmas externos a las brácteas y luego desciende rápidamente por la mazorca, invadiendo primero los estigmas interiores, luego las glumas y la superficie de los granos, pero rara vez penetra a la médula del olote. El hongo vive en los estigmas, glumas y superficies de los granos hasta la etapa tardía del desarrollo del grano de maíz (Figura 2). Cuando el grano se aproxima a la madurez (su contenido de humedad es de cerca de 32 %), el hongo lo penetra principalmente a través de la región del pedicelo. *A. flavus* es capaz de introducirse desde superficie y al parecer es más frecuente la infección interna,

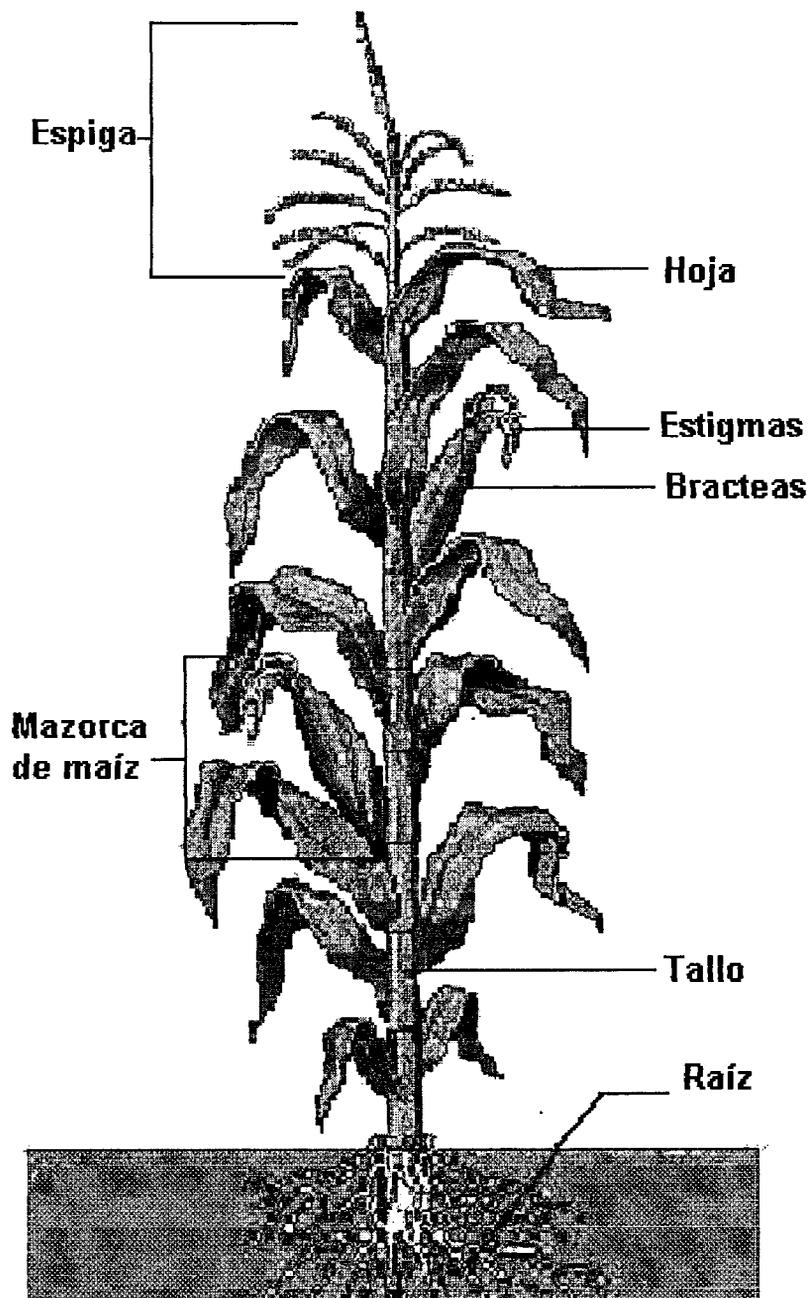


Figura 2. Partes de una planta de maíz (Parson, 1984; Aldrich y Leng, 1974)

hecho que quizá desempeñe una función primordial en la epidemiología de la enfermedad. La presencia del hongo en las superficies de los granos le permiten invadir con rapidez los granos que son dañados por los insectos al alimentarse (Zuber *et al.*, 1987).

B. AFLATOXINAS

1. Generalidades

Las aflatoxinas son micotoxinas producidas por los hongos *A. parasiticus* y *A. flavus*. La palabra aflatoxina es formada de la siguiente manera, la primera letra "A" por el género *Aspergillus*, el próximo conjunto de tres letras "FLA" por la especie *flavus* y el nombre "TOXIN" por significar veneno (Ellis *et al.*, 1991).

Estas sustancias pueden contaminar diferentes alimentos, entre los que se encuentran cereales y oleaginosas, semilla de algodón, productos cárnicos, bebidas fermentadas hechas a base de granos, productos lácteos, vinos, etc. En general, las aflatoxinas son termorresistentes (260-320°C) y altamente solubles en solventes polares no así en agua, lo que les confiere resistencia a la degradación, bajo condiciones normales de procesamiento de los alimentos, tales como: la cocción, el freído y la pasteurización. Son fluorescentes al exponerlas a la luz ultravioleta de ondas cortas. La separación cromatográfica en sílica gel de éstas, se basa precisamente en sus propiedades fluorescentes. Las letras B y G indican el color de la fluorescencia observada a una determinada longitud de onda (por sus siglas en inglés Blue y Green respectivamente), y la letra M es debido a que se encuentra generalmente en leche (Milk) (Hsieh y Atkinson, 1990; Carbajal y Arroyo, 1995).

2. Estructura y sitios activos

Químicamente las aflatoxinas son derivados de difuranocumarina. Existen al menos 18 diferentes tipos de aflatoxinas que han sido identificadas, pero las más comunes son AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFM₁ y AFM₂.

Las aflatoxinas poseen dos sitios importantes relacionados con su carcinogenicidad y sus propiedades fluorescentes, los que son susceptibles a transformaciones por compuestos ácidos o básicos. Ambos sitios son anillos, el primero es una cumarina y el segundo es un furano (Figura 3). Si el agente actúa contra la estructura cumarínica, se afecta directamente la fluorescencia de la toxina importante en la cuantificación y detección de este grupo de tóxicos, por lo que se puede enmascarar la presencia de la toxina ya que esta reacción es reversible. Si la lactona que forma parte de esta estructura, es totalmente eliminada se dará lugar a otra serie de compuestos menos tóxicos. Si se actúa sobre el anillo furano, lo que se afecta de manera directa es la potencialidad toxigénica de la aflatoxina. En la Figura 4 se muestran las reacciones de degradación que puede sufrir la AFB₁ por acción de algunos compuestos químicos (Yousef y Marth, 1989).

3. Actividad biológica

Las aflatoxinas pueden ingresar al organismo a través de la ingestión tanto de alimentos como de bebidas, son absorbidas en el tracto digestivo y rápidamente metabolizadas en éste, principalmente en hígado (Trimbell, 1991).

Las micotoxinas pueden afectar a las células a diferentes niveles, causándoles desórdenes bioquímicos no deseados, entre los que se pueden citar la interacción con membranas celulares; la interferencia con el metabolismo energético; las interacciones con el ADN y con moléculas proteicas; la inhibición de la transcripción (síntesis de ARN) y de la traducción (síntesis de proteína) y la interferencia con el metabolismo de purinas. En la Figura 5 se muestran los sitios de acción de las micotoxinas sobre diferentes mecanismos celulares. Resulta fácil observar que la AFB₁ interviene en todos ellos (Betina, 1989a).

a. Toxicidad

La toxicidad de las aflatoxinas ha sido ampliamente estudiada, principalmente la de AFB₁. Esto obedece a su repercusión en la salud humana; así como las pérdidas

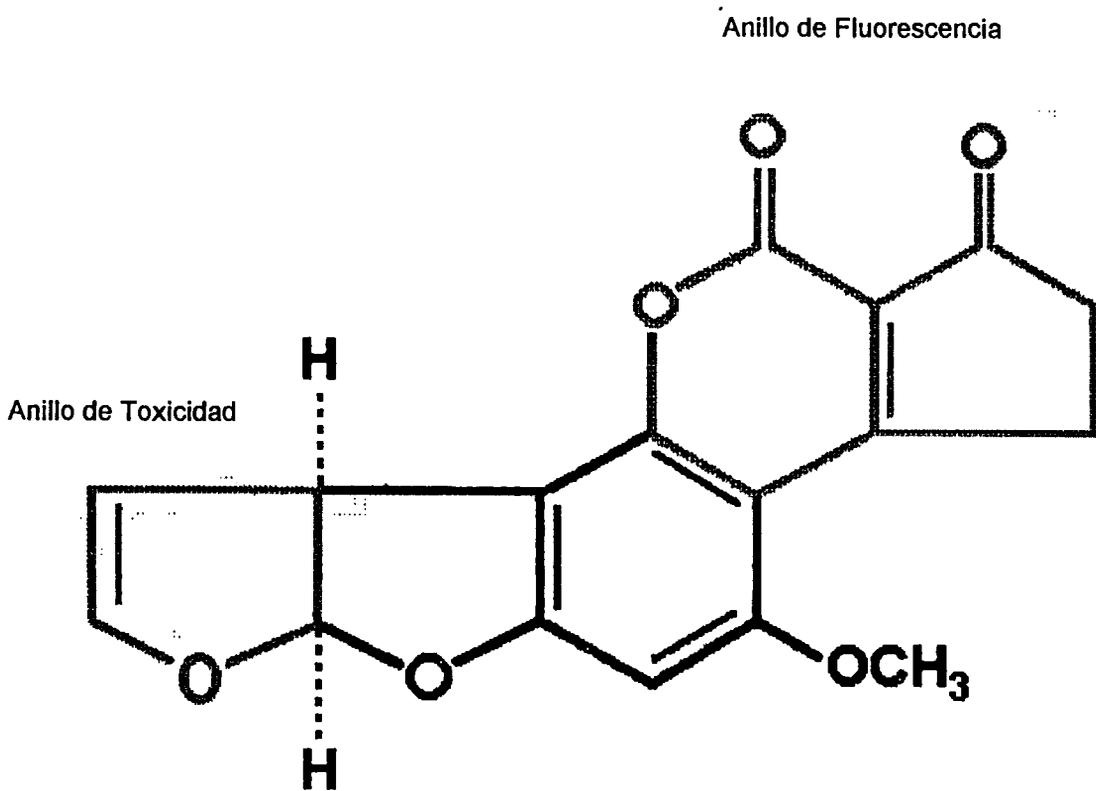


Figura 3. Estructura química de la Aflatoxina B₁ (Yousef y Marth, 1989)

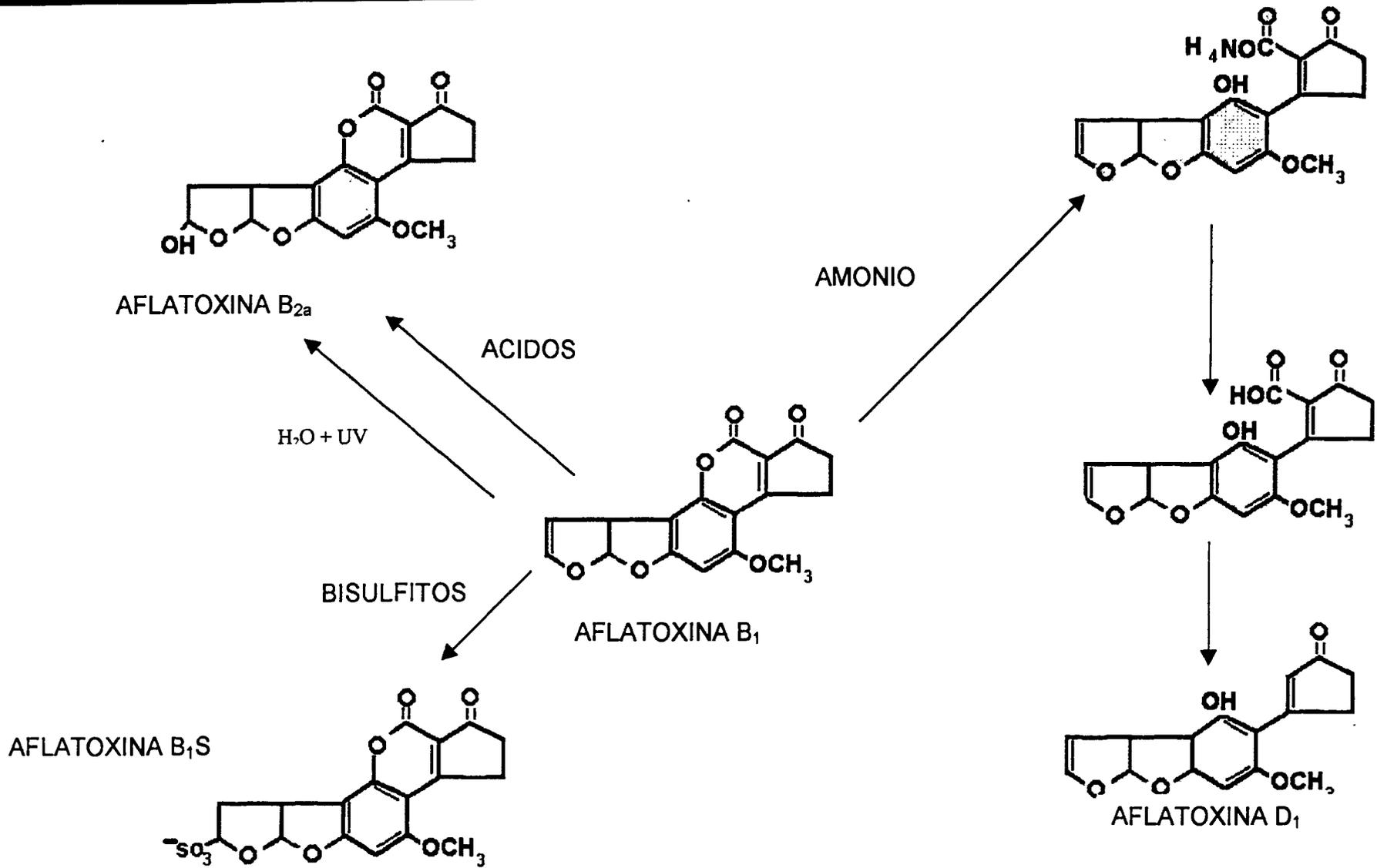


Figura 4. Reacciones de degradación de la AFB₁ (Yousef y Mart, 1989)

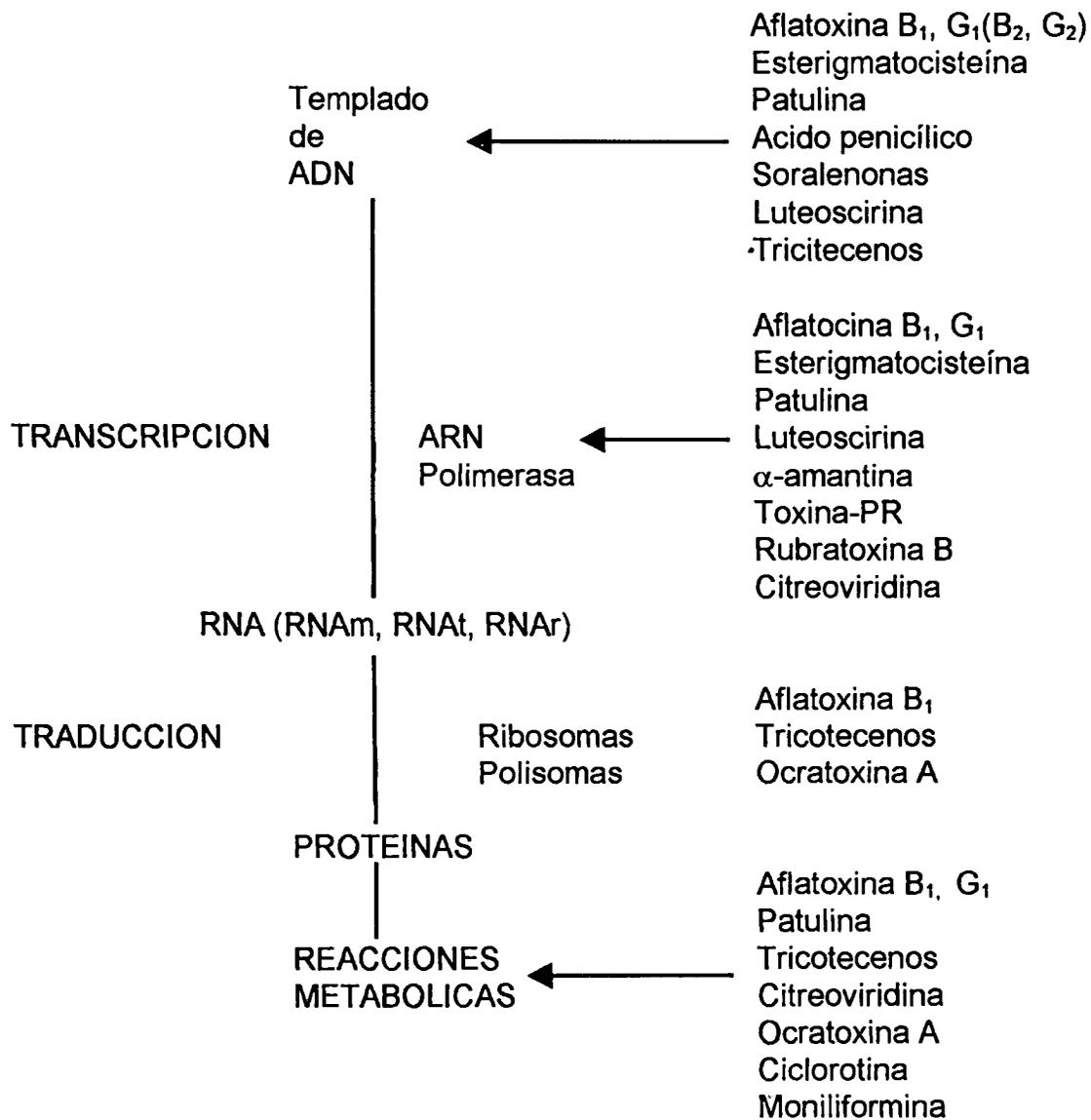


Figura 5. Sitios de acción de las micotoxinas sobre diferentes mecanismos celulares (Betina, 1989 a)

materiales y económicas que puede ocasionar una intoxicación aguda como la descrita en los años 60's en pavos.

