



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
UNIDAD XOCHIMILCO**

---

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO EL HOMBRE Y SU AMBIENTE  
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA**

**Efecto de las bacterias lácticas probióticas  
comerciales, como posible control de la Aflatoxina B<sub>1</sub>,  
micotoxina mutágena y cancerígena de alimentos**

**QUE PRESENTA LA ALUMNA**

**Veronica Roa Villanueva**

**Matrícula  
2143026637**

**PARA OBTENER EL GRADO DE  
LICENCIADA EN BIOLOGÍA**

**ASESORES:**

**Interno: Dr. Gabriel Ricardo Campos  
Montes (N.E. 34761)**

**Externa: Dra. Magda Carvajal Moreno  
(Ced. Prof. 0415390)**

**Ciudad de México**

## AGRADECIMIENTOS

### A las personas

A mi asesora, **la Doctora Magda Carvajal Moreno.**

Por permitirme trabajar en un proyecto a su lado. Por todo el apoyo brindado a lo largo de esta investigación y por las enseñanzas.

A mi asesor, el **Doctor Gabriel Ricardo Campos Montes.**

Por el apoyo y consejos brindados a lo largo de toda la investigación y por el apoyo en mi carrera.

Al **MC. Chiharu Murata** por el apoyo en los análisis estadísticos.

Al **Doctor Rodrigo Cardoso de Oliveira.**

Por el apoyo brindado en cromatografía de líquidos.

### A las Instituciones

A la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, y a mis docentes, por la carrera y el aprendizaje que me ayudaron a concluir la Licenciatura en Biología.

Al Instituto de Biología, UNAM, por el laboratorio, metodología, equipos y reactivos brindados para la elaboración de esta investigación.

<b>INDICE</b>		<b>Páginas</b>
Agradecimientos.....		1
Índice.....		2
Lista de Cuadros.....		4
Lista de Figuras.....		5
Resumen.....		6
Abstract.....		7
I. Introducción.....		8
II. Marco Teórico.....		9
II.1. Micotoxinas.....		9
II.2. Aflatoxinas. Definición y estructura química.....		10
II.3. Propiedades físicoquímicas de las Aflatoxinas.....		11
II.4. Efectos de las Aflatoxinas en la salud humana.....		14
II.5. Probióticos. Definición e importancia.....		16
II.6. Bacterias ácido lácticas.....		17
II.7. Control de Aflatoxinas con probióticos.....		18
II.8. Validación del método.....		19
II.8.1 Límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ).....		19
II.8.2. Linealidad.....		19
III. Objetivos.....		20
IV. Métodos.....		21
IV.1. Diseño experimental.....		22
IV.1.1. Preparación de 1 µg mL <sup>-1</sup> de AFB <sub>1</sub> .....		22
IV.1.2. Tratamientos para reducir la AFB <sub>1</sub> con la digestión humana <i>in vitro</i> .....		22
IV.1.3. Extracción química de las Aflatoxinas.....		23
IV.1.4. Derivatización.....		24
IV.1.5. Cuantificación de AFs por cromatografía de líquidos.....		24
IV.2. Validación del método.....		25
IV.2.1. Linealidad (Curvas de calibración).....		26
IV.3. Análisis Estadísticos.....		27
V. Resultados.....		28
V.1. Validación del método.....		28
V.1.1. Curva de calibración de AFB <sub>1</sub> .....		29
V.1.2. Curva de calibración de AFB <sub>2</sub> .....		30
V.1.3. Curva de calibración de AFG <sub>1</sub> .....		31
V.1.4. Curva de calibración de AFG <sub>2</sub> .....		32
V.1.5. Curva de calibración de AFM <sub>1</sub> .....		33
V.1.6. Curva de calibración de AFM <sub>2</sub> .....		34
V.1.7. Curva de calibración de AFP <sub>1</sub> .....		37
V.1.8. Curva de calibración de AFL.....		38

V.2.	Límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ).....	37
V.3.	Probióticos en la digestión humana <i>in vitro</i> . ....	37
V.4.	Análisis estadísticos.....	42
VI.	Discusión.....	45
VII.	Conclusiones.....	47
VIII.	Referencias.....	48

