

Inactivación de aflatoxina B1 y aflatoxicol por nixtamalización tradicional del maíz y su regeneración por acidificación de la masa

Gloria Laura Anguiano-Ruvalcaba, IBQ,⁽¹⁾ Aurora Verver y Vargas-Cortina, QFB,⁽²⁾
Doralinda Guzmán-De Peña, Dra. en Genét y Biol Mol⁽²⁾

Anguiano-Ruvalcaba GL, Verver y Vargas-Cortina A,
Guzmán-De Peña D.
Inactivación de aflatoxina B1 y aflatoxicol
por nixtamalización tradicional del maíz
y su regeneración por acidificación de la masa.
Salud Publica Mex 2005;47:369-375.

Resumen

Objetivo. Confirmar el efecto de la nixtamalización tradicional sobre la aflatoxina, identificar el compuesto remanente en masa, evaluar su toxicidad y su regeneración por tratamiento ácido. **Material y métodos.** Se utilizó maíz, sin y con aflatoxina, y se nixtamalizó. La toxicidad se evaluó en pollos de ocho días de edad. Se aplicó el tratamiento ácido a la masa. La cuantificación de aflatoxinas se realizó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). **Resultados.** La nixtamalización destruyó la aflatoxina (96%) y el aflatoxicol (70%); el remanente en masa fue aflatoxina B1. El tratamiento ácido *in vitro* no eleva las concentraciones de ninguna de las dos micotoxinas. Los pollos murieron al ingerir 260 µg de AFB1, y la masa con aflatoxina remanente no fue tóxica. **Conclusiones.** Los resultados ilustran el beneficio de la nixtamalización tradicional en la inactivación de las aflatoxinas presentes en maíz y en su no reconstitución por efecto del tratamiento ácido.

Palabras clave: micotoxinas; aflatoxina B1; aflatoxicol; *Zea mays*; México

Anguiano-Ruvalcaba GL, Verver y Vargas-Cortina A,
Guzmán-De Peña D.
Inactivation of aflatoxin B1 and aflatoxicol
through traditional "nixtamalización" of corn
and their regeneration by acidification of corn dough.
Salud Publica Mex 2005;47:369-375.

Abstract

Objective. To ratify the effect of traditional "nixtamalización" upon aflatoxin in corn, to identify the residual compound in dough, to evaluate its toxicity, and to verify the effect of acidic treatment on the regeneration of aflatoxin. **Material and Methods.** Corn with and without aflatoxin was treated separately with lime and heat to obtain two types of dough. Aflatoxin and the residual compound were quantified by high pressure liquid chromatography (HPLC) and toxicity was evaluated in eight day old chicks. **Results.** "Nixtamalización" destroyed AFB1 (96%) and aflatoxicol (70%). The residual compound was identified as AFB1. Experimental animals died by ingestion of 260 µg of AFB1. Dough containing residual aflatoxin was not toxic. Acidic treatment did not increase aflatoxin concentration, nor aflatoxicol. **Conclusions.** The results support the use of traditional "nixtamalización" as a means to inactivate aflatoxin in corn and that acidic treatment prevents its regeneration in dough.

Key words: mycotoxins; aflatoxin B1; aflatoxicol; *Zea mays*; Mexico

- (1) Laboratorio de Micotoxinas, Departamento de Biotecnología y Bioquímica, Unidad Irapuato, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN. Irapuato, Guanajuato, México.
(2) Departamento de Ingeniería Genética, Unidad Irapuato, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN. Irapuato, Guanajuato, México.

Fecha de recibido: 15 de noviembre de 2005 • **Fecha de aprobado:** 17 de agosto de 2005

Solicitud de sobretiros: Dra. Doralinda Guzmán De Peña. Laboratorio de Micotoxinas, Departamento de Biotecnología y Bioquímica, CINVESTAV Irapuato. Km 9.6 Libramiento Norte Carretera Irapuato-León: AP 629, 36500 Irapuato, Guanajuato.
Correo electrónico: dguzman@ira.cinvestav.mx

La ingestión de aflatoxina B1 (AFB1) se asocia con toxicidad hepática en humanos y en animales de granja. Estudios epidemiológicos realizados en África y Asia, indican que existe una correlación positiva entre cáncer hepático y consumo de alimentos contaminados con aflatoxinas. La aflatoxina puede actuar como iniciadora y promotora de cáncer en humanos y en diversas especies animales.¹ Cuando los organismos superiores ingieren alimentos contaminados con AFB1, esta micotoxina se absorbe en el intestino, entra al torrente sanguíneo, llega al hígado y ahí se convierte en epoxi-AFB1.^{2,3} Este compuesto se une covalentemente a macromoléculas celulares como las proteínas ADN y ARN.^{2,3} El compuesto formado por AFB1 y el ADN se conoce como el dihydro-8-(N⁷-guanyl)-9hydroxy-AFB1-N⁷-guanidina;^{4,5} es el que se forma en mayor cantidad cuando se consume aflatoxina B1 y llega a encontrarse en hígado, riñón y pulmones de las especies susceptibles.⁶ En numerosos estudios realizados con diferentes especies se ha demostrado una correlación positiva lineal entre las concentraciones de aductos de aflatoxinas con ADN (AFB1-ADN) y el consumo de alimentos contaminados.⁷