Los valores de dosis letal media (DL_{50}) varían considerablemente de acuerdo al género, a la especie, al sexo y a la cepa, así como a la vía de administración y edad del animal. Las aflatoxinas son tóxicas, particularmente al hígado. Dependiendo de la duración de la exposición y de la concentración, se puede presentar una toxicidad aguda o crónica. El mecanismo de acción de la AFB_1 hacia células hepáticas ha sido ampliamente estudiado, sin embargo, aún no ha sido completamente elucidado (Roebuck y Maxuitenko, 1994; Coulombe, 1994).

LA AFB_1 causa hepatotoxicidad a niveles tan bajos como la mitad de la DL_{50} . La toxicidad de las aflatoxinas G_1 , B_2 y G_2 es de aproximadamente 50, 20 y 10 % con respecto a la AFB_1 respectivamente, al probarse contra varias especies animales y en cultivos de células de mamíferos (Terao y Ohtsubo, 1991).

La exposición crónica es más probable que ocurra con mayor facilidad, que una exposición aguda. En la literatura, existe mucha evidencia de que una exposición crónica a AFB_1 , en animales de experimentación, produce cáncer, siendo los primeros síntomas pérdida de peso corporal e hipertrofia del hígado (Roebuck y Maxuitenko, 1994).

b. Efecto inmunosupresor

Además del hígado, el timo es uno de los principales órganos atacados por la aflatoxina. El consumo de aflatoxina produce aplasia del timo y una marcada supresión de las repuestas inmunológicas en las que interviene las células, así como factores no especificados de los mecanismos de defensa naturales, incluyendo fagocitosis por parte de los macrófagos. Suelen ser normales las poblaciones de células T de la sangre periférica y las cantidades de anticuerpos. Se

piensa que los efectos inmunosupresores se derivan de los efectos ejercidos sobre la presentación del antígeno y la producción de linfocitos (Zuber *et al.*, 1987).

Las aflatoxinas pueden también afectar el sistema inmune celular y humoral, provocando con ello un aumento en la susceptibilidad de los animales hacia enfermedades bacterianas, por hongos y parásitos. Además, pueden existir efectos inmunotóxicos sin observarse patología clínica aparente (Coulombe, 1994; Miller y Wilson, 1994).

La AFB₁ puede inducir la formación de anticuerpos. Las consecuencias inmunológicas de la exposición a aflatoxinas son:

- Efecto sobre la producción de anticuerpos.
- Efecto sobre sustancias humorales no específicas.
- Efecto sobre las respuestas inmunes mediadas por células

c. Mutagenicidad

Las micotoxinas que de alguna manera interaccionan con el ADN poseen propiedades mutagénicas y carcinogénicas. Las propiedades mutagénicas de las aflatoxinas han sido comprobadas usando diferentes sistemas biológicas, sin embargo el método de Bruce Ames es el más utilizado (Hayes, 1981; Betina, 1989a).

Dentro de los bioensayos usados para medir mutagenicidad de aflatoxinas se pueden citar:

- Detección de aberraciones cromosómicas en linfocitos humanos; cultivos pulmonares embrionicos humanos, células de riñón de rata, hámster; células Hela y raíces de *Allim cepa*.
- Detecciones de mutaciones en microorganismos como *Bacilos subtilis*, *Escherichia coli*, *Neurospora crassa*, *Salmonella typhimurium*; *Drosophyla melanogaster*, células embrionicas pulmonares humanas; células T de riñón humano; cultivo de leucositos

humanos; micronucleos de hámster y ratón; cultivos de células de riñón de rata; e inducción de fagos en bacterias lisógenas (Hayes, 1981, Betina, 1989a).

d. Carcinogenicidad

La capacidad de las distintas aflatoxinas para inducir daño en especies animales difiere considerablemente, siendo el motivo principal que en las diversas especies existe variabilidad en cuanto a su metabolismo, a su distribución y a su excreción, por lo que las cantidades mínimas necesarias para inducir cáncer son también dependientes de estas propiedades, sin perder de vista, además, la susceptibilidad relativa de cada especie animal (Loechler, 1994).

A la AFB₁ se le ha considerado como procarcinógeno que por activación metabólica produce el 8,9-AFB₁ epóxido, que es la forma más activa. El aducto primario resultante de la administración de AFB₁ es el derivado N⁷-guanina, 2,3-dihidro-2-(N⁷-guanil)-3-hidroxi aflatoxina-B₁, tanto en animales como en humanos. Se sugiere que en humanos la exposición a aflatoxinas puede aumentar el fenómeno de carcinogenicidad como consecuencia del incremento en la activación de oncogenes, o como el caso del gen p53, por una alteración en un gen supresor (Dragan y Pitot, 1994).

e. Teratogenicidad

Algunas micotoxinas presentan efectos teratogénicos, es decir, son capaces de interferir con el desarrollo normal de los fetos y la respuesta depende del estadio de desarrollo del feto, la dosis y por la vía de administración. Por ejemplo, se observaron malformaciones severas en embriones de pollos inyectados con aflatoxinas en el saco de la yema, y no así cuando las toxinas se inyectaron en la cámara aérea. También se ha descrito que las aflatoxinas pueden causar retardo en el crecimiento de los embriones de pollo, independientemente del tiempo y de la vía de administración de la toxina (Ellis *et al.*, 1991).

Entre los embriones de mamíferos los más susceptibles al daño teratogénico por aflatoxinas son los hámsters. Cuando se inyecta intravenosamente AFB₁, el grado de severidad es dependiente del período de gestación en el que se administra y de las dosis. La inyección durante la organogénesis activa (8 días) ocasiona la muerte fetal y la reabsorción de algunos fetos, siendo posible observar malformaciones en algunos fetos que logran sobrevivir. Si la toxina se aplica después del décimo tercer día, cuando la organogénesis está casi finalizada, no ocurre mal formación de los fetos, y la reabsorción y la muerte fetal ocurre en baja frecuencia (Hayes, 1981).

Las ratas son también susceptibles a la teratogenicidad por AFB₁, y su grado de severidad es dependiente del estadio embrionario del feto. Si la administración es después de que se ha completado la organogénesis, el efecto es solo un retardo en el crecimiento (Hayes, 1981).

Los ratones son más resistentes, sin embargo cuando se administra AFB₁ (4mg/kg) por vía esofágica a ratonas preñadas de la cepa CBA, ocurre grandes anomalías en los fetos, tales como anencefalía, ojos abiertos y pudrición intestinal, si la administración ocurre a los 8 días de gestación. No así cuando la toxina se aplica al noveno día de gestación no se presentan anomalías (Terao y Ohsubo, 1991).

5. Acomplejamiento de aflatoxinas con otros componentes

Algunos de los metabolitos de la AFB₁ de reacciones catalizadas por el citocromo P450 (CYP450) en mamíferos son menos carcinogénicos que su parental y son generalmente considerados productos de detoxificación. En contraste, su epóxido (AFB₁-8,9-epóxido) es un químico inestable, potente electrofílico que forma aductos con ADN, ARN y proteínas. La detoxificación del epóxido en roedores ocurre principalmente por conjugación con glutatión (GSH) vía glutatión S-transferasa (GST) como se muestra en la Figura 6 (Heinonen *et al.*, 1996).

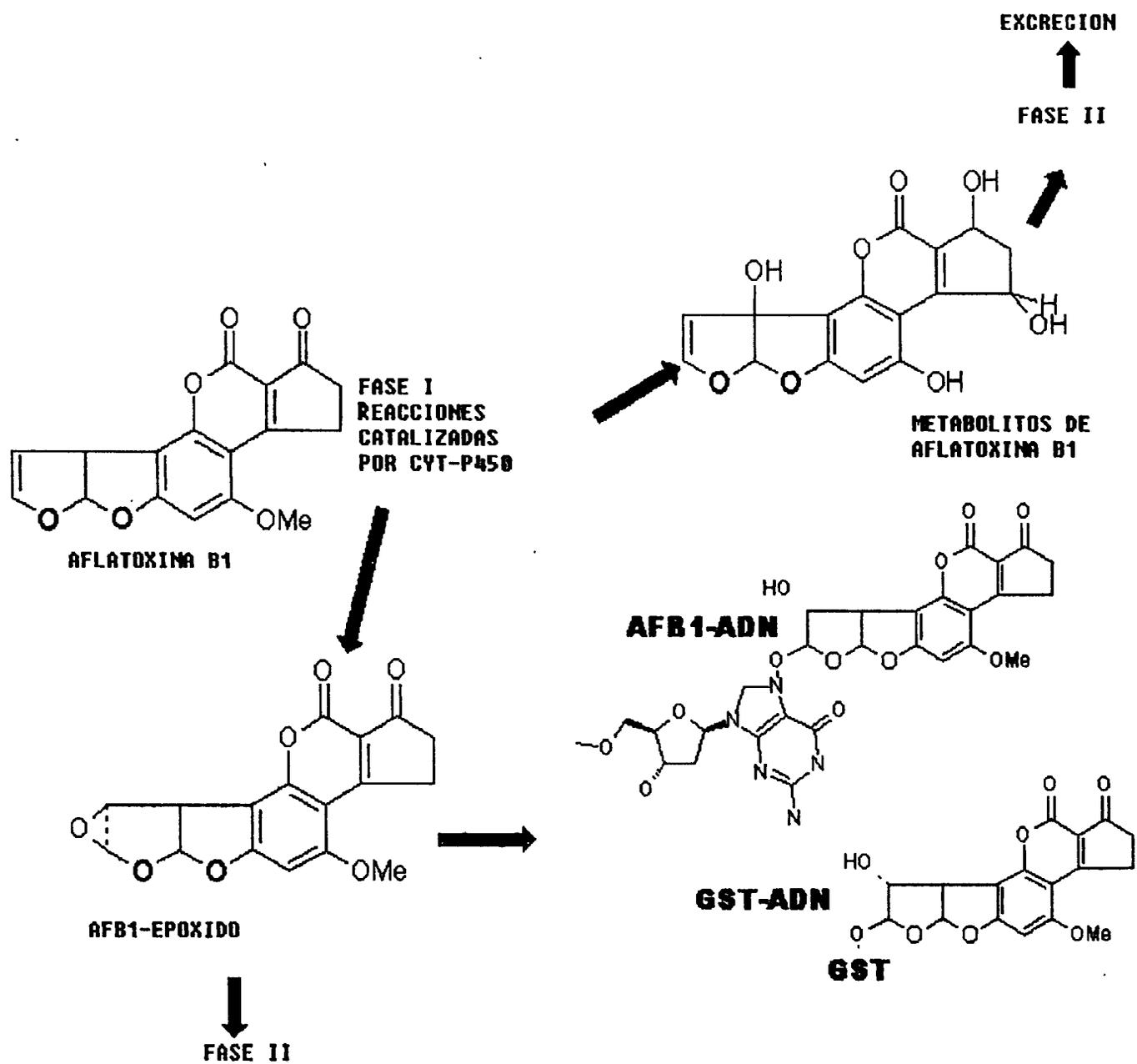


Figura 6. Reacciones de acomplejamiento de la AFB₁ con otros componentes celulares (Stewart et al., 1996)

Los metabolitos de AFB₁ (AFB₁-8,9-epoxido y AFB₁-8,9-dihidrodiol) también pueden reaccionar con macromoléculas celulares tales como DNA, RNA y proteínas, formando enlaces covalentes. La unión de la toxina a DNA a el átomo N⁷ del residuo de guanina a mostrado estar involucrado en la carcinogenesis mediada por AFB₁. Las histonas, proteínas nucleares no-histonas, albúminas y algunas proteínas se les ha atribuido también la propiedad de union-AFB₁. Sin embargo, el papel de esas proteínas en la carcinogenicidad y toxicidad mediada por AFB₁ es desconocida (Iwaki *et al.*, 1993).

Algunos estudios han mostrado que algunas clases de proteínas celulares son capaces de unirse a (³H) AFB₁ tanto *in vitro* como *in vivo* (Iwaki *et al.*, 1993).

Alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y respiración mitocondrial, se sabe que resultan de la exposición a la aflatoxina, y esto aparentemente es debido a las interacciones de la aflatoxinas con macromoléculas (como ácidos nucleicos y proteínas) y organelos subcelulares (como mitocondria y ribosomas), e interfiriendo con la producción de enzimas y otros reguladores celulares (Zuber *et al.*, 1987). En humanos expuestos a AFB₁ se ha observado que pueden formar aductos con albúmina. Los niveles de ambos aductos fue en el siguiente orden: rata > cerdo de guinea > hamster > ratón. Los niveles del aducto AFB₁-albúmina también reflejan al menos cualitativamente la susceptibilidad relativa de las diferentes especies a carcinogénesis por AFB₁, la rata es sensible y el hamster y el ratón son resistentes (Wild *et al.*, 1996).

Tomando en cuenta los estudios preliminares de que la concentración de AFB₁ libre disminuye por la molienda del maíz y la capacidad de la AFB₁ de unirse a macromoléculas se propusieron los siguientes objetivos.

IV. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Estudiar la formación de complejo AFB₁ con zeína, almidón y lípidos totales de maíz.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Evaluar el acomplejamiento de la zeína, proteína mayoritaria del maíz con AFB₁ de acuerdo a las propiedades funcionales de la proteína.
2. Estudiar el acomplejamiento del almidón de maíz con AFB₁.
3. Evaluar el acomplejamiento de fosfolípidos presentes en aceite de maíz con la AFB₁.

V. HIPOTESIS

La AFB₁ se acompleja con zeína, almidón y fosfolipidos, componentes principales del grano de maíz.

VI. MATERIALES Y METODOS

A. MATERIALES

Zeína, Almidón, amilopectina y AFB₁ fueron obtenidos de Sigma, los fosfolípidos fueron extraídos a partir de aceite de maíz según la metodología propuesta por MacRachie (1977). Los demás reactivos utilizados fueron Baker.

B. MÉTODOS

1. SOLUBILIDAD DE LA ZEINA

Se evaluó la solubilidad de la zeína con diferentes soluciones amortiguadoras de pH de 2 hasta un pH de 13 (Cuadro 8)

2. ESTRATEGIA GENERAL

La zeína (0.5µg/mL, 1µg/mL y 50µg/mL), el almidón (0.5µg/mL, 1µg/mL y 50µg/mL) y los fosfolípidos (0.5µg/mL, 1µg/mL y 50µg/mL) se incubaron con AFB₁ (0.5µg/mL) por 0, 30, 60 y 90 minutos a temperatura ambiente y en agitación. Al término de la incubación se extrajo y purificó la AFB₁ libre y el posible complejo AFB₁/zeína o AFB₁/almidón o AFB₁/fosfolípidos pasando la muestra por un cartucho de Sep Pak (empacado con C18), prelavando el cartucho con dos volúmenes de metanol, seguido de dos volúmenes de ácido acético 0.05M, después se adicionó la muestra y se lavó con dos volúmenes de ácido acético 0.05M, posteriormente se eluyó la muestra con dos mL de metanol (ver Figura 8). La cuantificación se realizó en cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) Waters equipado con dos bombas modelo 510 y con detector de fluorescencia Waters y se llevó al cabo en una columna Water Nova-Pak C₁₈, fase reversa (3.9 x 300 mm, 4 µm), se utilizó un programa isocrático y como fase móvil se aplicó un gradiente lineal de ácido acético 0.0125 N / acetonitrilo v/v (60% / 40%). Las muestras y los estándares se analizaron con un detector de fluorescencia Waters 420 AC, con un filtro de longitud de onda de 338 nm de excitación y 425 nm de emisión. Cada muestra se hizo por duplicado y

Cuadro 8. Soluciones amortiguadoras de diferentes pH

| Solución amortiguadora | pH |
|---|-----------|
| 0.2 M KCl +0.2 M HCl | 2 |
| 0.1M Ftalato ácido de potasio +0.1 M HCl | 4 |
| 0.1 M Fosfato diácido de potasio+0.1 M NaOH | 6 |
| 0.1 M Fosfato diácido de potasio+0.1 M NaOH | 8 |
| 0.05 M Bicarbonato de sodio + 0.1 M NaOH | 10 |
| 0.2 M KCl + 0.2 M NaOH | 12 |
| 0.2 M KCl + 0.2 NaOH | 13 |

(Handbook of chemistry and physics, 1988)