## LISTA DE CUADROS

N°	Contenido	Página
1	Propiedades físicas y químicas de las Aflatoxinas y sus metabolitos (OPS, 1983) .....	13
2	Probióticos utilizados para reducir la biodisponibilidad de la AFB <sub>1</sub> .	21
3	Rangos de límite de detección para cada Aflatoxina de acuerdo con las pruebas de linealidad.....	28
4	Curva de calibración de AFB <sub>1</sub> .....	29
5	Curva de calibración de AFB <sub>2</sub> .....	30
6	Curva de calibración de AFG <sub>1</sub> .....	31
7	Curva de calibración de AFG <sub>2</sub> .....	32
8	Curva de calibración de AFM <sub>1</sub> .....	33
9	Curva de calibración de AFM <sub>2</sub> .....	34
10	Curva de calibración de AFP <sub>1</sub> .....	35
11	Curva de calibración de AFL.....	36
12	LOD y LOQ para cada Aflatoxina.....	37
13	Concentración de Aflatoxinas (ng g <sup>-1</sup> ) en el tratamiento a pH 7.0...	38
14	Concentración de Aflatoxinas (ng g <sup>-1</sup> ) en el tratamiento a pH 1.8...	39
15	Concentración de Aflatoxinas (ng g <sup>-1</sup> ) en el tratamiento a pH 5.8...	40
16	Concentración de Aflatoxinas (ng g <sup>-1</sup> ) en el control negativo a pH 7, 1.8 y 5.8.....	40
17	Concentración de Aflatoxinas (ng g <sup>-1</sup> ) en el control positivo a pH 7, 1.8 y 5.8.....	41
18	Concentración de Aflatoxinas (ng g <sup>-1</sup> ) de los siete probióticos a pH 7.0, equivalente a la digestión humana <i>in vitro</i> en la etapa bucal (saliva).....	42
19	Concentración de Aflatoxinas (ng g <sup>-1</sup> ) de los siete probióticos a pH 1.8, equivalente a la digestión humana <i>in vitro</i> en la etapa estomacal (saliva + jugo gástrico).....	43
20	Concentración de Aflatoxinas (ng g <sup>-1</sup> ) de los siete probióticos a pH 5.8, equivalente a la digestión humana <i>in vitro</i> en la etapa en el colon (saliva + jugo gástrico + jugo pancreático).....	44

**LISTA DE FIGURAS**

N°	Contenido	Página
1	Estructura química de las Aflatoxinas (Sweeney y Dobson, 1999; Soriano del Castillo <i>et al.</i> , 2007).....	11
2	Ruta de biotransformación de la AFB <sub>1</sub> (Eaton <i>et al.</i> , 1994).....	14
3	Curva de calibración de AFB <sub>1</sub> .....	29
4	Curva de calibración de AFB <sub>2</sub> .....	30
5	Curva de calibración de AFG <sub>1</sub> .....	31
6	Curva de calibración de AFG <sub>2</sub> .....	32
7	Curva de calibración de AFM <sub>1</sub> .....	33
8	Curva de calibración de AFM <sub>2</sub> .....	34
9	Curva de calibración de AFP <sub>1</sub> .....	35
10	Curva de calibración de AFL.....	36