Otros estudios han notificado que hombres y mujeres que ingirieron, respectivamente, 48.4 µg/día y 92.4 µg/día de aflatoxinas excretaron, al cuarto día en la orina, AFB1-N⁷-gua, aflatoxina M1, aflatoxina P y aflatoxina B1.⁶ De estos compuestos excretados, el AFB1-N⁷-guanidina presentó, al graficarse con la ingestión total de AFB1, una correlación significativa (tipo Spearman).⁸ Se ha estudiado ampliamente el papel que juega el aducto AFB1-ADN en el mecanismo de carcinogénesis de la AFB1 y se ha demostrado que la replicación de ADN que contiene el aducto AFB1-N⁷-gua induce mutaciones de G→T.^{4,9}

Las aflatoxinas B (fluorescencia azul) y G (fluorescencia verde) se producen cuando los hongos *Aspergillus flavus* y/o *Aspergillus parasiticus* crecen en diversos alimentos que sirven como sustrato ideal para ello. Generalmente estos alimentos son granos básicos como el maíz, trigo, arroz, frijol, sorgo, cebada, oleaginosas (nueces), frutas secas, etcétera.⁵

La contaminación del maíz ocurre durante el cultivo y el almacenamiento.^{10,11} En México se tienen datos sobre algunos periodos de cultivo de maíz, en los cuales se detectó contaminación con aflatoxinas.¹² Así, en Tamaulipas, en 1989, se observó que el maíz estaba contaminado desde el campo, ya que muestreos previos a su almacenamiento reflejaron concentraciones de 45-65 µg de AFB1/kg. El mismo maíz, después de estar almacenado dos meses en condiciones de alta temperatura y humedad, alcanzó concentraciones de más de 250 µg de aflatoxina B1 /kg.^{13,14}

En México la contaminación del maíz con aflatoxina representa un riesgo potencial para la población, debido principalmente a que es un alimento básico y se ingiere como tortilla, con un consumo de 325 g/día.^{1,7,14,15}

La tortilla se obtiene siguiendo un proceso tradicional llamado nixtamalización,¹⁶ cuya alcalinidad parece destruir en gran parte las aflatoxinas presentes en el maíz. Se ha demostrado que la nixtamalización tradicional es capaz de destruir 85% de la aflatoxina presente en el maíz y que 15% de aflatoxina remanente en masa no conserva sus propiedades de fluorescencia, pero puede reconocerse por los anticuerpos monoclonales utilizados para su detección.¹⁷ Estudios recientes realizados por Mendez-Albores y colaboradores,^{18,19} han demostrado que la nixtamalización tradicional puede reducir las concentraciones de aflatoxina en 94%, incluso en maíz altamente contaminado. Los mismos autores, en evaluaciones del proceso de extrusión y del proceso de nixtamalización ecológica, encontraron reducciones respectivas de 46 y 78%.^{15,18}

Varios investigadores han cuestionado la eficacia de este proceso tradicional considerado efectivo para inactivar las aflatoxinas, al sugerir que "los anillos de lactona de la aflatoxina que se abren durante el tratamiento alcalino, en la nixtamalización, podrían cerrarse cuando la tortilla se acidifica en el estómago".^{19,20,21}

Con estos antecedentes, el presente trabajo se realizó con los siguientes objetivos: a) confirmar la efectividad de la nixtamalización tradicional sobre la aflatoxina en maíz; b) determinar el tipo de aflatoxina remanente en masa; c) evaluar el tratamiento ácido como mecanismo de recuperación de aflatoxina en la masa, y d) evaluar el efecto tóxico de la micotoxina residual en masa en animales de granja.

Material y métodos

Maíz. Se utilizó maíz híbrido, mezcla de blanco y amarillo, proveniente de Matamoros, Tamaulipas (cosecha 1999), contaminado en forma natural con AFB. Para el control negativo se utilizó maíz de las mismas características, pero sin AFB.

Determinación del nivel de contaminación de aflatoxina original. Se determinó por separado el nivel basal de aflatoxina de cada tipo de maíz. Las muestras de maíz se homogeneizaron también por separado y cada una se muestreó mediante ocho cuarteos hasta obtener 2.5 kg para cada muestra de aflatoxina: la positiva y la negativa. De cada una se tomó 1 kg que se molió hasta grado fino, y mediante cinco cuarteos, se obtuvieron 20 submuestras de 50 g, 10 para la determinación de la concentración de aflatoxina (2001,2002) y las otras 15

para alimentar durante siete días a pollos de ocho días de edad. La cantidad restante (1 kg) de las muestras se utilizó para realizar la nixtamalización tradicional por separado en cada tipo de maíz.