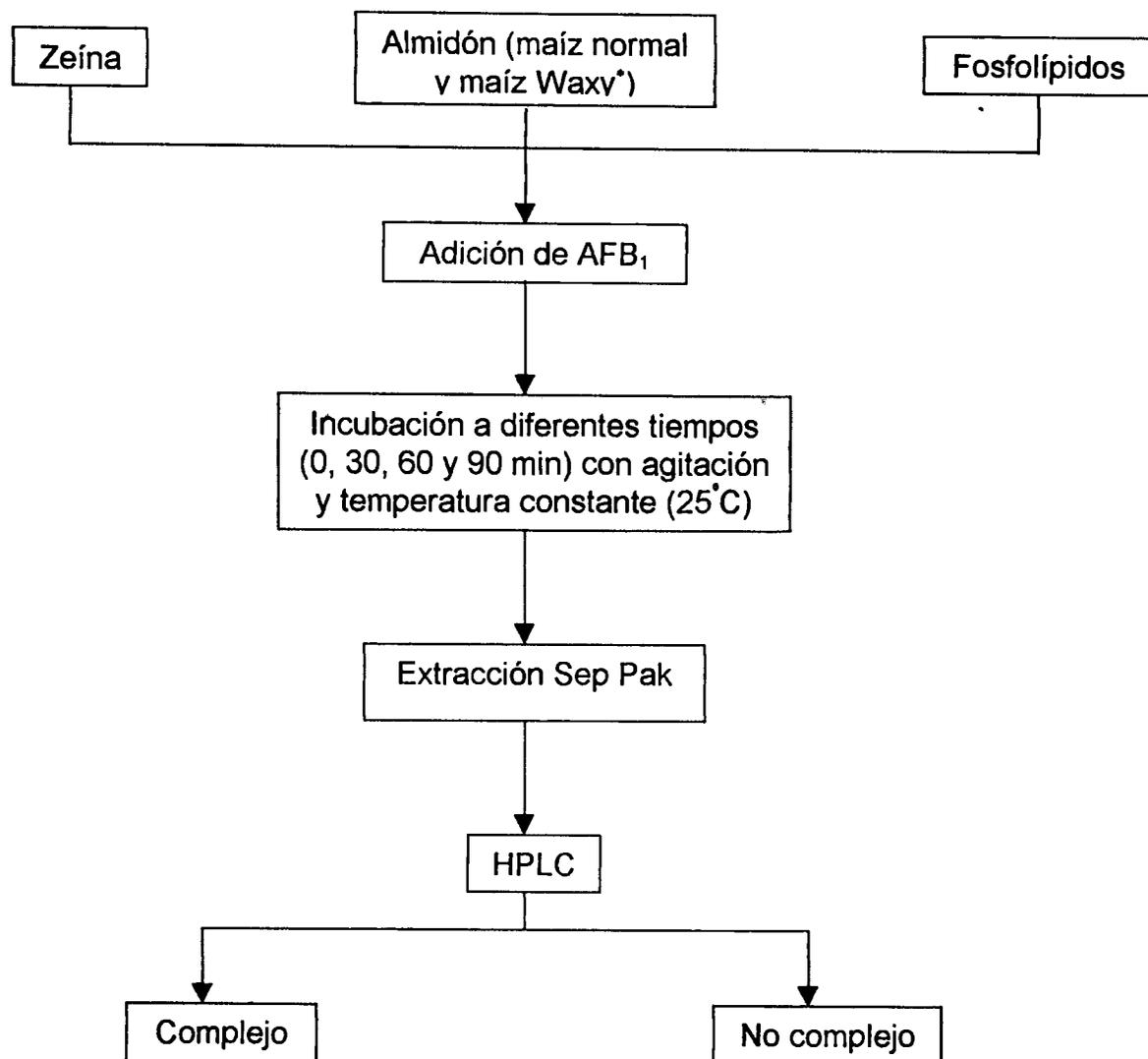


Figura 7. Estrategia general

se comparó con una curva de calibración. Se verificó el posible acomplejamiento de la AFB₁ de dos diferentes formas: por disminución en la concentración de la AFB₁, comparándola contra un blanco en las mismas condiciones y por la aparición de un nuevo pico en el cromatograma.

3. INTERACCIÓN DE LOS METABOLITOS DE AFB₁ CON ZEÍNA

Se ha informado que algunos metabolitos de la AFB₁ también pueden acomplejarse con macromoléculas por lo que se planteó la posible interacción de los metabolitos de AFB₁ con la zeína; para ello se llevó a cabo la metabolización de la AFB₁ con S9 (fracción microsomal de ratón, rica en complejo enzimáticos de las fases I y II del metabolismo de los xenobioticos): en primer lugar se produjeron los metabolitos, poniendo en contacto la AFB₁ con S9 (0.5µg/mL y 2mg/mL), incubándolos por 90 minutos (no se dejó mayor tiempo de incubación debido a que el complejo enzimático pierde mayor actividad conforme pasa el tiempo). Posteriormente se le adicionó la zeína y se dejó la mezcla en incubación por 90 minutos más. Teniendo como controles la AFB₁ sin S9, AFB₁ + S9, así como zeína + S9 (Figura 7). La extracción y cuantificación de AFB₁ y sus metabolitos se realizó a los 0, 45, 90 y 180 minutos. En este caso se utilizó PBS (amortiguador de fosfatos, pH=7.4) como solvente, debido a que si utilizáramos el amortiguador de pH=12 la actividad de la fracción microsomal se veía afectada por el pH y por lo tanto no había conversión de la AFB₁ a sus metabolitos.

4. EXTRACCION DE LOS FOSFOLIPIDOS

Los fosfolípidos de maíz fueron extraídos según la metodología propuesta por MacRichie (1977).

Se empacó una columna (1 m de altura y 3 cm de diámetro) con silica gel (aproximadamente 20g), posteriormente la muestra de aceite se adsorbió en 1g de silica gel y se adicionó a la columna. La columna ya con los fosfolípidos adsorbidos fue lavado con cada solvente y se recogió la fracción metanol-agua fracción donde

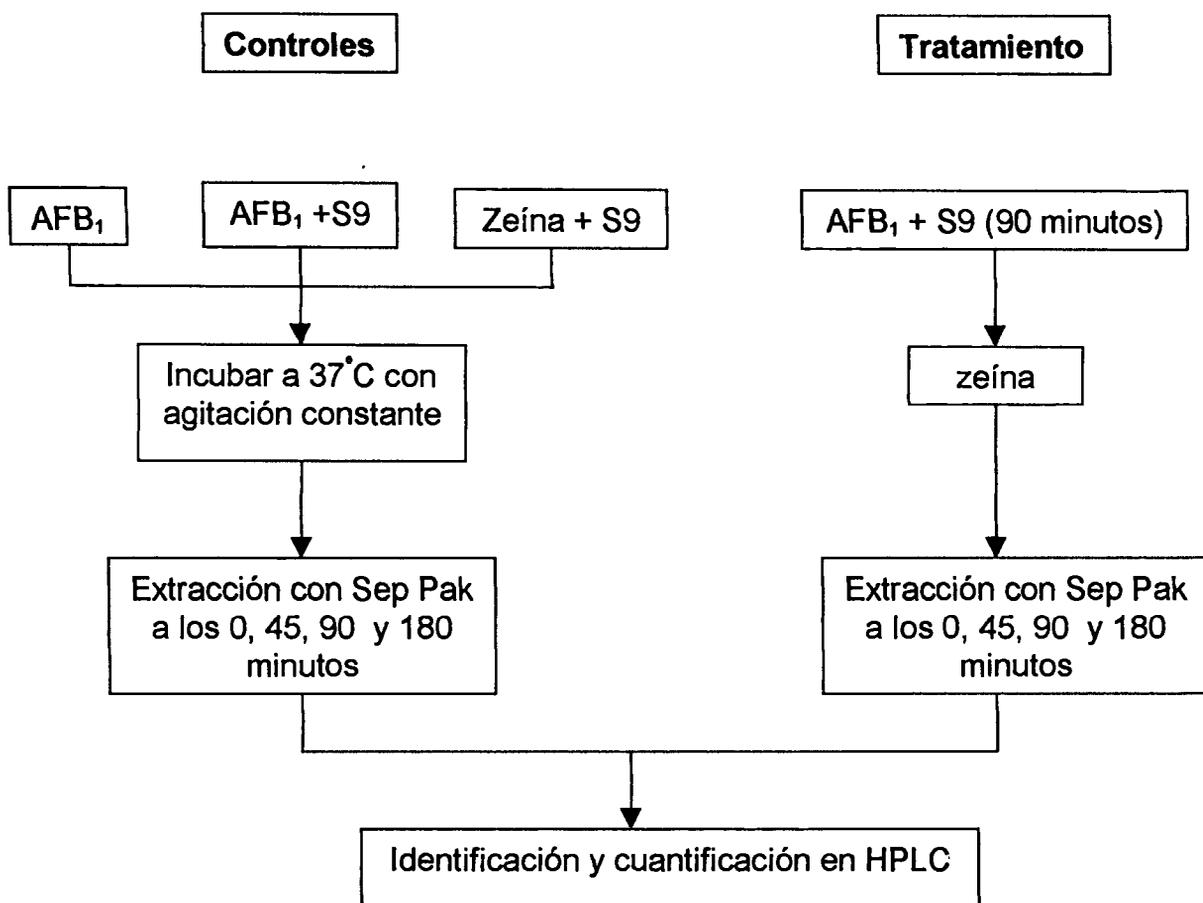


Figura 8. Diagrama de la interacción de los metabolitos de la AFB₁ con zeína

[AFB₁]=0.5µg/mL
 [Zeína]=50µg/mL
 [S9]=2 mg/mL

se extraen los fosfolípidos (Figura 9), posteriormente se evaporaron los solventes en un rotavapor. El eloato metanol-agua ya concentrado se almaceno a 4° protegiéndolo de la luz. El diseño del estudio de acomplejamiento lípido-AFB₁ se llevo a cabo como se ilustra en la Figura 10.

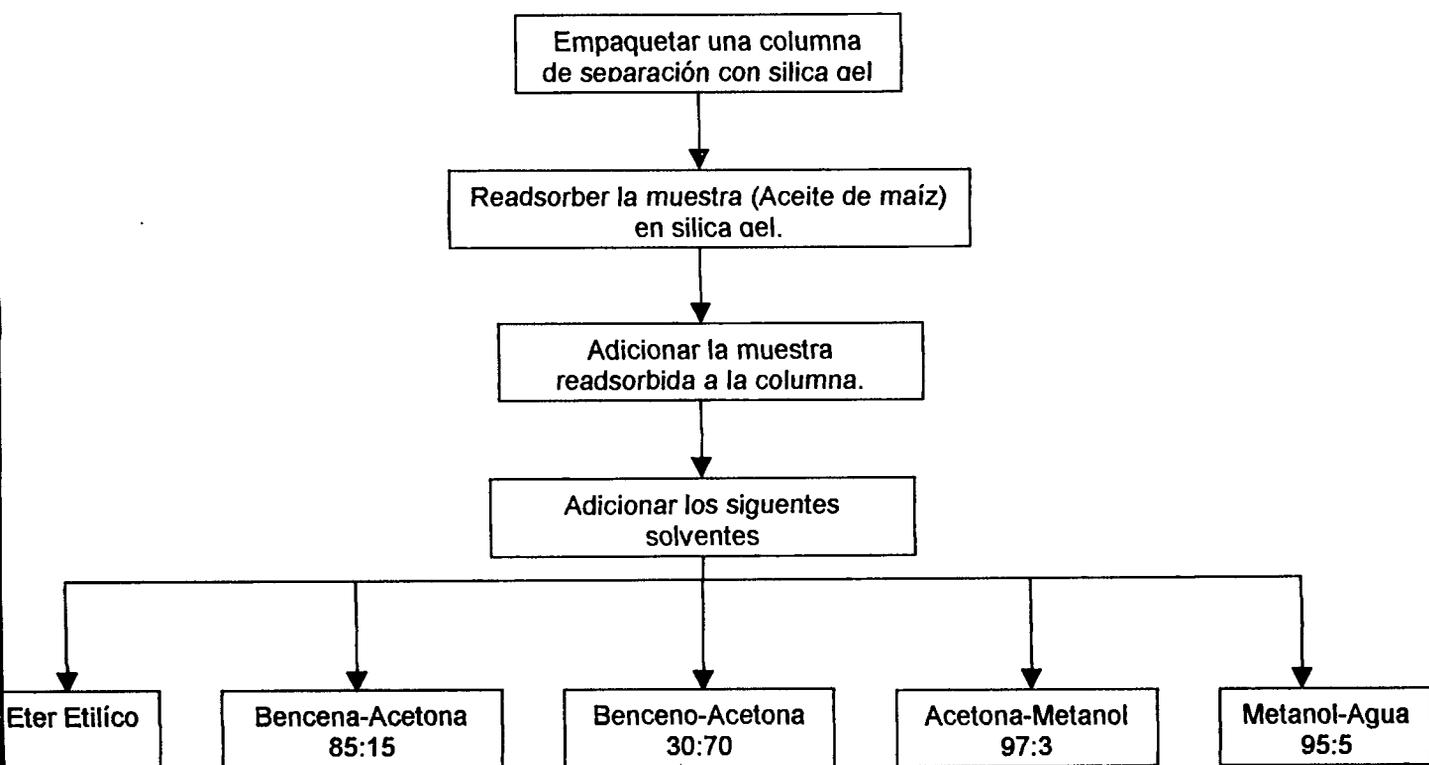


Figura 9. Obtención de la fracción de fosfolípidos

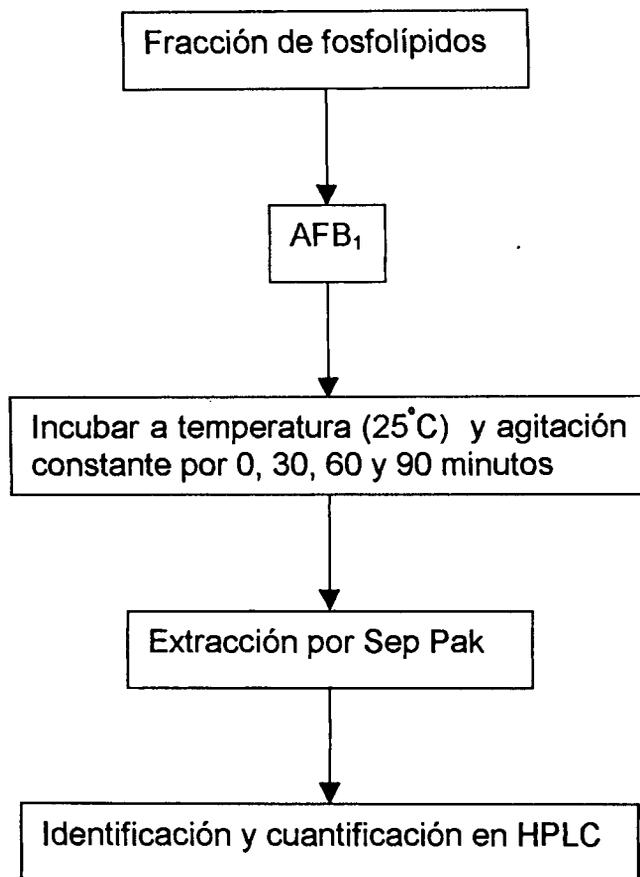


Figura 10. Diagrama de interacción de los fosfolípidos con AFB₁

VII. ANALISIS ESTADISTICO.

Para cada una de las pruebas con los componentes se realizó el siguiente diseño estadístico.

| | | |
|----------------------|----------------------|--------------------------|
| Experimento 1 | Factor 1 | Niveles |
| | Zeína | 0.5, 1.0 y 50 μ g/mL |
| | Factor 2 | Niveles |
| | Tiempo de incubación | 0, 30, 60 y 90 minutos |

| | | |
|----------------------|----------------------|--------------------------|
| Experimento 2 | Factor 1 | Niveles |
| | Almidón | 0.5, 1.0 y 50 μ g/mL |
| | Factor 2 | Niveles |
| | Tiempo de incubación | 0, 30, 60 y 90 minutos |

| | | |
|----------------------|----------------------|--------------------------|
| Experimento 3 | Factor 1 | Niveles |
| | Almidón Waxy | 0.5, 1.0 y 50 μ g/mL |
| | Factor 2 | Niveles |
| | Tiempo de incubación | 0, 30, 60 y 90 minutos |

| | | |
|----------------------|----------------------|--------------------------|
| Experimento 4 | Factor 1 | Niveles |
| | Fosfolípidos | 0.5, 1.0 y 50 μ g/mL |
| | Factor 2 | Niveles |
| | Tiempo de incubación | 0, 30, 60 y 90 minutos |

Donde el control fue la AFB₁ (0.5 μ g/mL) + solución amortiguadora para cada caso.

El diseño estadístico es bifactorial de 3X4, con dos repeticiones para cada experimento e igualmente para cada control. Se realizó para cada caso comparaciones de los diferentes tiempos vs control utilizando la prueba estadística de Tukey.

VIII. RESULTADOS Y DISCUSION

A. Solubilidad de la zeína

Con la finalidad de probar si la solubilidad de la zeína (propiedad funcional) tenía alguna influencia sobre el acomplejamiento de esta proteína con la AFB₁ se estudió su solubilidad a diferentes pH y los resultados se muestran en el Figura 11. Se observa que la prolamina fue soluble sólo en el amortiguador de pH=12, también se probaron diferentes concentraciones de zeína para comprobar su solubilidad en este amortiguador (Cuadro 9.). La zeína es soluble en alcoholes como el alcohol etílico absoluto así como en soluciones de etanol al 80%, isopropanol al 55%, (Moureaux, 1982).

Se realizaron pruebas para determinar la estabilidad de la AFB₁ en el amortiguador de pH=12 (Cuadro 10), y se determinó que a los 90 minutos de incubación de la AFB₁ en el amortiguador sólo se perdía un 80% del total de la micotoxina, para poder realizar el estudio de acomplejamiento zeína-AFB₁.