## RESUMEN

Las Aflatoxinas (AF) son metabolitos secundarios fúngicos, tóxicos y cancerígenos producidos por cepas de mohos del género *Aspergillus* spp., principalmente *A. flavus*, *A. parasiticus* y *A. nomius*. Las AF contaminan los alimentos vegetales como son cereales, oleaginosas, especias, chiles, frutas secas, higos, etc., y cuando los animales los ingieren se biotransforman en hidroxilados de AF y aparecen en alimentos de origen animal como son pollo, huevo, vísceras, leche y productos lácteos. La presencia de Aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), en diversos alimentos es un contaminante indeseable debido a los riesgos para la salud del consumidor ya que causan hemorragias, abortos, malformaciones, inmunodepresión, hepatitis, cirrosis y son reconocidos cancerígenos Grado I, o sea probados para humanos, según la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer. Las AF que se fijan al ADN, ARN y proteínas, se llaman aductos (AFB<sub>1</sub>-ADN), se almacenan durante años y pueden causar mutaciones y eventualmente cánceres. Esta investigación tuvo como objetivo evaluar la capacidad de siete probióticos comerciales para eliminar Aflatoxinas, especialmente AFB<sub>1</sub>, con base en un modelo de digestión humana *in vitro* de la AFB<sub>1</sub>, así como conocer los tipos de AF, básico (AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub>) y sus metabolitos hidroxilados (AFM<sub>1</sub>, AFM<sub>2</sub>, AFP<sub>1</sub>) y Aflatoxicol (AFL) que resultan de la digestión de la AFB<sub>1</sub>. Los siete probióticos utilizados para controlar a las AF, no tienen el mismo efecto en las diferentes etapas de la digestión humana *in vitro*, y algunos funcionan mejor, tal es el caso de Simi Bacilos Forte que en todo el tratamiento presenta diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) con respecto al Control positivo; a un pH de 7.0, equivalente al pH de la saliva, elimina completamente la AFB<sub>1</sub>; por otro lado, a un pH 1.8, equivalente a la suma de los pH de la saliva + jugo gástrico, elimina en un 100% la AFB<sub>1</sub> y la interconvierte en otro tipo de AF no cancerígena, mientras que a pH 5.8 del colon, equivalente al pH de la saliva + jugo gástrico + jugo pancreático, mantiene sólo un 3% de concentración de AFs. Si bien, los siete probióticos no eliminan en misma cantidad las concentraciones de Aflatoxinas, las cepas probióticas convierten la AFB<sub>1</sub> en Aflatoxicol (AFL) bajando así la toxicidad de la primera, sin embargo, el AFL tiene también un efecto cancerígeno. La comprensión de los mecanismos de acción de los probióticos sobre las AF permite controlar a estos mutágenos y ayudar a la salud humana.

**Palabras clave:** Aflatoxina B<sub>1</sub>, probióticos, control.

## **ABSTRACT**

Aflatoxins (AFs) are a group of fungal, toxic and carcinogenic secondary metabolites produced by mold strains of the genus *Aspergillus* spp. AFs contaminates food (chicken, cereals, oilseeds, spices, dried fruits, milk and dairy products). The presence of AFs, such as Aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), in various foods is undesirable due to the risk for human health, because they are hepatocarcinogenic, causing miscarriages, malformations in fetuses, hemorrhages, vomits, diarrhea, hepatitis, cirrhosis and immunodepression. They can remain linked in the DNA for years and cause mutations and eventually cancers. For this reason, this research aimed to evaluate the capacity of seven commercial probiotics in the elimination of AFs, specially AFB<sub>1</sub>, based on an *in vitro* human digestion model; as well as to describe the type of basic AF (AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub>), or hydroxylated metabolites (AFM<sub>1</sub>, AFM<sub>2</sub> and AFP<sub>1</sub>) or Aflatoxicol (AFL), formed from the metabolism of AFB<sub>1</sub>. The seven studied probiotics were found to have diverse effects in the different stages of the human digestion model *in vitro*, and some of them control better, such is the case of Simi Bacilos Forte, which in all the treatment had a significant difference ( $p < 0.05$ ) with respect to the positive control; at a pH of 7.0 it completely eliminated AFB<sub>1</sub>; on the other hand, at pH 1.8 100% eliminates AFB<sub>1</sub> and converts it into another type of non-carcinogenic AF, while at pH 5.8 in colon, it maintains only a 3% concentration of AFs. Although the seven probiotics do not eliminate Aflatoxin concentrations in the same amount, probiotic strains convert AFB<sub>1</sub> in other types, mainly AFL, thus lowering toxicity. The comprehension of the mechanisms of action of probiotics on AFB<sub>1</sub> is important to understand their role in favor of human health and for the prevention of cancer.