Cuantificación de AFB1 en maíz y en masa. Para determinar la cantidad de aflatoxina presente tanto en el maíz como en la masa, se utilizó el método CB modificado.²² La submuestra de maíz o masa de 50 g se extrae con 250 ml de cloroformo y 25 g de tierra diatomácea (material inerte, ayuda de filtración J. T. Baker) y 30 minutos de agitación. Se filtran a través de papel Whatman número 4, en un embudo Buchner aplicando vacío. Al filtrado obtenido se le adicionan 25 ml de sulfato de amonio saturado, se agita y se deja en reposo 20 minutos. Esta mezcla se coloca en un embudo de separación, se agita y se dejan separar las fases. La fase clorofórmica (fase inferior) se pasa a través de sulfato de sodio anhidro contenido en un papel filtro en un embudo sencillo. Esta fase clorofórmica se evapora en un evaporador rotatorio a una temperatura de 67° C hasta obtener 5 ml de volumen. Este extracto se purifica en una columna corta de gel de sílice (60-200 mesh). La columna corta de gel de sílice se monta en jeringas de plástico de 5 ml de volumen sin el émbolo y se empaquetan 0.5 g de sulfato de sodio anhidro, 1.0 g de sílica gel de 60-200 mesh y 1.5 g de sulfato de sodio anhidro. El extracto clorofórmico (5 ml) se aplica a la columna y se eluye con 5 ml de hexano, 5 ml de éter etílico, los cuales se desechan; para obtener las aflatoxinas se agregan 5 ml de una mezcla de cloroformo: metanol (98:2). Para su cuantificación por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), estos 5 ml se evaporan a sequedad y se resuspenden con 1 ml de metanol grado HPLC.

Cuantificación por HPLC. Para esta determinación se utilizó un equipo HPXL-RAININ Instrument Co., Modelo 4800 XL, con bomba doble Dinamax mixer 81-400 y computadora e impresora integradas (Varian, S.A.). Se utilizó una columna de fase reversa ultrasphere ODS 5µ de 4.6X15 cm, Beckman 235330, así como el siguiente sistema de solventes. Bomba A agua: acetonitrilo: metanol (60:20:20 vol.); Bomba B metanol 100%. Se utilizó una proporción de 25% de B y 75 % de A, método isocrático por 18 minutos. En estas condiciones la AFB1 presentó un tiempo de retención de 5 a 5.5 min.²³ La concentración de aflatoxinas se calculó en una curva de estándares de aflatoxina basada en las áreas reportadas en el HPLC.

Nixtamalización. La nixtamalización tradicional se realizó de la siguiente manera: a cada muestra de maíz, contenida en un recipiente amplio (olla de 5 l), se le

adicionaron 10 g de cal/kg de maíz (cal viva Cruz Azul) y 4 l de agua de la llave. La mezcla se llevó a punto de ebullición, se hirvió durante 50 minutos y luego se dejó reposar durante 17 hrs. Posteriormente se tiró el agua donde hirvió (nejayote) y se lavó tres veces con agua limpia.¹⁶ Una vez lavado, el maíz se molió con un poco de agua hasta obtener una masa suave.

Muestreo de masa. La masa obtenida, de ambos tipos de maíz, se homogenizó amasando 10 veces antes de cuartear, y mediante cinco cuarteos se obtuvieron submuestras de 50 g. Las submuestras de masa se utilizaron para: a) determinar la concentración de aflatoxina después de la nixtamalización (cinco submuestras); b) alimentar a pollos de ocho días de edad durante siete días (12 submuestras), por duplicado, y c) analizar el efecto del tratamiento ácido en la recuperación de la aflatoxina en masa en dos cantidades diferentes.

Bioensayo. El propósito de este ensayo fue ilustrar, por un lado, el efecto tóxico de maíz contaminado, aun en niveles bajos, sobre animales susceptibles y, por otro, demostrar que la masa proveniente de maíz contaminado, incluso con aflatoxina remanente, no era tóxica para estos animales. Se utilizaron 25 pollos de ocho días de edad. Luego de pesar a cada uno se colocaron cinco de forma aleatoria en cada jaula y se les aplicaron los diferentes tratamientos. En todos éstos se utilizaron 100 g de harina o masa de maíz. Los tratamientos con los que se alimentó a los animales fueron los siguientes:

Control negativo (jaula 1): harina de maíz no contaminado de aflatoxina. Control positivo (jaula 2): maíz que contenía aflatoxina B1 (52 µg de AFB/50g de maíz). Tratamiento 1 (jaula 3): masa sin AFB1, proveniente de maíz sin aflatoxina. Tratamiento 2 (jaulas 4 y 5): masa A y B proveniente de maíz contaminado con aflatoxina. Diariamente, durante seis días, se les dio 100 g de masa por jaula (cinco pollos). También se les proporcionó abundante agua. Al séptimo día se retiró el tratamiento y se les suministró alimento balanceado.