B. Interacción de la zeína con AFB₁

El acomplejamiento zeína-AFB₁ se estudió en 3 diferentes concentraciones de zeína (0.5, 1 y 50 µg/mL) es decir 1:1, 1:2 y 1:100, manteniendo constante la concentración de AFB₁. Los resultados para la relación 1:1 se muestran en la Figura 12; en ella se observa que no hay diferencia estadísticamente significativa (prueba de Tukey $\alpha=0.05$) entre el tratamiento y el control de AFB₁, lo que nos indica que no hay interacción bajo estas condiciones.

En la Figura 13 se muestra el efecto de la zeína a 1µg/mL sobre la concentración de AFB₁ relación 1:2 en ella se observa que hay diferencia estadísticamente significativa (prueba de Tukey $\alpha=0.05$) entre las concentraciones del control de la AFB₁ y la incubación de la AFB₁ con la zeína a partir del tiempo de incubación de 30 minutos, esto sugiere que pueda existir un complejo AFB₁/zeína no-covalente debido a que no se presenta en el cromatograma otro pico que no sea el de la AFB₁ como se mostrará más adelante.

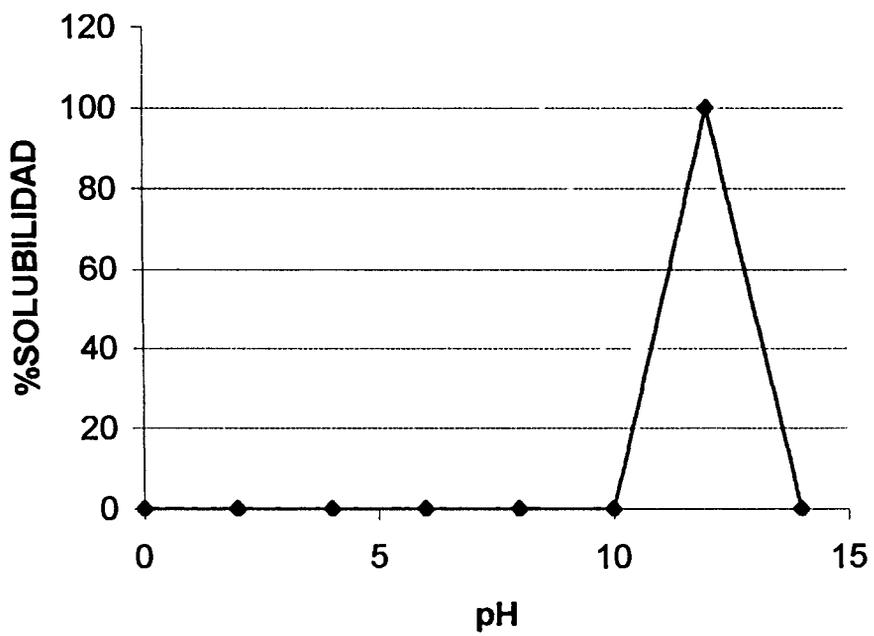


Figura 10. Solubilidad de la zeína en diferentes amortiguadores de pH.
[zeína]=1 μ M

Cuadro 9. Solubilidad de zeína en solución amortiguadora pH=12.

| [zeína (M)] | Solubilidad |
|-------------|-------------|
| 1 | + |
| 10 | + |
| 100 | + |

Cuadro 10. Estabilidad de la AFB₁ en el amortiguador pH=12

| Tiempo de incubación | Promedio | Disminución (%) |
|-----------------------------|--------------------|------------------------|
| 0 | 0.925 ^a | 100 |
| 30 | 0.845 ^a | 99.20 |
| 60 | 0.760 ^a | 89.22 |
| 90 | 0.694 ^a | 81.48 |
| Control de AFB1(PBS) | 0.852 ^a | |

Cada punto representa la media de dos repeticiones. Letras diferentes (por columna) indica diferencia estadísticamente significativa

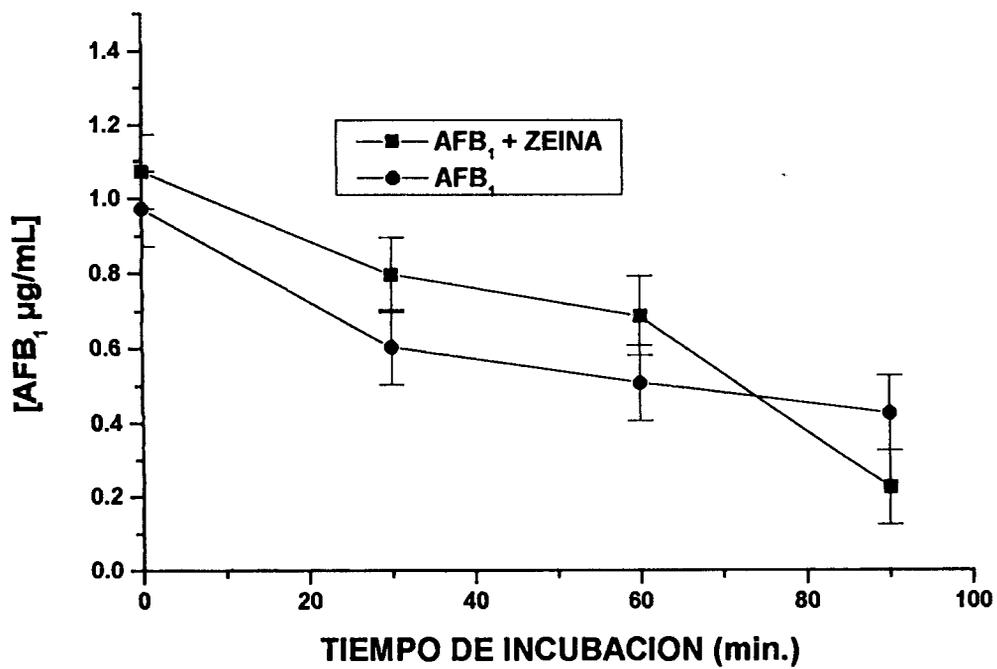


Figura 12. Efecto de la Zeína sobre la concentración de AFB₁ (1:1)
 [Zeína]=0.5µg/mL en amortiguador de KCl y NaOH pH=12
 [AFB₁]=0.5µg/mL en amortiguador de KCl y NaOH pH=12
 Se hizo la mezcla y se incubó a 25°C. Cada punto representa la media de dos repeticiones y su intervalo producido por la prueba de Tukey.

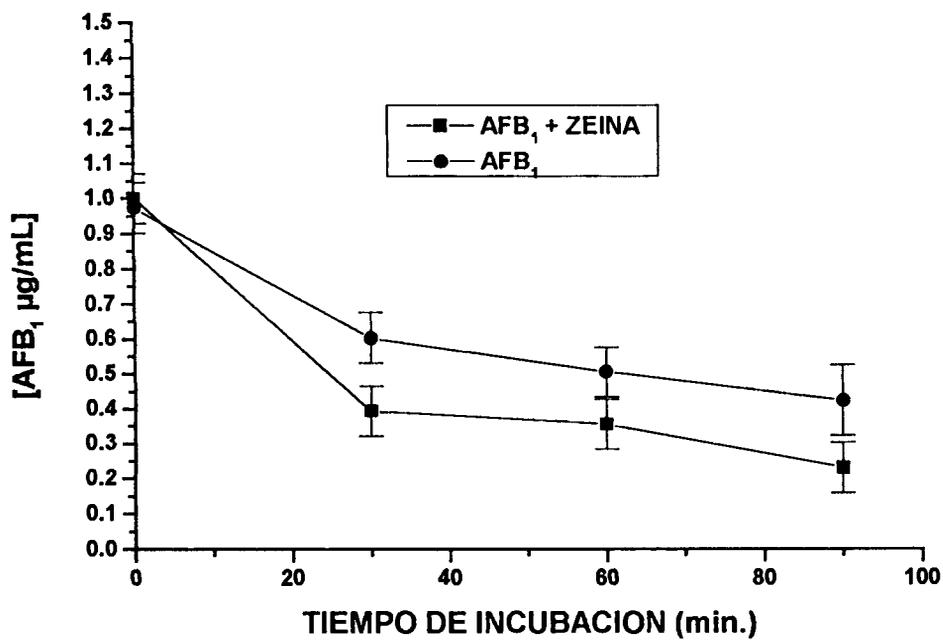


Figura 13. Efecto de la Zeína sobre la concentración de AFB₁ (2:1)
 [Zeína]=1µg/mL en amortiguador de KCl y NaOH pH=12
 [AFB₁]=0.5µg/mL en amortiguador de KCl y NaOH pH=12
 Se hizo la mezcla y se incubó a 25°C. Cada punto representa la media de dos repeticiones y su intervalo producido por la prueba de Tukey.

La Figura 14 presenta el efecto de la zeína sobre la concentración de AFB₁ en la relación 1:100, en ella se observa que existe una disminución en la concentración (estadísticamente significativa; prueba de Tukey $\alpha=0.05$) de la AFB₁ cuando está presente la zeína, lo que sugiere al igual que en la anterior figura una posible interacción de la AFB₁ con la zeína.

Consideremos la relación mol a mol de zeína/AFB₁ en la proporción 1:100, considerando el peso de la prolamina en 38 000 Da y el peso molecular de la AFB₁ de 312 g/mol, obteniéndose una molaridad de 1.60×10^{-09} para la AFB₁, mientras para la zeína es de 1.31×10^{-09} , por lo que el número de moles es muy semejante y por lo tanto la posibilidad de interactuar entre ellas aumenta, reflejándose en la concentración de 100:1 donde desde un inicio la AFB₁ empieza a interaccionar con la zeína, mientras que en la concentración de 2:1 necesita de un determinado tiempo para poder interaccionar.

En la Figura 15 se presenta un cromatograma representativo obtenido de la incubación de la AFB₁ y la zeína (tiempo de incubación 90 minutos; concentración 1:100); en él se observa sólo un pico que corresponde al de AFB₁ en un tiempo de retención de 5.5 minutos. El cromatograma del control de AFB₁ se muestra en la Figura 16. Al comparar las figuras 15 y 16 se puede observar la disminución en el área bajo la curva del pico característico de la AFB₁ al adicionar la zeína con respecto al control de AFB₁, No se observa ningún pico adicional al de la AFB₁ al estar presente la zeína; por lo que solo hay disminución en la concentración y por lo tanto esta disminución es debido al acomplejamiento de la AFB₁ con la zeína. No se presenta otro pico adicional debido a que el complejo puede quedar atrapado en la columna empleada para la extracción y la purificación; lo que podría explicar que el probable complejo formado quede atrapado en la columna, o bien se puede sugerir que el complejo es de tipo no covalente (interacciones hidrostáticas) y por lo tanto no se observe un pico adicional.

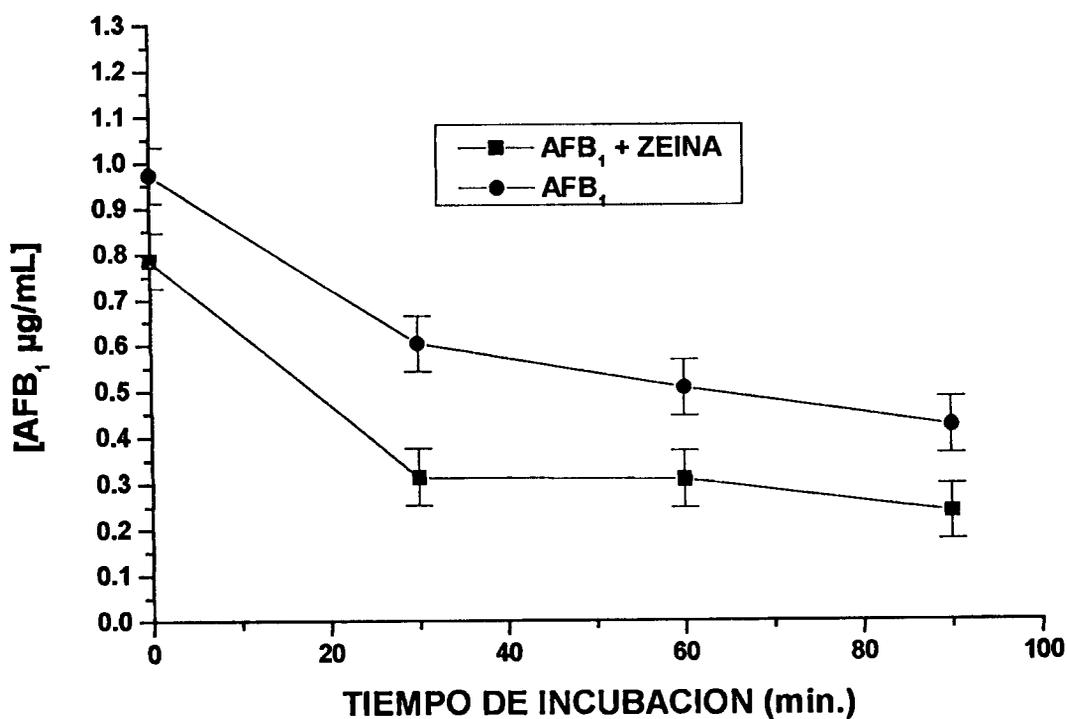


Figura 14. Efecto de la Zeína sobre la concentración de AFB₁ (100:1)
 [Zeína]=50µg/mL en amortiguador de KCl y NaOH pH=12
 [AFB₁]=0.5µg/mL en amortiguador de KCl y NaOH pH=12
 Se hizo la mezcla y se incubó a 25°C. Cada punto representa la media de dos repeticiones y su intervalo producido por la prueba de Tukey.

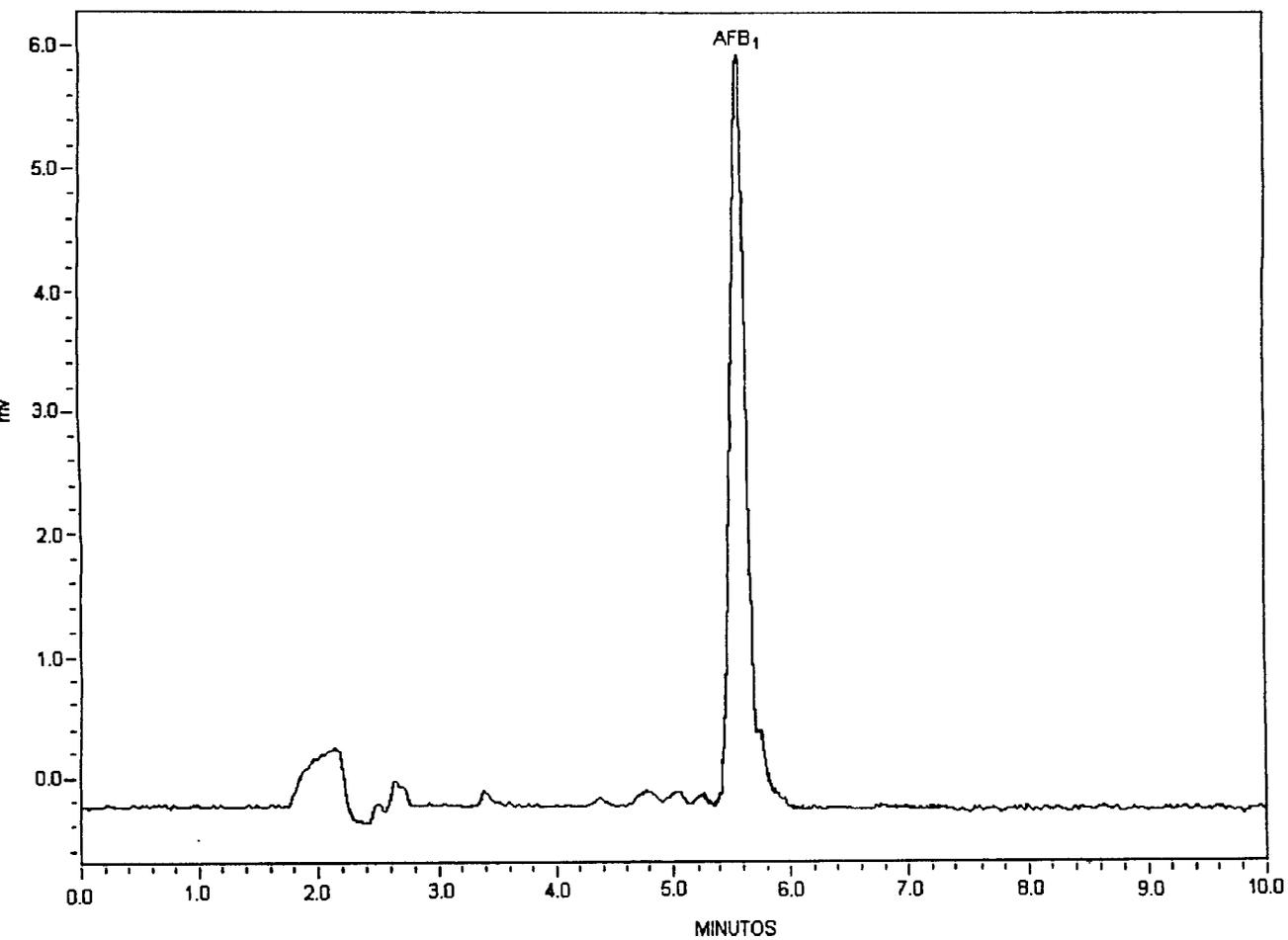


Figura 15. Cromatograma de incubación de AFB₁ y zeína (tiempo de incubación 90 minutos) (HPLC).