**Keywords:** Aflatoxin B<sub>1</sub>, probiotics, control.



## I. INTRODUCCIÓN

Las Aflatoxinas son los contaminantes más frecuentes y peligrosos de los alimentos, como cereales, especias, oleaginosas, fruta seca, leche, productos lácteos, embutidos, etc. Químicamente corresponden a bis-di-hidrofurano-cumarinas y son consideradas contaminantes inevitables de alimentos por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) (Urrego y Díaz, 2006).

Las Aflatoxinas son metabolitos secundarios de los hongos micromicetos *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* y *A. nomius* principalmente (Carrillo, 2003), pero también *A. pseudotamarii* y *A. bombycis* (Cabañes *et al.*, 2007) y se consideran cancerígenos Grado I, probados para humanos (IARC, 2002). Se fijan al ADN, ARN y a proteínas, y afectan a todos los seres vivos, desde virus hasta el hombre. Afectan al ADN, son mutágenos, teratógenos, cancerígenos, inmunodepresores, causan hemorragias internas, vómitos, diarreas, hepatitis y cirrosis (Soriano del Castillo, 2007).

La Aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) es el compuesto más tóxico y más prevalente (Gratz, 2007), también la más estudiada debido a sus efectos cancerígenos y citotóxicos. Además, es el más potente cancerígeno hepático de origen natural conocido (Ornelas-Aguirre y Fimbres-Morales, 2015). Por lo tanto, es importante prevenir y reducir la formación de Aflatoxinas o su biodisponibilidad en los alimentos para prevenir efectos dañinos (Gratz, 2007).

Actualmente se estudian microorganismos probióticos, como las bacterias probióticas de ácido láctico, principalmente de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* por su potencial para degradar las Aflatoxinas y/o reducir su biodisponibilidad (Moreno *et al.*, 2016; Gratz, 2007).

Por lo anterior, la presente investigación tiene por objetivo comparar la eficacia de siete probióticos comerciales sobre la reducción de la Aflatoxina B<sub>1</sub> con base en un modelo de digestión humana *in vitro*.

## II. MARCO TEÓRICO

### II.1. Micotoxinas

La palabra micotoxina deriva de las palabras griegas *mikes* y *toxina* que significan hongo y veneno, respectivamente (Soriano del Castillo, 2007). Las micotoxinas son producidas por cepas de hongos filamentosos como *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*, y forman un grupo de fundamental importancia como contaminantes biológicos (Arrúa *et al.*, 2013) ya que invaden cultivos en el campo, durante el almacenamiento, transporte y productos derivados. Se estima que las micotoxinas afectan anualmente más del 25% de los cultivos en el mundo (Lawlor y Lynch, 2005; Okoli, *et al.*, 2006).

Las micotoxinas pueden contaminar los alimentos o las materias primas utilizadas para su elaboración, y causan micotoxicosis en el hombre y los animales (Gilbert y Anklam, 2002; Binder, 2007) y se presentan con una sintomatología variada (Arrúa *et al.*, 2013). Causan enfermedades en los vertebrados cuando se introducen por alguna vía natural, ya sea ingeridos, absorbidos a través de la piel o inhalados (Frisvad *et al.*, 2007). La presencia de micotoxinas en los alimentos puede ser individual o simultánea con otras, lo que puede provocar efectos sinérgicos sobre el organismo, aumentando así su toxicidad (Soriano del Castillo, 2007). Una micotoxicosis primaria en humanos se produce en forma directa al consumir vegetales contaminados, mientras que la micotoxicosis secundaria se produce en forma indirecta al ingerir carne o leche de animales que comieron forrajes contaminados por micotoxinas (Carrillo, 2003). El crecimiento del hongo y la producción de micotoxinas, son consecuencia de la interacción entre el hongo, el hospedante y el ambiente. La combinación de estos factores determina la colonización del sustrato, así como el tipo y concentración de la micotoxina producida (Pitt *et al.*, 2000). Cuando hay niveles elevados de micotoxinas en la dieta, pueden causar efectos adversos agudos y crónicos sobre la salud del hombre y una gran variedad de animales. Estos efectos pueden afectar a distintos órganos, aparatos o sistemas, especialmente al hígado, riñón, sistema nervioso, endocrino e inmunitario (Ruiz y Front, 2007).