Tratamiento ácido de la masa. Con el propósito de reproducir el tratamiento ácido que se genera en el estómago, se tomaron muestras de masa de 53.6 g (equivalente al peso de 2 tortillas) y de 328 g (equivalente al peso de 12 tortillas) y se expusieron al tratamiento ácido. Este consistió en adicionar a la masa 1.5 ml de ácido clorhídrico concentrado y mezclar con una varilla de vidrio; se incubó a 37° C durante 30 min y después se determinó la concentración de aflatoxina por el método anteriormente descrito. Se recurrió a cantidades y tratamientos similares para el control negativo. Se uti-

lizó masa que sí tenía aflatoxina pero a la cual no se le adicionó HCl; se consideró que este control permitiría evaluar, por diferencia, el aumento en la concentración de aflatoxina.

Resultados

Para realizar el presente estudio fue necesario determinar la concentración basal del contenido de aflatoxina en el maíz utilizado, mismo que provenía de Tamaulipas, una de las regiones de alta incidencia de aflatoxinas en maíz en México. Se recibió en el año 2000 y al llegar se tomaron 20 submuestras, mediante cinco cuarteos cada una, para determinar la concentración de aflatoxinas: 955 µg/kg de aflatoxina (AFB). Este maíz se mantuvo en refrigeración durante un año a una temperatura de 10°C. Se determinó la concentración de AFB en 10 submuestras, de la forma descrita anteriormente; se encontró que ésta había bajado a 699 µg/kg y, además, se detectó la presencia de aflatoxicol. Después de otro año de almacenamiento en las mismas condiciones, disminuyeron las concentraciones de AFB1 y aflatoxicol (cuadro I). La población fúngica predominante en este maíz fue inicialmente *A. flavus*, y, finalmente, después de dos años de almacenamiento en refrigeración, *Aspergillus niger* (cuadro I). El maíz del control negativo también se analizó para determinar la concentración basal de AFB1, la cual resultó ser negativa en AFB1 (dato no presentado). Ambos tipos de maíz molido (AFB1 negativo y positivo) se emplearon para realizar un bioensayo en pollos de ocho días de edad, dada su sensibilidad en esta etapa de crecimiento y su facilidad de manejo.

Nixtamalización

El proceso de nixtamalización tradicional se realizó cuando el contenido de AFB1 en maíz era de 699 µg/kg

Cuadro I
CONCENTRACIÓN DE AFLATOXINA B1
Y POBLACIÓN FÚNGICA EN MAÍZ DEL ESTADO
DE TAMAULIPAS, MÉXICO, 2000

Maíz blanco	Aflatoxina B1 µg/kg*	Aflatoxicol µg/kg*	Población fúngica
Ingresó-2000	955	0.0	<i>A. flavus</i>
Almacenado 10° C- 2001	699	421.0	<i>A. niger</i> <i>A. flavus</i>
Almacenado 10° C- 2002	520	175.0	<i>A. niger</i>

* Valores promedio de 10 determinaciones

(cuadro II) y cuando correspondía a 520 µg de AFB1/kg (cuadro III). En ambos experimentos se obtuvo una efectividad de eliminación de AFB1 de 96 y 93%, así como de 70 y 95% de eliminación del aflatoxicol

Se obtuvieron dos tipos de masas: la de maíz no contaminado y la del maíz con 36 µg de AFB1/kg. Ambas masas fueron submuestreadas por separado para realizar el bioensayo.

Bioensayo en pollos de ocho días de edad

En el control negativo de este estudio, se utilizó maíz sin aflatoxina B1; los pollos presentaban un aspecto saludable (comían, bebían agua, piaban, caminaban),

Cuadro II
EFFECTO DE LA NIXTAMALIZACIÓN TRADICIONAL
SOBRE AFLATOXINA EN MAÍZ NATURALMENTE
CONTAMINADO PROVENIENTE DEL ESTADO
DE TAMAULIPAS, MÉXICO, 2001

Maíz blanco	Nivel de aflatoxina B1*		Nivel de aflatoxicol*	
	µg/g	µg/kg	µg/50g	µg/kg
Grano	35.0	699.0a	21.0	421.0
Grano-nixtamalizado (masa)	1.3	26.0b	6.5	129.0
Efectividad de la nixtamalización %	96.0	96.0	70.0	70.0

* Los valores son promedio de 10 determinaciones en cada tratamiento
Análisis estadístico de datos transformados (Log + 1)
Coeficiente de variación=37.7%

Nota: los valores con letra diferente en la misma columna son estadísticamente diferentes

Cuadro III
EFFECTO DE LA NIXTAMALIZACIÓN TRADICIONAL
SOBRE AFLATOXINA EN MAÍZ NATURALMENTE
CONTAMINADO, 2002

Maíz blanco	Nivel de aflatoxina B1*		Nivel de aflatoxicol*	
	µg/50g	µg/kg	µg/50g	µg/kg
Grano	26.0	520.0a	8.7	175.0
Grano-nixtamalizado (masa)	1.8	36.0b	0.2	5.1
Efectividad de la nixtamalización %	93.0	93.0	95.0	95.0