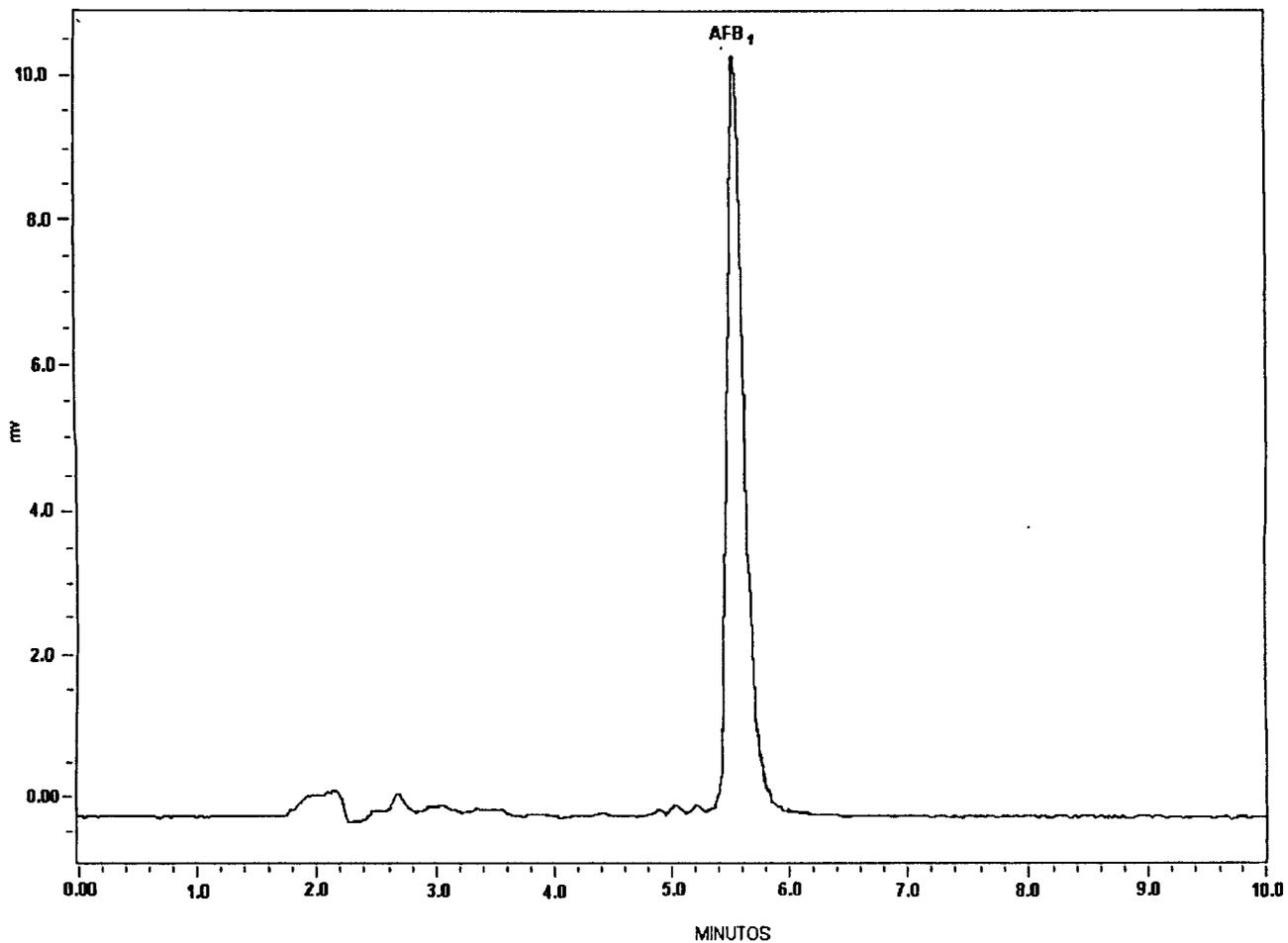


Figura 16. Cromatograma del control de AFB₁ (tiempo de incubación 90 minutos) (HPLC).

La interacción de la AFB₁ con otras moléculas ya ha sido demostrada; por ejemplo la interacción de esta micotoxina con proteínas como la albúmina del suero sanguíneo (Dirr y Schabert, 1986). Otra interacción es la que tiene esta toxina con glutatión (agente reductor), un péptido que participa en la eliminación del metabolito más tóxico de la AFB₁ el 8,9- AFB₁ epóxido en esta interacción se observa que el aminoácido que participa en la unión del glutatión con el epóxido es la cisteína (aminoácido azufrado) y la unión ocurre con el grupo sulfhidrilo (Figura 17), lo que nos lleva a pensar que posiblemente la AFB₁ se una a los aminoácidos azufrados de la zeína.

C. Interacción de la zeína con metabolitos de la AFB₁

En el Cuadro 11 se presenta los resultados obtenidos del efecto de la zeína sobre la concentración de los metabolitos de la AFB₁. Se obtuvieron dos metabolitos el 8, 9-dihidrodiol-AFB₁ y AFM₁ cuyas estructuras se muestran en la Figura 18. Las concentraciones de estos metabolitos fue pequeña, es decir, que la conversión de la AFB₁ en sus metabolitos fue baja, en el cuadro observamos que hay diferencia estadísticamente significativa (prueba de Tukey; $\alpha=0.05$) en la concentración de la AFB₁ a partir del tiempo de incubación de 135 minutos en el tratamiento donde tenemos en contacto la AFB₁-S9-zeína. Cabe recordar que la zeína fue adicionada a partir de los 90 minutos por lo que hay una disminución en la concentración de la AFB₁, esta disminución se puede deber a la interacción de zeína con la AFB₁ ya que, como se vió previamente, esta prolamina puede interactuar con la micotoxina y además la concentración utilizada de 100:1 por lo tanto la posibilidad de interactuar es mayor.

Respecto a la interacción de la zeína sobre la concentración del 8,9-dihidrodiol AFB₁, se observa que existe diferencia estadísticamente significativa a partir de que se adiciona la zeína (90 minutos) esto se puede deber a dos razones: que la zeína está interactuando directamente con este metabolito, y que de la metabolización de la AFB₁ se produzca el 8, 9- AFB₁epóxido y sea este metabolito el que interactue con la zeína, pero debido a su inestabilidad en soluciones acuosas la fracción que no

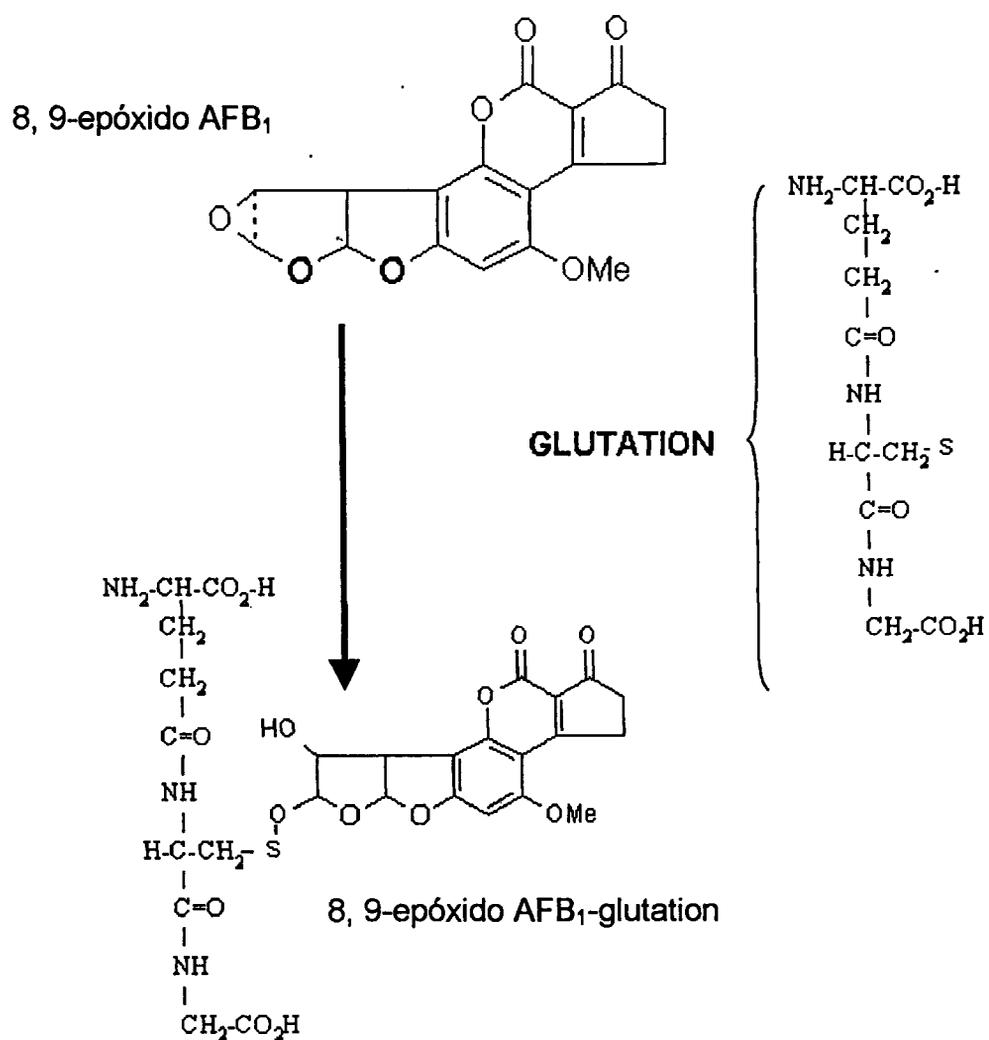


Figura 17. Reacción de acomplejamiento del 8, 9-epóxido AFB₁ [Yourtee y Kirk, 1989].

Cuadro 11. Interacción de la zeína con los metabolitos de la AFB₁

| | Control (AFB ₁) | AFB ₁ + S9 | AFB ₁ + S9 + Zeína |
|--------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Tiempo (min.) | | | |
| [AFB₁ µg/mL] | | | |
| 0 | 0.839 ± 0.093 ^a | 0.695 ± 0.004 ^a | 0.665 ± 0.083 ^a |
| 45 | 0.927 ± 0.033 ^a | 0.753 ± 0.129 ^{ab} | 0.654 ± 0.055 ^b |
| 90 | 0.939 ± 0.041 ^a | 0.856 ± 0.075 ^{ab} | 0.698 ± 0.032 ^b |
| [Dihidrodiol µg/mL] | | | |
| 0 | < L. D. | 0.0037 ± 0.00002 ^a | 0.0032 ± 0.00021 ^a |
| 45 | < L. D. | 0.0047 ± 0.00440 ^a | 0.0037 ± 0.00020 ^b |
| 90 | < L. D. | 0.0046 ± 0.00048 ^a | 0.0041 ± 0.00014 ^b |
| [AFM₁ µg/mL] | | | |
| 0 | < L. D. | 0.0104 ± 0.00003 ^a | 0.0104 ± 0.0010 ^a |
| 45 | < L. D. | 0.0156 ± 0.00190 ^a | 0.0148 ± 0.0011 ^a |
| 90 | < L. D. | 0.0207 ± 0.00029 ^a | 0.0207 ± 0.0012 ^a |

[Zeína]=50µg/mL en PBS

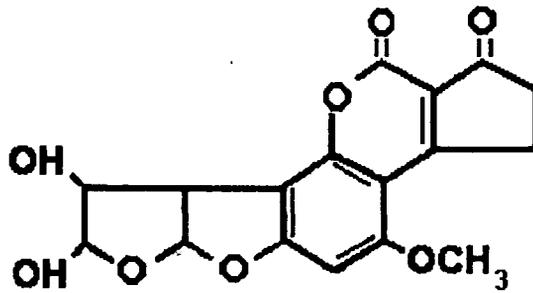
[AFB₁]=0.5µg/mL en PBS

[S9]=100µg/ml, fracción microsomal de hígado de rata

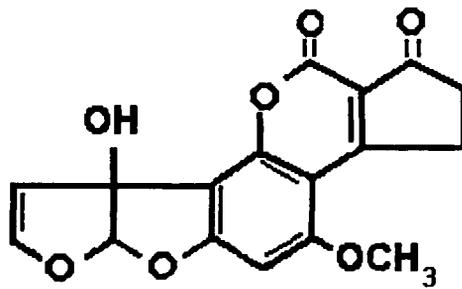
Se hizo la mezcla y se incubó a 36°C. Cada punto representa la media de dos repeticiones y su desviación estándar.

< L. D =menor al límite de detección

Letras diferentes (por renglón) indica diferencia estadísticamente significativa.



8,9-DIHIDRODIOL AFB₁



AFM₁

Figura 18. Estructura de algunos metabolitos de la AFB₁ (Eaton, 1994)

interactúa con la zeína se convierte rápidamente en el 8, 9-dihidrodiol AFB₁ que es el metabolito que estamos cuantificando.

En los que se refiere al efecto en la concentración sobre la AFM₁, la presencia de zeína no modificó la concentración de AFB₁, lo que sugiere que no hay una interacción entre ellos. En la Figura 19 se muestra el cromatograma obtenido de la metabolización de la AFB₁ a los 90 minutos, en ella se pueden observar los picos de la AFB₁, (tiempo de retención 5.5 minutos), la AFM₁ (tiempo de retención de 3.48 minutos) y el 8, 9-dihidrodiol AFB₁ (tiempo de retención de 2.76 minutos).

D. Interacción del almidón con AFB₁

Para esta sección se utilizaron dos clases de almidón. Primeramente se presenta los resultados obtenidos con almidón de maíz con proporciones normales de amilopectina y amilosa, posteriormente con almidón de maíz ceroso o waxy donde la proporción de amilopectina es de más del 99% conteniendo sólo trazas de amilosa. Se decidió hacer estos dos tipos de experimentos para poder determinar si la amilopectina, que es la cadena ramificada de glucosa, es capaz de interaccionar con la AFB₁ y poder atraparla.

En la Figura 20 se muestra el efecto del almidón sobre la concentración de AFB₁ en una relación de 1:1. Se observa que no existe diferencia estadísticamente significativa (Prueba de Tukey; $\alpha=0.05$) entre los controles de la AFB₁ y la incubación de AFB₁+almidón lo que sugiere que no existe una interacción entre estos componentes en estas condiciones.

El efecto del almidón sobre la concentración de la AFB₁ en una relación 2:1 (Figura 21), tampoco tuvo diferencia estadísticamente significativa (Prueba de Tukey; $\alpha=0.05$).

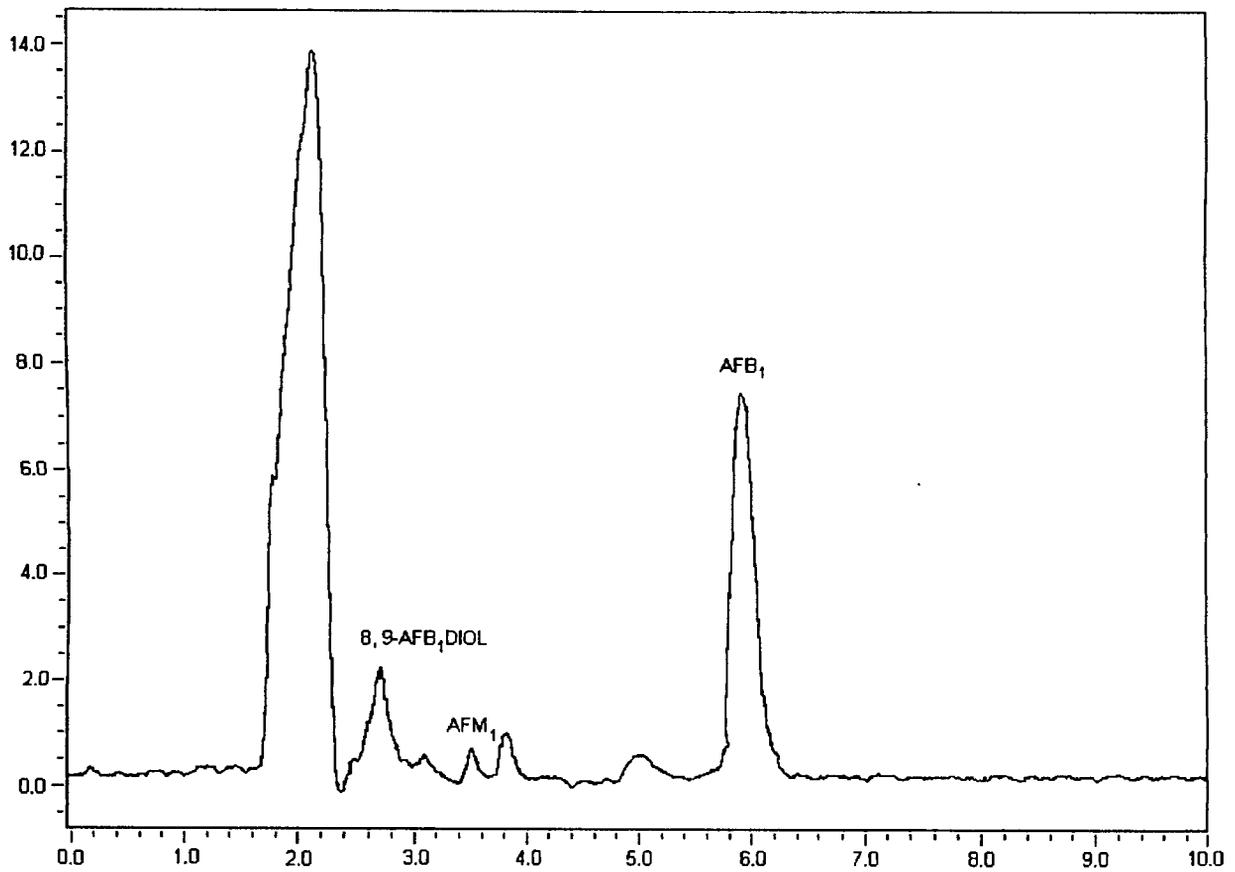


Figura 19. Cromatograma de los metabolitos de la AFB₁ tiempo de incubación de 90 minutos.