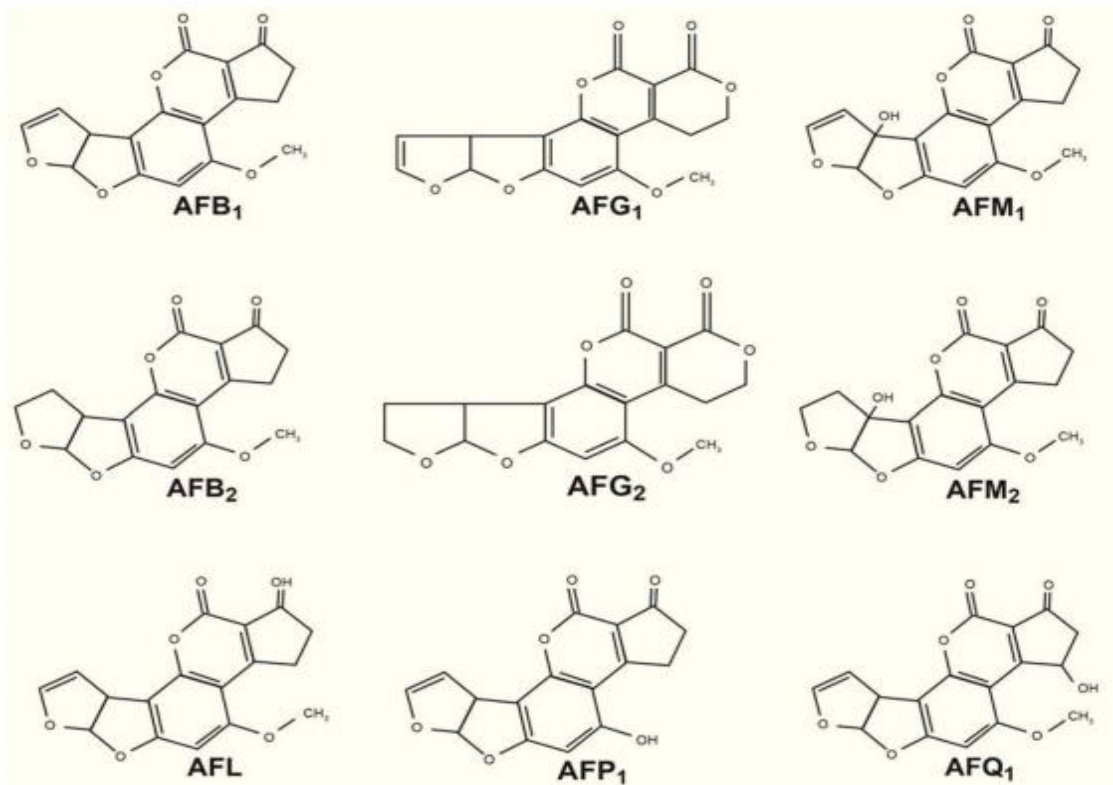
Se tienen identificadas más de 300 micotoxinas (Arrúa *et al.*, 2013) producidas por unas 350 especies de hongos, pero la mayoría de las toxinas de importancia se asocian a alimentos para animales (Bauza, 2007). Las especies de *Penicillium spp* y *Aspergillus spp.* se encuentran como contaminantes de productos básicos y alimentos durante el secado y almacenamiento, mientras que las especies de *Fusarium* son patógenos destructivos de las plantas que producen micotoxinas antes o después de la cosecha (Soriano del Castillo, 2007).

Las AF son las micotoxinas más peligrosas debido a su alta toxicidad, y a sus propiedades cancerígenas, teratógenas, inmunosupresoras y hepatotóxicas (Eaton y Gallagher, 1994; Pariza, 1996).