* Los valores son promedio de 10 determinaciones en cada tratamiento
Análisis estadístico de datos transformados (Log + 1)
Coeficiente de variación=37.7%

Nota: los valores con letra diferente en la misma columna son estadísticamente diferentes (Tukey p=0.05)

en contraste con el aspecto moribundo de los del control positivo (estaban echados, no abrían los ojos, no piaban ni comían), al haber ingerido diariamente 52 µg de AFB1 en 100 g de harina de maíz (260 µg de AFB1 totales). Los cinco pollos del control positivo fallecieron al quinto día de iniciado el experimento. Estos animales son sensibles a concentraciones de 20 µg/kg, y la tasa de metabolismo de AFB1 en hígado de aves va de 1/2 a 1 h.²⁴ Los alimentados con maíz del control negativo siguieron vivos.

El efecto de la AFB1 y el aflatoxicol residual presente en masa se evaluó en el tratamiento 2; los pollos ingirieron 21.6 µg de AFB1 en seis días y sólo presentaron un plumaje pobre pero un comportamiento normal, muy similar al de los alimentados con masa sin residuos de AFB1. Al inicio y al final del experimento, se obtuvo el peso de los pollos (cuadro IV). La ganancia de peso de los pollos de control no fue significativa, y los que ingirieron masa con residuos se mantuvieron en el mismo peso (cuadro IV). La observación más interesante fue que sobrevivieron al experimento los pollos alimentados con masa con residuos de aflatoxina. Ninguno falleció, en contraste con aquellos que se alimentaron con harina de maíz contaminada con aflatoxina.

Tratamiento ácido

El experimento de tratamiento ácido sólo se realizó utilizando masa con residuos de AFB1, ya que si la idea era que el tratamiento ácido cerrara las estructuras de aflatoxina remanente, no se habría podido cuantificar el efecto ácido si se utilizaba una masa que no la incluyera. Así que el control positivo fue la masa con afla-

toxina remanente pero sin tratamiento ácido. Para realizar el tratamiento ácido en la masa, se tomaron en consideración los siguientes puntos: a) la cantidad mínima y máxima de tortilla per cápita que se consume en México; b) el valor de pH de alrededor de 1.5 que alcanzan las células estomacales; c) la temperatura del cuerpo humano de 37° C y la permanencia de la comida durante 30 minutos en el estómago, y d) si la acidez cierra los anillos de lactona presentes en la masa como residuos de aflatoxinas, lógicamente la cantidad de aflatoxina se elevará después de este tratamiento y podrá cuantificarse fácilmente.

El peso de dos tortillas es de alrededor de 53.6 g, y el de 12 tortillas, de 328 g. Cuando el maíz contenía 520 µg de aflatoxina B1/kg, el nivel residual de aflatoxina era de 1.9 µg en dos tortillas y de 11.8 µg en 12 tortillas; el nivel residual de aflatoxicol correspondió, respectivamente, a 6.9 y 42.4 µg (cuadro V). El control de este experimento fue la misma cantidad de masa a la cual no se le dio el tratamiento ácido, pero se le añadieron 1.5 ml de agua y se mantuvo en incubación a 37° C durante 30 minutos. Como se puede observar en el cuadro V, la cantidad de aflatoxina y de aflatoxicol disminuyen en 74-95% y 100%, respectivamente, cuando la masa sólo se incuba a 37° C durante 30 minutos, en tanto que el valor del pH no sufre ningún cambio. Por el contrario, cuando se adiciona ácido clorhídrico, el valor del pH baja a 1.0 o 3.4, dependiendo de la cantidad de masa; en estos casos la cantidad de aflatoxina y aflatoxicol disminuyen en 79-88% y 80-93%, respectivamente. De acuerdo con el cuadro V, el tratamiento ácido no incrementa los niveles de aflatoxina ni de aflatoxicol.

Cuadro IV
EFFECTO DE LA AFLATOXINA Y EL AFLATOXICOL RESIDUALES PRESENTES EN MASA* SOBRE EL CRECIMIENTO DE POLLOS DE OCHO DÍAS DE EDAD ALIMENTADOS DURANTE SIETE DÍAS. IRAPUATO, GUANAJUATO, MÉXICO, 2002

Tratamiento	Nivel de		Crecimiento expresado en gramos [‡]	
	aflatoxina µg en muestra	aflatoxicol µg en muestra	peso inicial	peso final
Masa sin residuos	0.0	0.0	77.4	81.0
Masa con residuos A	21.0	2.4	71.4	71.0
Masa con residuos B	21.0	2.4	70.4	71.0