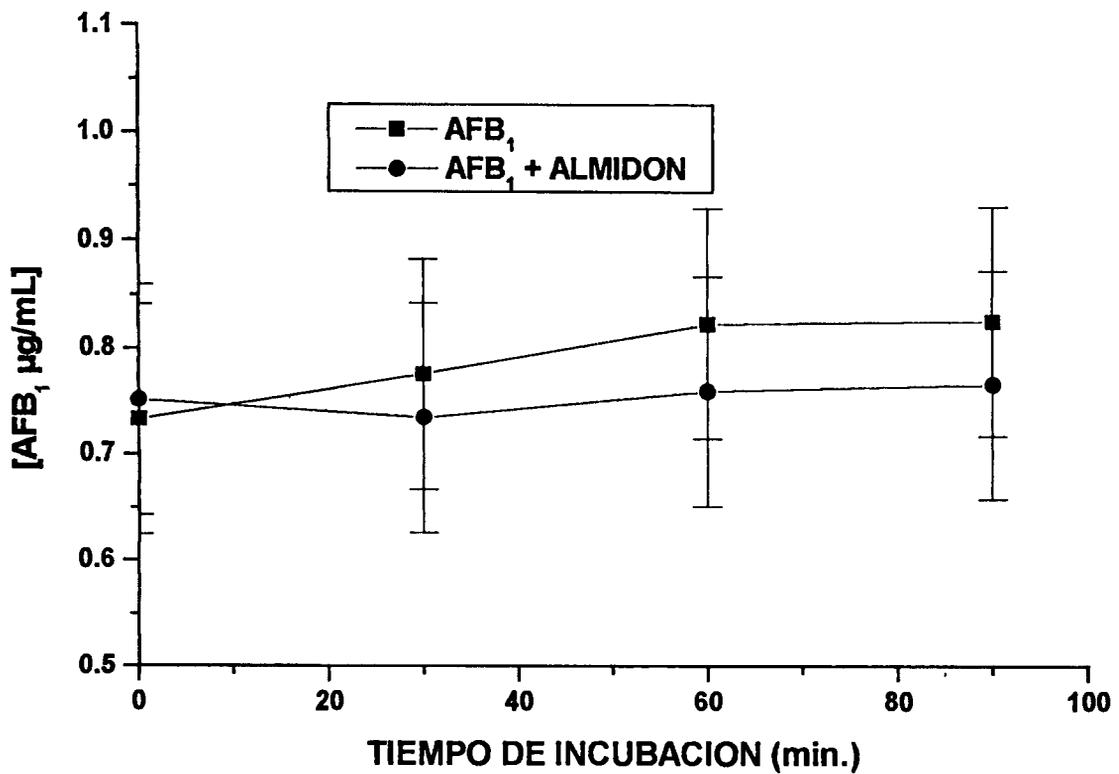


Figura 20. Efecto de la almidón sobre la concentración de AFB₁ (1:1)
 [Almidón]=0.5µg/mL en PBS
 [AFB₁]=0.5µg/mL en PBS
 Se hizo la mezcla y se incubo a 25°C. Cada punto representa la media de dos repeticiones y su intervalo producido por la prueba de Tukey.

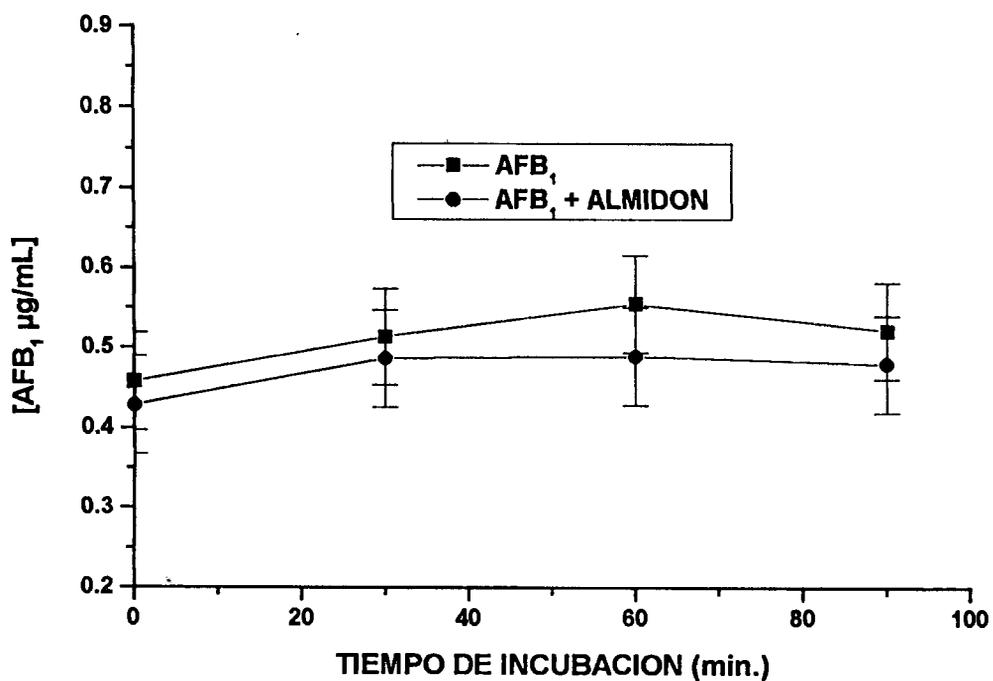


Figura 21. Efecto de la almidón sobre la concentración de AFB₁ (2:1)
 [Almidón]=1µg/mL en PBS
 [AFB₁]=0.5µg/mL en PBS
 Se hizo la mezcla y se incubo a 25°C. Cada punto representa la media de dos repeticiones y su intervalo producido por la prueba de Tukey.

Asimismo en la Figura 22 muestra el efecto del almidón sobre la concentración de la AFB₁ en una relación de 100:1, no observándose diferencia estadísticamente significativa (Prueba de Tukey; $\alpha=0.05$).

Resultados que sugieren que a las condiciones probadas la AFB₁ no interaccionó con el almidón. En el cromatograma no se presentó ningún otro pico adicional al de la AFB₁ que no pudiera indicar interacción (Figura 23).

En cuanto a los resultados obtenidos con almidón waxy se presentan en las Figuras 24 a la 26 y no se encontró diferencia estadísticamente significativa (Prueba de Tukey; $\alpha=0.05$) entre el tratamiento AFB₁ + almidón y el control de AFB₁. Las proporciones de AFB₁ y almidón waxy fueron iguales que las utilizadas con el almidón de maíz normal y AFB₁. La diferencia en cuanto a la composición química de ambos almidones no afectó la concentración de la AFB₁.

En los cromatogramas de AFB₁ no se observa que exista un pico adicional (Figura 27) en la incubación de almidón waxy y AFB₁. Se realizó una búsqueda bibliográfica y no se encontró ningún estudio sobre la interacción de la AFB₁ y el almidón por lo que hace que este trabajo sea importante en el estudio de las interacciones de la AFB₁. Como ya se describió anteriormente es bien conocida la interacción de la AFB₁ con ADN, ARN y proteínas. En un trabajo realizado por Verma *et al.*, (1999) describen la interacción de la aflatoxina con L-ácido ascórbico, su cinética y mecanismo, en el se describe como el ácido ascórbico es capaz de interaccionar con la AFB₁ y al convertirla en AFB₂, y así reducir la AFB₁. Trabajo que describe la interacción de la AFB₁ con otros componentes además de proteínas, ADN y ARN.

E. Interacción de los fosfolípidos con AFB₁

El efecto de los fosfolípidos sobre la concentración de la AFB₁ en relación 1:1 se muestra en la Figura 28; en ella se puede observar que no hay diferencia estadísticamente significativa (Prueba de Tukey; $\alpha=0.05$) entre los controles y la

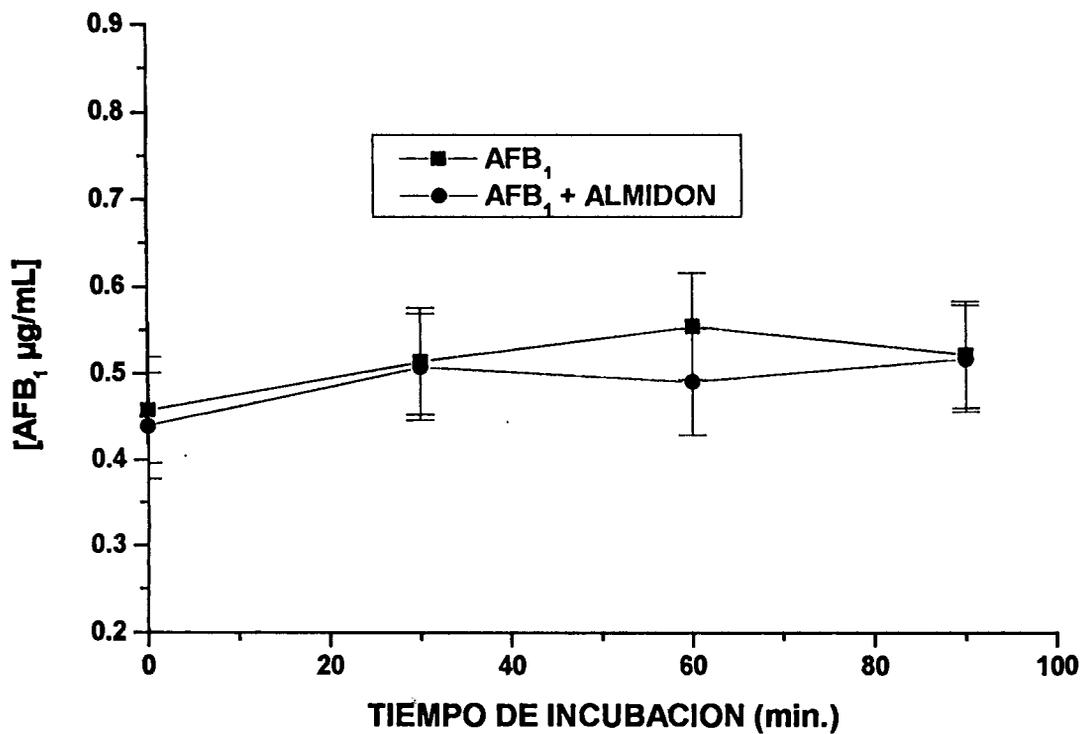
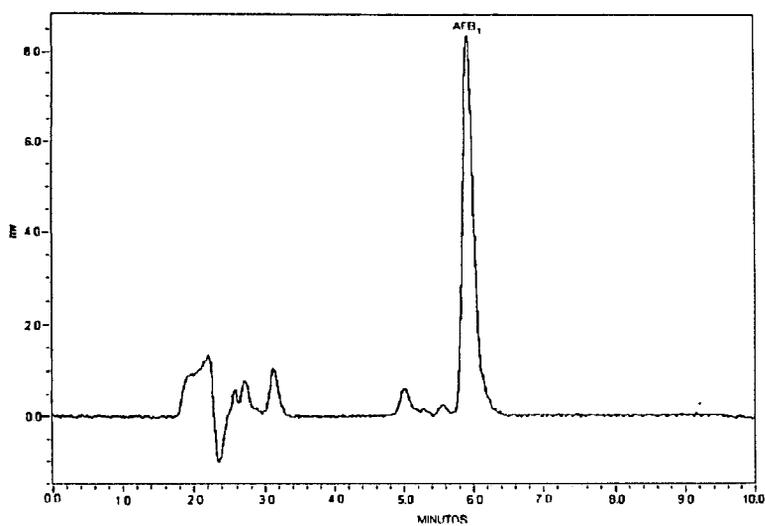


Figura 22. Efecto de la almidón sobre la concentración de AFB₁ (100:1)
 [Almidón]=50µg/mL en PBS
 [AFB₁]=0.5µg/mL en PBS
 Se hizo la mezcla y se incubo a 25°C. Cada punto representa la media de dos repeticiones y su intervalo producido por la prueba de Tukey.

a)



b)

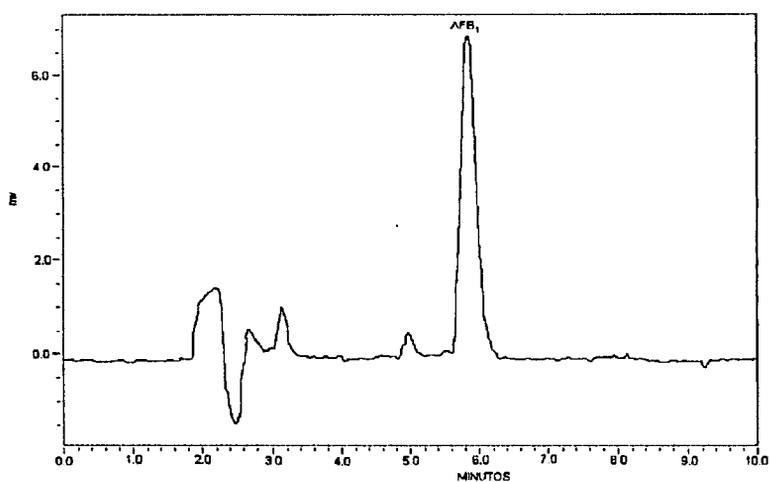


Figura 23. a) Cromatograma de la AFB₁ cuando esta en contacto con el almidón (tiempo de incubación de 90 minutos). b) Cromatograma del control de AFB₁ (HPLC).

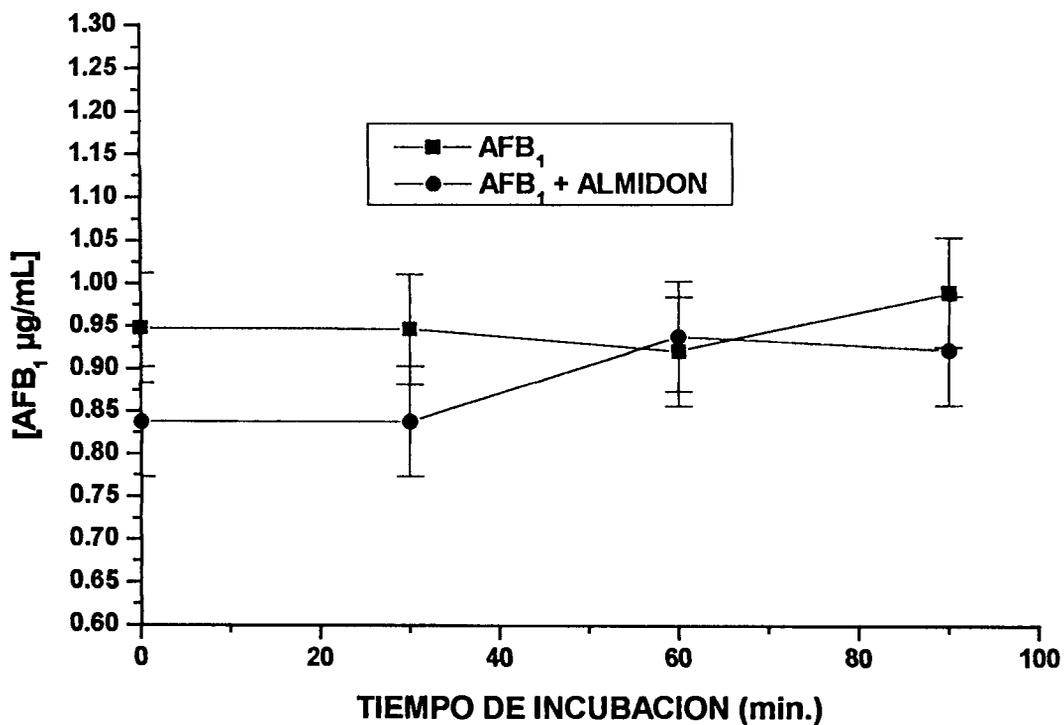


Figura 24. Efecto de la almidón waxy sobre la concentración de AFB₁ (1:1)
 [Almidón]=0.5µg/mL en PBS
 [AFB₁]=0.5µg/mL en PBS
 Se hizo la mezcla y se incubo a 25°C. Cada punto representa la media de dos repeticiones y su intervalo producido por la prueba de Tukey.

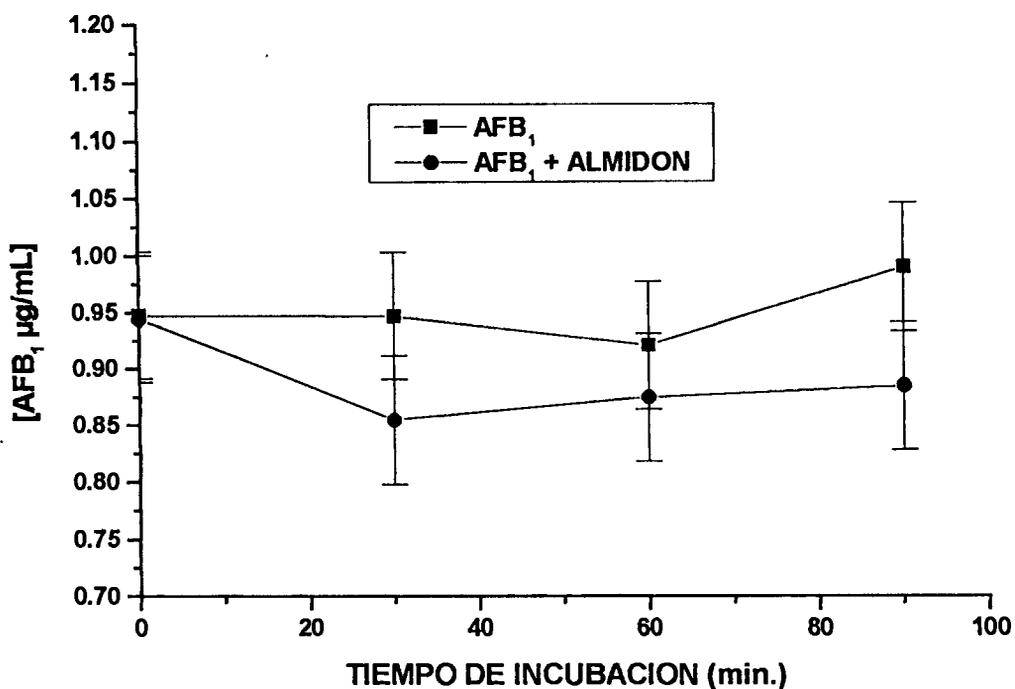


Figura 25. Efecto de la almidón waxy sobre la concentración de AFB₁ (2:1)
 [Almidón]=1 µg/mL en PBS
 [AFB₁]=0.5 µg/mL en PBS
 Se hizo la mezcla y se incubó a 25°C. Cada punto representa la media de dos repeticiones y su intervalo producido por la prueba de Tukey.