## **II.2. Aflatoxinas**

### **II.2.1. Definición y estructura química**

La palabra “Aflatoxina” proviene de A = *Aspergillus*, fla = *flavus* y toxina = veneno (Steyn *et al.*, 1980). Las Aflatoxinas (AF), que corresponden químicamente a las bis-dihidrofurano-cumarinas, son metabolitos secundarios de bajo peso molecular producidos por cepas toxicogénicas principalmente de los hongos *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* y *A. nomius* (Bogantes *et al.*, 2004). Se forman al final de la fase exponencial o al principio de la fase estacionaria del crecimiento del hongo (Soriano del Castillo, 2007). Se desarrollan en gran variedad de sustratos, y contaminan los alimentos cuando son cultivados, procesados, transformados o almacenados en condiciones adecuadas que favorezcan al desarrollo fúngico; es decir, el crecimiento de estos hongos y la producción de toxinas depende mucho de los factores ambientales (Bhatnagar *et al.*, 2003; Sodhi *et al.*, 2005).



**Figura 1.** Estructura química de las Aflatoxinas básicas (Sweeney y Dobson, 1999; Soriano del Castillo, 2007))

Las AF son toxinas inodoras, insípidas e incoloras. Químicamente, son estables en los alimentos y termo-resistentes, por lo tanto, no se degradan bajo cocción normal, y es difícil eliminarlas una vez que se producen (Ornelas-Aguirre y Fimbres-Morales, 2015).

### II.3. Propiedades fisicoquímicas de las Aflatoxinas

Las AFs exhiben una intensa fluorescencia al exponerse a la luz UV de onda larga, y se pueden detectar en trazas de alrededor de 0.5 ng cromatografía de capa fina. Son solubles en solventes no polares o medianamente polares como el cloroformo y metanol, especialmente en dimetilsulfóxido, y son insolubles en agua (OPS, 1983) (Cuadro 1).

Las AFs son termo-resistentes y estables a temperaturas elevadas, hasta 260°C la AFB<sub>1</sub> y llegando a 320°C la AFM<sub>1</sub>. Sin embargo, son inestables cuando son expuestas a la luz, especialmente a la radiación UV (OPS, 1983).

Las AFs resisten la cocción, fermentación, pasteurización, ultrapasteurización y la nixtamalización; sin embargo, pueden ser destruidas por calentamiento en autoclave en presencia de amoníaco o hipoclorito de sodio. Cuando las AFs se ponen en contacto con un pH alcalino, el anillo de lactona se abre y pierde la fluorescencia, esto hace pensar que no hay AFs, sin embargo, el anillo de lactona se recupera con un pH ácido, como el del ácido gástrico, y al regresar a un pH neutro, como sucede con el jugo pancreático en el intestino humano, fluorescen otra vez (Carvajal, *et al.*, 2000).

Las AFs tienen diferentes propiedades fisicoquímicas como la fluorescencia y la termo-resistencia. Se conocen varios tipos de AF, pero sólo algunas son contaminantes naturales de alimentos. Las cuatro principales AFs se les conocen como Aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), Aflatoxina B<sub>2</sub> (AFB<sub>2</sub>), Aflatoxina G<sub>1</sub> (AFG<sub>1</sub>) y Aflatoxina G<sub>2</sub> (AFG<sub>2</sub>) (Carballo y de Miguel, 1987). Las letras B y G se refieren al color de la fluorescencia observada bajo luz UV de onda larga; las de tipo B tiene fluorescencia azul (=blue) y las de tipo G emiten fluorescencia color verde (=green); mientras que los subíndices 1 y 2 indican la velocidad de corrimiento en un cromatograma de capa fina. De estas, la AFB<sub>1</sub> y AFG<sub>1</sub> se presentan con mayor frecuencia (Carrillo, 2003). Las Aflatoxinas B<sub>2</sub> y G<sub>2</sub> son derivados de las Aflatoxinas B<sub>1</sub> y G<sub>1</sub> (Liu y Wu, 2010). La AFG<sub>2</sub> es la menos tóxica de las cuatro principales AF naturales (Canestrari *et al.*, 2016). Aun cuando se han identificado más de 18 diferentes Aflatoxinas, solamente AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> y AFG<sub>2</sub>, han sido detectadas como contaminantes naturales de alimentos como harina de maíz, arroz y otros cereales, así como también de oleaginosas (Sogbe *et al.*, 2005).