* Los pollos consumieron 600g de masa durante 7 días

‡ Promedio de peso de cinco pollos por cada tratamiento

Cuadro V
EFFECTO DEL ÁCIDO CLORHÍDRICO SOBRE LA AFLATOXINA Y EL AFLATOXICOL RESIDUALES EN MASA DE MAÍZ NATURALMENTE CONTAMINADO. IRAPUATO, GANAJUATO, MÉXICO, 2002

Masa Peso húmedo g	Nivel de		HCL adicionado ml	pH	Nivel de	
	Aflatoxina µg en muestra	Aflatoxicol µg en muestra			Aflatoxina µg en muestra	Aflatoxicol µg en muestra
53.6	1.9	6.9	0.0	7.5	0.5	0.0
328.0	11.8	42.4	0.0	7.5	0.6	0.0
53.6	1.9	6.9	1.5	1.0	0.4	1.3
328.0	11.8	42.4	1.5	3.4	1.5	3.1

Notas: Los valores son promedio de tres repeticiones en cada tratamiento; 53.6 gramos de masa es equivalente al peso de dos tortillas de 13 cm de diámetro; 328.0 gramos de masa es equivalente al peso de 12 tortillas de 13 cm de diámetro

Discusión

Este trabajo ratifica que la nixtamalización tradicional destruye 95% de la aflatoxina presente en maíz contaminado de manera natural, valor muy similar al notificado por Elias-Orozco y colaboradores¹⁵ y Mendez-Albores y colaboradores.^{18,19} La controversia de la efectividad de destrucción de este proceso sobre la aflatoxina se dio como consecuencia de los diversos estudios realizados en condiciones no estandarizadas del proceso de nixtamalización.¹⁶ Sin embargo, Orozco y colaboradores.¹⁵ y Mendez Albores y colaboradores.^{18,19} han demostrado que este proceso es capaz de destruir 90-94% de las aflatoxinas. El mismo proceso también destruye un alto porcentaje de fumonisinas.^{25,26} Los resultados que aquí se presentan demuestran que el proceso es capaz de destruir el aflatoxicol, un compuesto reducido de la AFB1 que se produce por la acción de una reductasa aislada de organismos superiores, pero que también surge de cepas toxigénicas de *A. flavus* y otros microorganismos.⁶ Este último efecto se confirmó por el hecho de que el maíz utilizado en el 2002 contenía altos niveles de aflatoxicol, lo cual pudo deberse a la acción microbiana de la población fúngica natural presente en el maíz. Debido a su origen, este aflatoxicol puede ser el isómero beta, ya que el isómero alfa se forma por el metabolismo de la AFB1 en organismos superiores.^{3,6} Resulta por demás interesante que la nixtamalización tradicional baja los niveles de aflatoxicol en un porcentaje similar a los de aflatoxina.

Es importante hacer notar que el número de análisis realizados en este trabajo para determinar la concentración inicial de AFB1 en el maíz, así como para establecer la concentración de AFB1 en la masa, permite tener un coeficiente de variación relativamente bajo.

La aflatoxina B1 remanente en masa cruda fue de 26 µg/kg en el 2001 y 36 µg/kg en el 2002, en tanto que los valores de aflatoxicol en esos mismos años correspondieron, respectivamente, a 129 y 5.1 µg/kg. Los valores de AFB1 y de aflatoxicol están por arriba de los valores mínimos establecidos como aceptables para consumo humano. En cuanto a los niveles de aflatoxicol, no existe información bibliográfica referente al efecto que éste tendría en la salud humana. Sin embargo, debemos considerar que el aflatoxicol posee la mitad de la potencia hepatocarcinogénica en ratas Fisher 344.⁶ Posteriormente Loveland y colaboradores²⁷ demostraron que el aflatoxicol se convertía, por acción enzimática, en AFB1, y que ésta, al ser activada por la porción microsomal, causa el efecto carcinogénico.

El tratamiento ácido sobre la aflatoxina, remanente en masa, disminuyó la concentración, tanto de aflatoxi-

na B1 como de aflatoxicol. Interesantemente, Parker y Melnick²⁸ ilustraron que la refinación alcalina de los aceites destruía la aflatoxina presente y que no se formaba aflatoxina en los aceites obtenidos por este proceso ni por medio de acidificación con ácido clorhídrico. De igual manera, Coomes y colaboradores²⁹ demostraron que la AFB1 pura se convertía en un producto no fluorescente cuando se calentaba con presión (15 lb) y propusieron que el cambio en el espectro del ultravioleta ocurría porque el anillo de lactona se abría por hidrólisis y que continuaban los cambios de la descarboxilación.

En este estudio el pH de la masa fue de 7.5, a diferencia de lo notificado por Torres y colaboradores²⁰ quienes mencionan que la masa y la tortilla tenían un pH ácido de 6.7+/- 0.03.