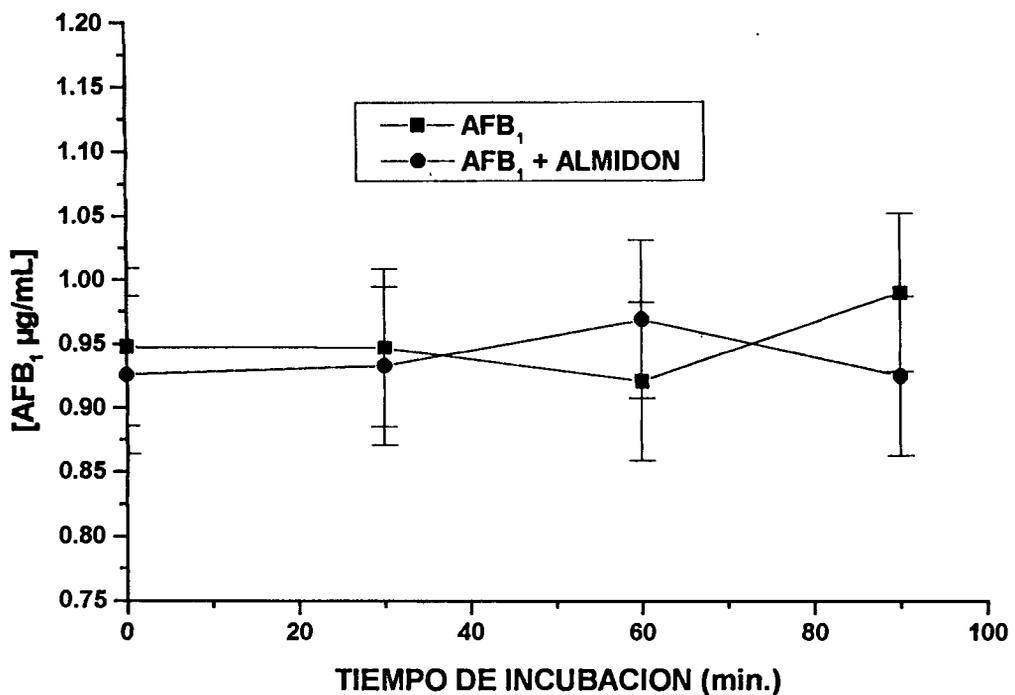
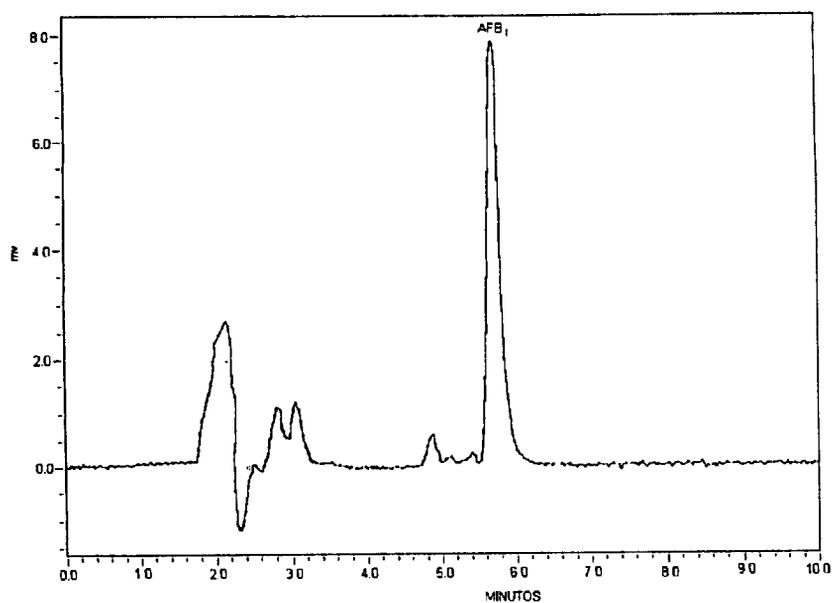


Figura 26. Efecto de la almidón waxy sobre la concentración de AFB₁ (100:1, [Almidón]=1 µg/mL en PBS [AFB₁]=0.5 µg/mL en PBS Se hizo la mezcla y se incubó a 25°C. Cada punto representa la media de dos repeticiones y su intervalo producido por la prueba de Tukey.

a)



b)

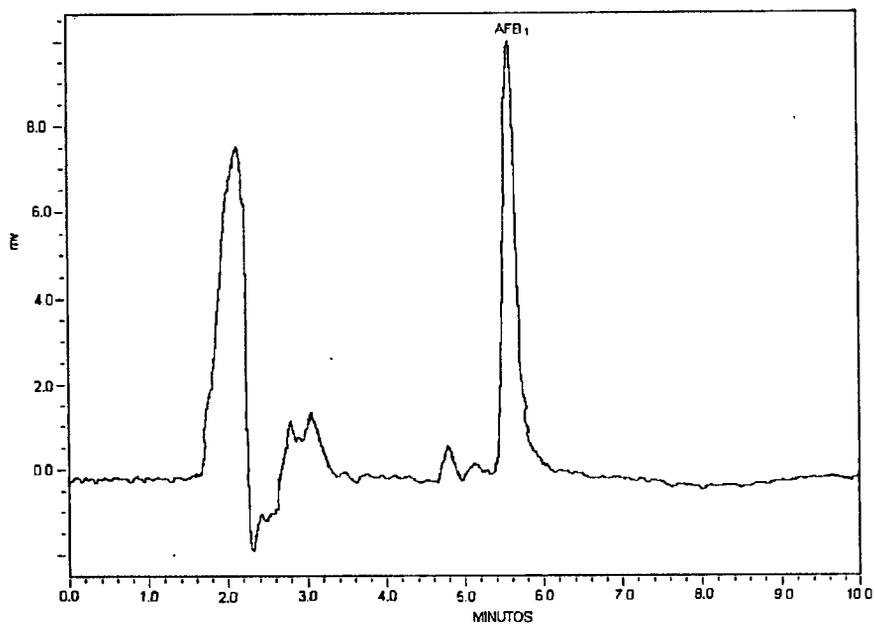


Figura 27. a) Cromatograma de incubación de AFB₁ y almidón waxy (tiempo de incubación 90 minutos). b) Cromatograma control de AFB₁ (HPLC).

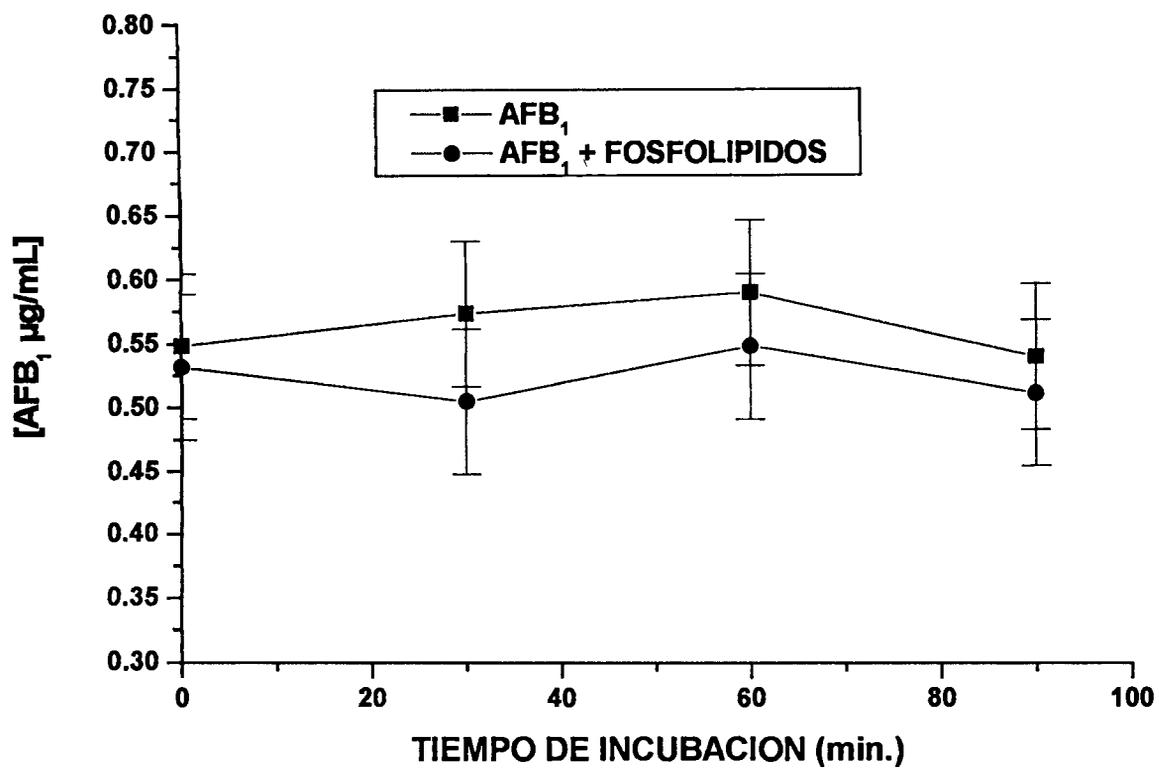


Figura 28. Efecto de los fosfolípidos sobre la concentración de AFB₁ (1:1)
 [Fosfolípidos]=0.5µg/mL en metanol
 [AFB₁]=0.5µg/mL en metanol
 Se hizo la mezcla y se incubó a 25°C. Cada punto representa la media de dos repeticiones y su intervalo producido por la prueba de Tukey.

incubación de la AFB₁ + fracción de los fosfolípidos, por lo tanto se puede sugerir la no interacción de AFB₁ y fosfolípidos.

En la Figura 29 se presenta el efecto de los fosfolípidos sobre la concentración de AFB₁ en una relación 2:1 y en la Figura 30 la relación 100:1. Ambos resultados muestran que no existe diferencia estadísticamente significativa (Prueba de Tukey; $\alpha=0.05$). En la Figura 31 se muestra uno de los cromatogramas obtenidos de la incubación de la AFB₁ y los fosfolípidos, al igual que en el caso de zeína-almidón no hay otro pico que nos indique alguna interacción entre ellos.

Los fosfolípidos poseen una cabeza polar, además de sus colas hidrocarbonadas no polares reciben el nombre de lípidos anfipáticos o polares (Lehninger, 1993), debido a esta propiedad se eligió esta clase de lípidos para realizar las pruebas de interacción de la AFB₁, por ser más reactivos que los triglicéridos debido que contiene un grupo fosfato que hace que tenga mayor interacción con otros componentes. Como sucedió con el almidón se sugiere que no hay interacción de la AFB₁ con los fosfolípidos a las condiciones probadas. En la bibliografía no se encontró ningún dato sobre interacción de la AFB₁ con los fosfolípidos, por lo que hace a este trabajo importante sobre las posibles interacciones de la AFB₁.

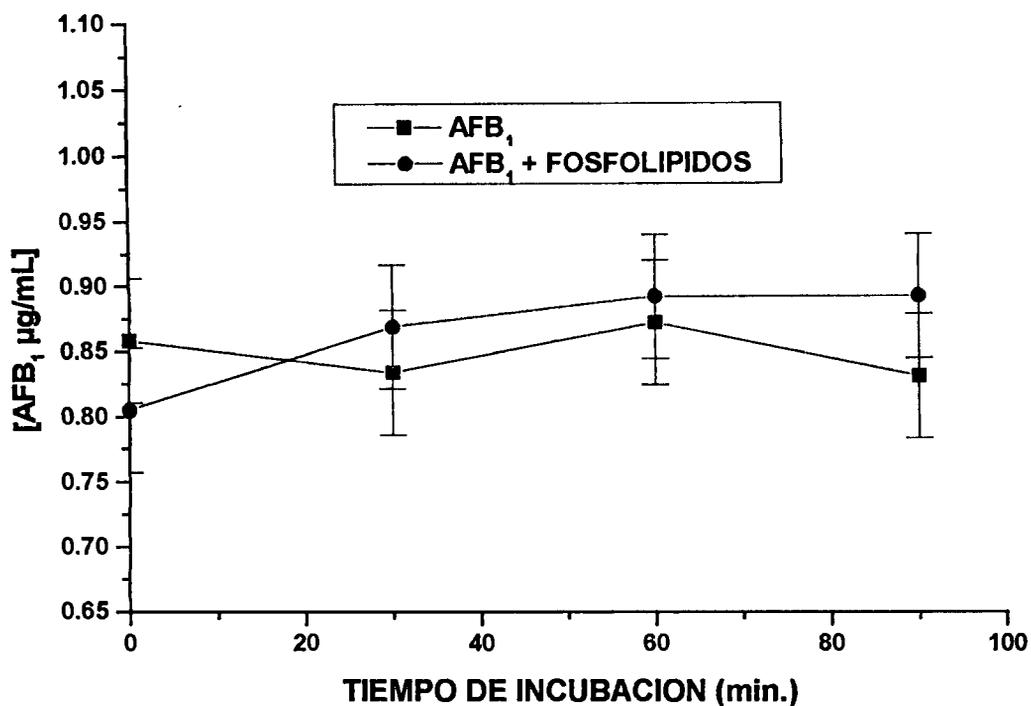


Figura 29. Efecto de los fosfolípidos sobre la concentración de AFB₁ (2:1)
 [Fosfolípidos]=1 µg/mL en metanol
 [AFB₁]=0.5 µg/mL en metanol
 Se hizo la mezcla y se incubó a 25°C. Cada punto representa la media de dos repeticiones y su intervalo producido por la prueba de Tukey.

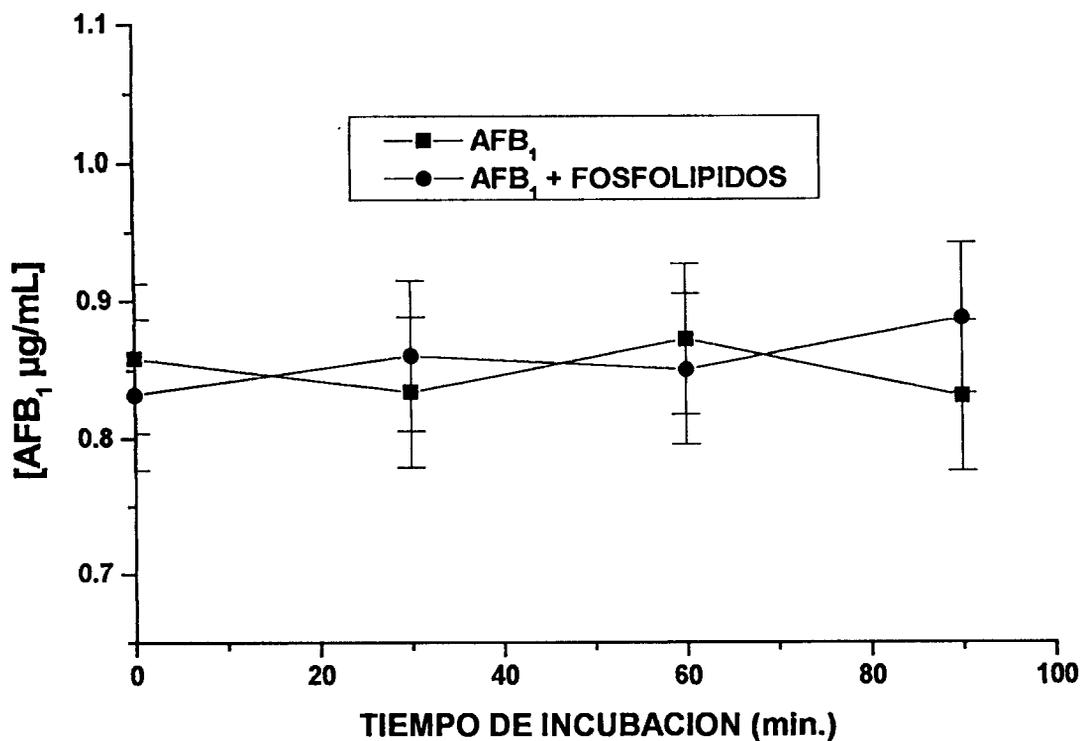
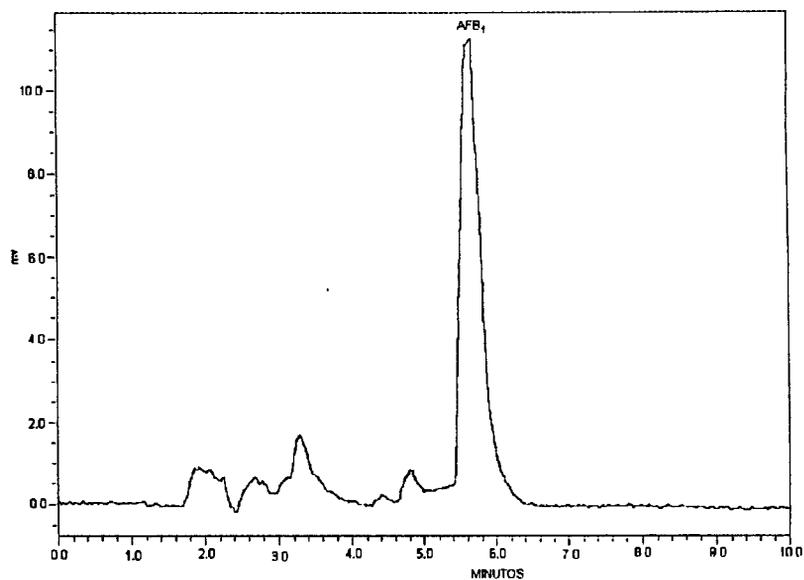