**Cuadro 1.** Propiedades físicoquímicas de las Aflatoxinas y sus metabolitos (OPS, 1983).

Aflatoxina	Fórmula molecular	Masa molecular relativa	Temperatura de fusión (°C)	Absorción ultravioleta (€) <sup>c</sup>		Emisión de fluorescencia (nm)	Referencia
				265 nm	360-362 nm		
B <sub>1</sub> <sup>a</sup>	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	312	269-269	12400	21800	425	Asao <i>et al.</i> (1965)
B <sub>2</sub> <sup>a</sup>	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	314	286-289	12100	24000	425	Chang <i>et al.</i> (1963)
G <sub>1</sub> <sup>a</sup>	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	328	244-246	9600	17700	450	Asao <i>et al.</i> (1965)
G <sub>2</sub> <sup>a</sup>	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	330 <sup>d</sup>	237-240 <sup>d</sup>	8200	17100	450	Hartley <i>et al.</i> (1963)
M <sub>1</sub> <sup>a</sup>	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	328	299	14150	21250	425	Holzapfel <i>et al.</i> (1966)
M <sub>2</sub> <sup>a</sup>	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	330	293	12100	22900	- <sup>f</sup>	Holzapfel <i>et al.</i> (1966)
P <sub>1</sub> <sup>b</sup>	C <sub>16</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	298	>320	11200	15400	- <sup>f</sup>	Dalezios <i>et al.</i> (1971) y Buche <i>et al.</i> (1973)
Q <sub>1</sub> <sup>a</sup>	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	328	- <sup>e</sup>	11450	17500	- <sup>f</sup>	Masriet <i>et al.</i> (1974)
AFL	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	314	230-234 <sup>d</sup>	10800	14100	425	Detroy y Hesseltine (1970)

<sup>a</sup> El coeficiente de absorción molar de las Aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub> se obtuvo de Rodricks *et al.* (1970) y el correspondiente a las Aflatoxinas M<sub>1</sub> y M<sub>2</sub> de Stubblefield *et al.* (1972).

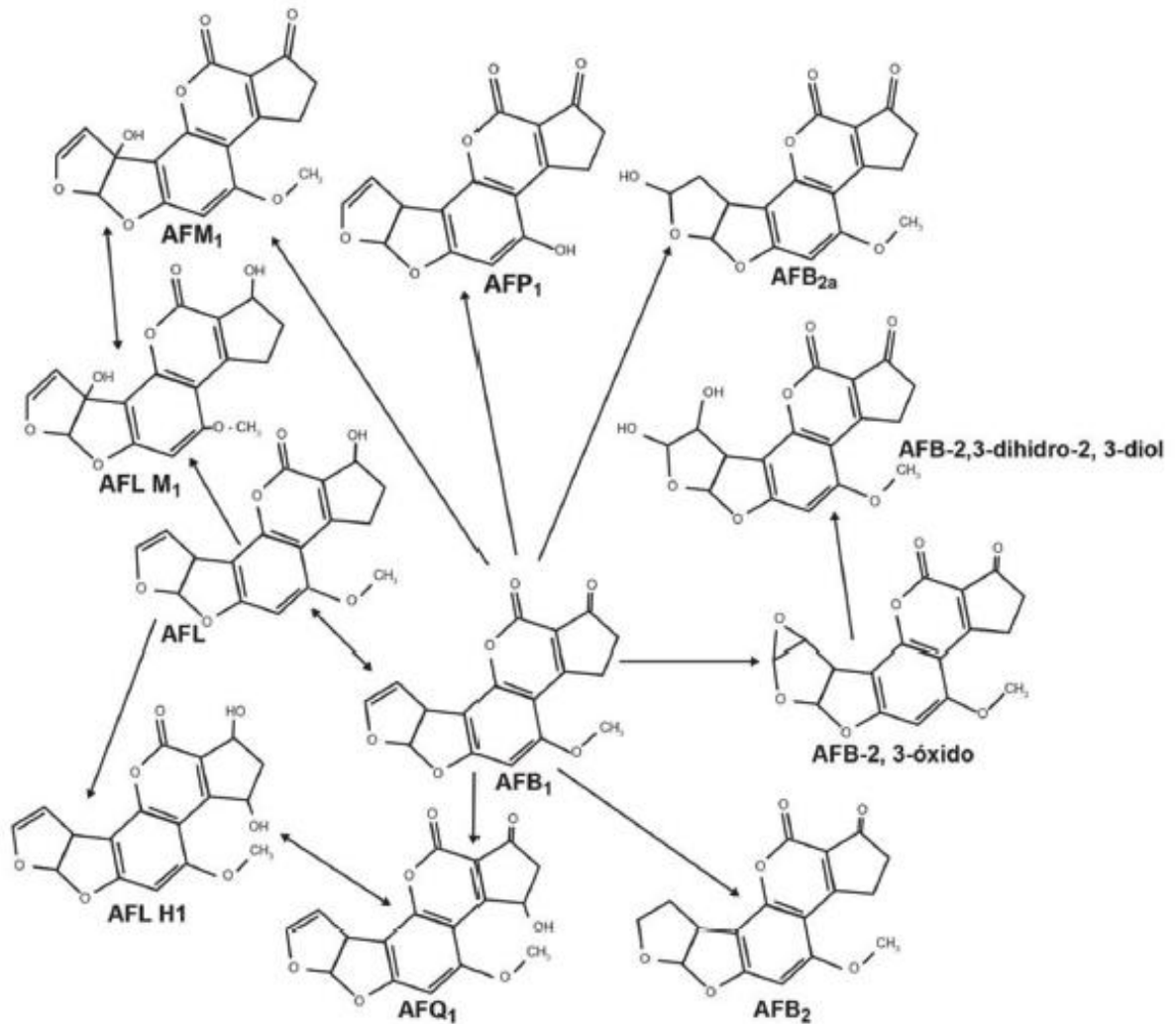
<sup>b</sup> La P indica los productos fenólicos de la O-desmetilación de la Aflatoxina B<sub>1</sub>.