A diferencia de lo que afirman estos autores, en este estudio se determinó que el tratamiento ácido de la masa baja 88% el contenido de AFB1 y 93% el de aflatoxicol. El tratamiento ácido, que permite que la masa tenga pH ácido (pH 1.0 y/o 3.4), no aumenta ni la concentración de aflatoxina B1 ni la de aflatoxicol. Por lo tanto, podemos inferir que los anillos de lactona, en caso de estar presentes, no se cerraron para formar aflatoxina B1 y, por lo tanto, para aumentar su concentración en masa.

Finalmente, al realizar el bioensayo en pollos de ocho días de edad, se confirmó que la masa contaminada con aflatoxina y aflatoxicol, en los niveles notificados en este trabajo, no fueron tóxicos para los pollos. Los animalitos que ingirieron la masa con remanentes de AFB1 tenían una apariencia pobre en su plumaje, en comparación con los alimentados mediante masa sin remanentes. A pesar de ello sobrevivieron y recuperaron su plumaje a los tres días de alimentarlos con material libre de contaminación. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Newberne,³⁰ quien observaba una disminución en la toxicidad, al alimentar patitos de un día de nacidos con harina de cacahuate contaminada con AFB1, pero esterilizada en autoclave.

Los resultados de este trabajo confirman que la nixtamalización tradicional es un proceso efectivo en la inactivación de la aflatoxina B1 y del aflatoxicol, y que a pesar de que el compuesto remanente es aflatoxina, ésta se deteriora en la masa por la sola incubación a 37° C durante 30 minutos o por el tratamiento ácido similar al que ocurre en el estómago.

Vale la pena resaltar que la explosión demográfica, la modernización y las desventajas de la técnica tradicional de nixtamalización han determinado que se desarrollen procesos industriales que abastecen 70% de la demanda nacional de tortilla¹⁶ y en los que se desconoce la efectividad de inactivación de la AFB1 en maíz.

Por esa razón, resulta deseable una investigación al respecto.

Los datos aquí presentados tienen impacto en dos áreas muy importantes de la salud pública: nutrición e intoxicaciones alimentarias. Se ilustra que el alimento básico de los mexicanos, la tortilla, llega al consumidor sin aflatoxinas o con baja concentración (menos de 20 µg/k) y que éstas son destruidas por la acidez del estómago. Ambos eventos podrían explicar la baja incidencia de cáncer hepático en nuestra población, según datos de salud pública³¹ que indican que el tumor maligno del hígado fue la catorceava causa de mortalidad en mujeres.

Agradecimientos

Este trabajo fue parcialmente financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México (Ref: 28782N). Agradecemos el apoyo técnico de la Q. Yolanda Rodríguez Aza, la QFB Noemí Castellanos, la IBQ Sandra Laguna y la QFB Laura Hernández.