Figura 30. Efecto de los fosfolípidos sobre la concentración de AFB₁ (100:1)
 [Fosfolípidos]=50µg/mL en metanol
 [AFB₁]=0.5µg/mL en metanol
 Se hizo la mezcla y se incubó a 25°C. Cada punto representa la media de dos repeticiones y su intervalo producido por la prueba de Tukey.

a)



b)

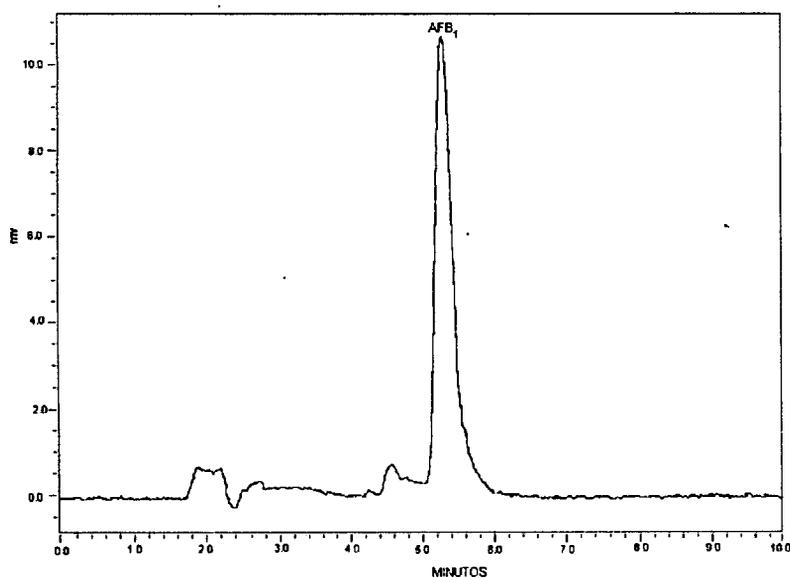


Figura 31. Cromatograma de incubación de AFB₁ y los fosfolípidos (tiempo de incubación 90 minutos). b) Cromatograma control de AFB₁ (HPLC).

IX. CONCLUSIONES

La zeína (prolamina) sólo resultó ser soluble en un amortiguador de pH=12.

De los componentes de maíz probados (zeína, almidón y fosfolípidos) sólo la zeína tuvo efecto sobre la concentración de AFB₁, lo que sugiere una posible interacción de la micotoxina con la proteína.

Las relaciones Zeína/AFB₁ 2:1 y 100:1 lograron la reducción de AFB₁ lo que sugiere una posible interacción entre AFB₁-Zeína (no covalente).

La Zeína (2:1) disminuyó la concentración de 8, 9-AFB₁-dihidrodiol (metabolito de AFB₁), lo que sugiere que esta prolamina es capaz de interactuar con los metabolitos de la AFB₁.

El almidón no presentó efecto sobre la concentración de AFB₁ (a las relaciones probadas), lo que sugiere que no existe ninguna interacción entre ellos.

El almidón waxy (ceroso) con un 99.6% de amilopectina no presentó interacción con la AFB₁ a las condiciones probadas.

La fracción de los fosfolípidos obtenidos, no presentó formación de complejos con la AFB₁ a las condiciones probadas.

X. REFERENCIAS

Aldrich S. R. y Leng E. R. 1974. Producción moderna del maíz. Hemisferio sur (Ed), México, pag. 9.

Betina, V. 1989a. Bioquimical modes of action of mycotoxins. Chap. 3, in *Micotoxins, Chemical, biological and environmental aspects*, V., Betina (Ed), Elsevier. Amsterdam-Oxford-New York-Tokyo.

Betina, V. 1989b. Bioquimical modes of action of mycotoxins: Chap. 4, en *Micotoxins, Chemical, biological and environmental aspects*, V., Betina (Ed), Elsevier. Amsterdam-Oxford-New York-Tokyo.

Boyer, C.D. and Shannon, J.C. 1987. Carbohydrates of the kernel. En S.A. Watson y P. E. Ramstad, (Eds). *Corn : chemistry and technology*, p. 253-272. St Paul, Minn., EE.UU., Am. Assoc. Cereal Chem.

Bressani, R. 1990. Chemistry, technology and nutritive value of maize tortillas. *Food Rev. Int.* 6: 225-264.

Bressani, R. and Mertz, E.T. 1958. Studies on corn protein. IV. Protein and amino acid content of different corn varieties. *Cereal Chem.*, 35: 227-235.

Bressani, R., Breuner, M. and Ortiz, M.A. 1989. Contenido de fibra ácido- y neutrodetergente y de minerales menores en maíz y su tortilla. *Arch. Latinoam. Nutr.*, 39: 382-391.

Burge, R.M. and Duensing, W.J. 1989. Processing and dietary fiber ingredient applications of corn bran. *Cereal Foods World* 34: 535-538.

Carbajal M.M., Arroyo T. G. A. , 1995. Las aflatoxinas, micotoxinas del hongo *Aspergillus* spp. Sus características, propiedades físicoquímicas y efectos sobre plantas, animales y el hombre. K Bermúdez T. Y A. Jiménez P. (Eds). Plantas: Biotecnología, agronomía, nutrición. COFAA-IPN, México, 18-25.

Cortéz, A. y Wild-Altamirano, C., 1972. Contribución a la Tecnología de la Harina de Maíz. En: Mejoramiento del maíz, p. 12-14.

Coulombe, R.A. 1994. Nonhepatic disposition and effects of aflatoxin B₁. Chap. 5 in *The toxicology of aflatoxin*, D.L. Eaton and J. D. Groopman (Eds). Academic Press, INC. San Diego.

Christianson, D.D., Wall, J.S., Dimler, R.J. and Booth, A. N. 1968. Nutritionally available niacin in corn. Isolation and biological activity. *J. Agric. Food Chem.*, 16: 100-104.

Dirr H. W. And Schabort J. C. 1986. Aflatoxin B₁ transport in rat blood plasma. Binding to albumin in vivo and vitro and spectrofluorimetric studies into the nature of the interaction. *Biochim Biophys Acta*, 881(3):383-90.

Dragan, Y. P. and Pitot H. C. 1994. Aflatoxin carcinogens in the context of the multistage nature of cancer. Chap. 9, in: *The toxicology of aflatoxins*, D.L. Eaton and J. D. Groopman (Eds). Academic Press, INC. San Diego.

Eaton D. L., Ramsdell H. S., and Neal G. E. 1994. Biotransformation of aflatoxins. Chap.3, in: *The toxicology of aflatoxins*, D. L. Eaton and J. D. Groopman (Eds). Academic Press, INC. San Diego.

Earll, J.M., Navjokaitis, S., Pyle, S., McFalls, K. and Altschul, A.M. 1988. Feasibility and metabolic effects of a purified corn fiber toad supplement. *J. Am. Diet. Assoc.* 88: 950-952.

Ellis W. O., Smith J. P. and Simpson B. K., 1991. Aflatoxins in food: occurrence, biosynthesis, effects on organisms, detection, and methods of control. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 30:(3) 403-439.

FAO. El maíz en la nutrición humana. Estudios FAO: Alimentación y Nutrición. Roma. www.fao.org/decrep/

Figueroa C. J. D., Aguilar G. R., 1997. El origen del maíz. *Avances y perspectivas*, 16:91-98.

Figueroa C. J. D., Martínez B. F., González H. J., Sánchez S. F., Martínez M. J. L. y Ruiz T. M., 1994. Modernización tecnológicas del proceso de nixtamalización. *Avance y Perspectiva*, 13:323-329.

Gary A., Payne Ph. D., 1992. Aflatoxin in maize. *Critical Reviews in Plant Sciences*, (10):423-440.

Gopalan, C. and Rao, K.S.J. 1975. Pe llagra and amino acid imbalance. *Vitam. Horm.*, 33: 505-528.

Gordillo, A. G., 1990. La industrialización y comercialización de Maíz en México, El maíz en la década de los 90's. Ayuntamiento de Zapopan, Jalisco, México, pp. 261-274.

Handbook of Chemistry and Physics 1st student edition 1988. Robert C. Weast, Ph. D. E, pp. D-86-87.

Hayes, T. M. 1981. Mycotoxins and fetal development. Chap 3, in *Micotoxins Teratogenicity and Mutagenicity*. CRC. Press, INC Boca Ratón Florida

Heinonen J. T., Fisher R., Brendel K. and Eaton D. L. 1996. Determination of aflatoxin B₁ biotransformation and binding to hepatic macromolecules in human precision liver slices. *Toxicology and applied pharmacology*, 136:1-7

Hsieh D. PH. and Atkinson D. N., 1990. Bisfuranoid micotoxins: their genotoxicity and carcinogenicity biological reactivw intermediates IV.; C. M. Witmery col. (EDS). Plenum Press, New York, 525-532.

Inglett G.E., 1970. Corn:culture, processing, products, major feed and food crops in agriculture and food series. The avi publishing company, inc.

Iturriaga, M. S., 1987. " De tacos, tamales y tortas". Ed. Diana, México.

Iwaki M., Kumagai S., Akamatsu Y., Kitagawa T., 1993. Aflatoxin b1-binding proteins in cultured hepatocytes of chicken embryo: studies in vivo and in vitro. *Biochemical et Biophysical Acta*,1225:83-88.

Jackson, D. S. and Shandera, J. R. 1995. Corn wet milling: separation chemistry and tecnology. *Advances in Food and Nutrition Research*, 38:271-297

Kumagal S., Nakano N. and Aibara K. 1983. Interactions of aflatoxin B₁ and components of various species *in vitro*: interconversionof aflatoxin B₁ and aflatoxicol in the Blood.*Toxicology and applied pharmacology*, 67:292-301.

Landry, J. and Moureaux, T. 1970. Hétérogénéité des glutélines du grain de ma'is: Extraction sélecti ve et composition en acides ami nés des trois fractions i solées. *Bull. .Soc . Chim. Biol.* 52: 1021 - 1037.

Landry, J. and Moureaux, T. 1982. Distribution and amino acid composition of protein fractions in opaque-2 maize grain. *Phytochemistry*. 21: 11365- 1869.

Lehninger A. L. 1993. Bioquímica: las bases moleculares de la estructura y función celular. p. 293.

Loechler, E. L. 1994..Mechanisms by which aflatoxins and other bulky carcinogens induce mutations.Chap 8, en The toxicology of aflatoxins, D. L. Eaton and Groopman, J. D. (Eds). Academic Press, INC. San Diego.

Mac Ritichie F., 1977. Fluor lipids and their effects in baking. Journal Science Food and Agriculture 28:53-58.

Mertz, E.T., Jambunathan, R., Villegas, E., Bauer, R. Kies, C., McGinnis, J. y Shenk, J.S. 1975. Use of small animals for evaluation of protein quality in cereals. In High-quality-protein maize, CIMMYT-Purdue International Symposium on Protein Quality in Maize, 1972, El Batán, México, p. 306-329. Stroudsburg, Pa., EE.UU., Dowden Hutchinson & Ross.

Miller, D. M. and Ha, Y. Y. 1990. Conjugated dienoic derivatives of linoleic acid: mechanism of anticarcinogenic effect. Chap. Antimutagens and carcinogens, in Mutagens and Carcinogens in the diet. M. W. Pariza, H-U. Aeschbacher, J. S. Felton and S. Sato (Eds). Wiley-liss. New York.

Miller, D. M. and Wilson D. M. 1994. Veterinary diseases related to aflatoxins. Chap. 16, in the Toxicology of aflatoxins. D. L. Eaton, and J. D. Groopman (Eds) Academic Press, INC. San Diego.

Moreno M. E., 1996. El maíz y las aflatoxinas. La industria de la masa y la tortilla: Desarrollo y tecnología. Universidad Nacional Autónoma de México, 139-147.

Orr, M.L. and Walt, B.K. 1957. Amino acid content of foods. Home Economics Research Report No. 4. Washington, D.C., Dept. Agric. de los Estados Unidos. pp. 88-90.

Ortega, F.:I., Villegas, E. and Vasal, S.K. 1986. A comparative study of protein changes in normal and quality protein maize during tortilla making. *Cereal Chem.* 63: 446-451.

Paredes-Lopez O. and Saharópulos-Paredes, M. E. 1983. A review of tortilla production technology. *Bakers Digest*, 9:16-25.

Parson D. B. 1984. Manuales para la Educación agropecuaria del maíz. Area: producción vegetal 10, en: el maíz. SEP/Trillas, México. Pag 13-15.

Patterson, J.I., Brown, R.R., Linkswiler, H. and Harper, A.E. 1980, Excretion of tryptophan- niacin metabolites by young men: effects of tryptophan, leucina and vitamin B6 intakes. *Am. J. Clin. Nutr.* 33: 2157-2167.

Roebuk, B. D. And Maxuitenko, Y.Y. 1994. Biochemical mechanisms and biological implications of the toxicity of aflatoxin as related to aflatoxin carcinogenesis. Chap. 2 in *The toxicology of Aflatoxins*, D. L. Eaton and J. D. Groopman (Eds). Academic Press, INC. San Diego.

Sandstead, H.H., Munoz, J.M., Jacob, R.A., Kelvay, L.M., Reck, S.J., Logan, G.M., Dintzis, F.R., Inglett, G.E.y Shvey, W.C.1978. Influence of dietary fiber on trace element balance. *Am. J. Clin. Nutr.*, 31: 5180-5184.

Sheabar F. Z., Groopman J. D., Qian G. S and Wogan G. N. 1993. Quantitative analysis of aflatoxin-albumin adducts. *Carcinogenesis*, Jun; 14(6):1203-8.

Stewart R. K., Serabjit-Singh C. J. and Massey T. E., 1996. Glutation S-transferase-catalyzed conjugation of bioactivated aflatoxin B₁ in Rabbit lung and liver. *Toxicology and applied pharmacology*, 140:499-507.

Tatham A. S., field J. M., Morris V. J., l'Anson K. J. Cardle L., Dufton M. J. And Shewry P. R. 1993. Solution conformational analysis of the α -zein proteins of maize. *J. Biological Chemistry*, 268 (35):26253-26259.

Terao, K. and Ohtsubo, K. 1991. Biological activities of mycotoxins: field and experimental micotoxicoses. Chap. 21, in *Mycotoxins and Animal Foods*. J. E. Smith and S. R. Henderson (Eds), CRC Press, Inc, Boca ratón Bostan Ann Arbor London.

Trimbell J. 1991. Factors affecting toxic responses: metabolism. Cap. 4. In: *Principles of biochemical toxicology*. Taylor and Francis (Eds).

Tuner P. C., Dingley K. H., Coxhead J. Russell S. and Garner C. R. 1998. Detectable levels of serum aflatoxin B₁ –albumin adducts in the United Kingdom population for aflatoxin B₁ exposure in the United Kingdom. *Cancer epidemiol biomarkers*, 7(5):441-447.

Verma R. J., Shukla R. S. y Mehta D. N. 1999 Interation of aflatoxin with L-Ascorbic Acid: a kinetic and mechanistic approach. *Nat. Toxins*, 7:25-29.

Watson A. S., 1987. Structure and composition. in *corn: chemistry and technology*. Watson and Ramstad (Editors), Published by The American Association Cereal Chemistry St. Paul, MN, USA. 3:53-82.

Watson, S.A. 1962. The yellow carotenoid pigments of corn. En W. Hechendorf y J.J. Sutherland, eds. *Proc. Corn. Res. Conf. 17th*. Washington, D.C., Am. Seed Trade Assoc.

Wild C.P., Hasegawa R., Barraud L., Chitimataewin S., Chapot B., Ito N., Montesano R. 1996. Aflatoxin-albumin adducts: a basis for comparative carcinogenesis between animals and humans. *Cancer Epidemiology Biomarkers*, 5(3):179-89.

Wright, K. N. 1987. Nutritional properties and feeding values of corn and its by-products In: Corn: chemistry and technology. Watson, S. A. and Ramstad, ed. American Association cereal Chemistry St. Paul, MN, USA. Chap. 15 p. 447-178.

Yen, J.T., Jensen, A.H. and Baker, D.H. 1976. Assessment of the concentration of biologically available vitamin B6 in corn and soybean meal. .1. Anim. Sci., 42: 866870.

Yourtee D. M. and Kirk-Yourtee C. L. 1989. Aflatoxin detoxification in humans laboratory, field and clinical perspectives. J. Toxicology. Toxin reviews, 8(182):3-18.

Yousef A. E. and Marh E. H., 1989. Stability and degradation of Aflatoxin M1. Chap. 5 In: Micotoxins in dairy products. Hans P. Van Egmon (Ed). Elsevier Applied science, 130-131.

Zuber, M.S., E.B. Lillehoj, and B.L. Renfro, eds. 1987. Aflatoxin in maize: a proceedings of the workshop. CIMMYT, México, D. F.