Referencias

1. Wang JS, Groopman JD. DNA damage by mycotoxins. *Mutat Res* 1999;424:167-181.
2. Eaton DL, Ramsdell HS. Species-diet-related differences in aflatoxina biotransformation. En: Bhatnagar D, Lillehoj EB, Arora DK, eds. *Handbook of applied mycology. Mycotoxins in ecological systems*. Nueva York: Marcel Dekker, 1992; vol. 5:157-182.
3. Autrup H, Autrup JL. Human exposure to aflatoxins- biological monitoring. En: Bhatnagar D, Lillehoj EB, Arora DK, ed. *Handbook of applied mycology. Mycotoxins in ecological systems*. New York: Marcel Dekker, 1992; vol. 5:213-230.
4. Aguilar F, Hussain SP, Cerniti P. Aflatoxin B1 induces the transversion of G-T in codon 249 of the p53 tumor suppressor gene in human hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:8586-8590.
5. Scheidegger KA, Payne GA. Unlocking the secrets behind secondary metabolism: A review of *Aspergillus flavus* from pathogenicity to functional genomics. *J Toxicol-Toxin Rev* 2003;22:423-459.
6. Busby WF, Jr, Wogan GN. Aflatoxins. En: Searle CE, ed. *Chemical carcinogens*. Washington, D.C.: American Chemical Society, 1985: 945-1136.
7. Coulombe RA Jr. Non-hepatic disposition and effects of aflatoxin B1. En: Eaton DL, Groopman JD. eds. *The toxicology of aflatoxins: Human health, veterinary, and agricultural significance*. San Diego: Academic Press 1994:89-101.
8. Groopman JD, Zhu J, Donahue PR, Pikul A, Zhang LS, Chen JS, Wogan NG. Molecular dosimetry of urinary aflatoxina DNA and adducts in people living in Guangxi Autonomous Region, People's Republic of China. *Cancer Res* 1992;52:45-51.
9. Fujimoto Y, Hampton IL, Wirth PJ, Wang NJ, Xie JP, Thorgeirsson SS. Alterations of tumor suppressor genes and allelic losses in human hepatocellular carcinoma in China. *Cancer Res* 1994; 54:281-285.
10. Cardwell KF, Desjardins A, Henry HS, Munkvold G, Robens J. Mycotoxins: The cost of achieving food security and food quality. [monografía en internet]. St. Paul, MN: American Phytopathological Society, 2001. Disponible en: <http://www.apsnet.org/online/feature/mycotoxin/>
11. Widstrom NW. The aflatoxin problem with corn grain. En: Sparks DL, ed. *Advances in agronomy*. Nueva York: Academic Press, 1996:219-280.
12. Guzmán-De Peña D. Estudio de las aflatoxinas en México. En: Guzmán-De Peña D, Ruiz-Herrera J, Peña-Cabriaes JJ, eds. *Perspectivas de la microbiología en México*. México, D.F.: 1997:181-199.
13. Guzmán-De Peña D. Las aflatoxinas en maíz: un reto a los mexicanos. En: *Memorias de la IV Mesa Redonda Latinoamericana sobre prevención de pérdidas postcosecha de granos*; Montecillos, Texcoco, México: FAO/ANDSA, BORUCONSA/CONASUPO, 1989:281-288.
14. Figueroa JD. La tortilla vitaminada. *Avance y Perspectiva* 1999;18:149-158.
15. Elias-Orozco R, Castellanos-Nava A, Gaytan-Martínez M, Figueroa-Cárdenas JD, Loarca-Piña G. Comparison of nixtamalization and extrusion processes for a reduction in aflatoxin content. *Food Addit Contam* 2002;19:878-885.
16. Paredes-López O, Serna-Saldivar S, Guzmán-Maldonado H, eds. *Los alimentos mágicos de las culturas indígenas de México: El caso de la tortilla*. Culiacán: Colegio de Sinaloa, 2000.
17. Guzmán de Peña D, Trudel L, Wogan GN. Corn "nixtamalización" and the fate of radiolabelled aflatoxin B1 in the tortilla making process. *Bull Environ Contam Toxicol* 1995;55:858-864.
18. Méndez-Albores JA, Arámbula-Villa G, Loarca-Piña MG, González-Hernández J, Castaño-Tostado E, Moreno-Martínez E. Aflatoxins' fate during the nixtamalization of contaminated maize by two tortilla-making processes. *J Stored Prod Res* 2004;40:87-94.
19. Méndez-Albores JA, Villa GA, Del Rio-García JC, Martínez EM. Aflatoxin-detoxification achieved with Mexican traditional nixtamalization process (MTNP) is reversible. *J Sci Food Agri* 2004;84:1611-1614.
20. Torres P, Guzmán-Ortiz D, Ramírez-Wong B. Revising the role of pH and thermal treatments in aflatoxin content reduction during the tortilla and deep frying processes. *J Agric Food Chem* 2001;49:2825-2829.
21. Price RL, Jorgensen KV. Effect of processing on aflatoxina levels and mutagenic potential of tortillas made from naturally contaminated corn. *J Food Sci* 1985;43:635-638.
22. Guzmán-De Peña D, Anguiano GL, Medina JJ. Modification of the method I AOAC (CB-Method) for the detection of aflatoxins. *Bull Environ Contam Toxicol* 1992;49:485-489.
23. Guzmán-De Peña D, Ruiz-Herrera J. Relationship between aflatoxin biosynthesis and sporulation in *Aspergillus parasiticus*. *Fungal Genet Biol* 1997;21:198-205.
24. Sharma RP, Salunkhe DK. Occurrence of mycotoxins in foods and feeds. En: Sharma RP, Salunkhe DK, eds. *Mycotoxins and phytoalexins*. Boca Raton: CRC Press, 1991:13-32.
25. Voss KA, Poling SM, Meredith FI, Bacon CW, Saunders DS. Fate of fumonisins during the production of fried tortilla chips. *J Agric Food Chem* 2001;49:3120-3126.
26. Dumbrink-Kurtzman MA, Dvorak TJ, Barron M. Effect of nixtamalization (alkaline cooking) on fumonisin-contaminated corn for production of masa and tortillas. *J Agric Food Chem* 2000;48:5781-5786.
27. Loveland PM, Nixon JE, Pawlowski NE, Eisele TA, Libbey LM, Sinnhuber RO. Aflatoxin B and aflatoxicol metabolism in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and the effects of dietary cyclopropene. *J Environ Pathol Toxicol* 1979;2:707.
28. Parker WA, Melnick D. The absence of aflatoxin from refined vegetable oils. *J Am Oil Chem Soc* 1966;43:635-638.
29. Coomes TJ, Crowther PC, Fewell AJ, Francis BJ. Experiments detoxification of groundnut meals containing aflatoxin. *Nature* 1966;209:406-407.
30. Newberne PM, Wogan GN, Hall A. Effects of dietary modification on response of the duckling to aflatoxins. *J Nutr* 1966;90:123-130.
31. Dirección General de Información en Salud-Secretaría de Salud. Estadística de Mortalidad en México: muertes registradas en el año 2003. *Salud Pública de México* 2005;47:171-187.