<sup>c</sup> Compuestos disueltos en metanol, excepto la Aflatoxina P<sub>1</sub> que se disolvió en etanol.

<sup>d</sup> Datos de Butler (1974).

<sup>e</sup> No disponible

Las Aflatoxinas M<sub>1</sub> (AFM<sub>1</sub>), Aflatoxina M<sub>2</sub> (AFM<sub>2</sub>), Aflatoxina P<sub>1</sub> (AFP<sub>1</sub>), Aflatoxina Q<sub>1</sub> (AFQ<sub>1</sub>) y Aflatoxicol (AFL), son productos del metabolismo microbiano o de animales. La AFM<sub>1</sub> y AFM<sub>2</sub> son productos metabólicos oxidativos de la AFB<sub>1</sub> y AFB<sub>2</sub> y también son producidas por los animales después de la ingestión. El AFL es un metabolito reductor de la AFB<sub>1</sub> (Canestrari *et al.*, 2016) y se interconvierte con la AFB<sub>1</sub> (Figura 2).



**Figura 2.** Ruta de biotransformación de la AFB<sub>1</sub> (Eaton *et al.*, 1994).

#### I.4. Efectos de las Aflatoxinas en la salud humana

Las AF se clasifican como cancerígenos Grupo 1, probados para humanos, por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC, 2002). El nivel bajo de exposición a la AF está relacionado con el desarrollo de afecciones "ocultas", como el deterioro del crecimiento y la función inmunológica, y enfermedades crónicas como el cáncer de hígado en áreas donde predomina la AFB<sub>1</sub> (Gratz, 2007).

Estas sustancias son capaces de causar diversas alteraciones y cuadros patológicos en el hombre y los animales (Reyes *et al.*, 2009), producen toxicidad y cáncer de hígado. Además, toxicológicamente se consideran toxinas potentes, relacionadas con la génesis del cáncer, mutaciones puntuales y múltiples alteraciones en el desarrollo fetal (Bogantes *et al.*, 2004). Por lo tanto, es de gran interés prevenir la formación de Aflatoxinas o reducir su biodisponibilidad de los alimentos para prevenir efectos dañinos (Gratz, 2007).

Diversos factores contribuyen a la contaminación de alimentos y piensos por AFs, como lo son los ambientales y socioeconómicos. Las condiciones ambientales de alta humedad y temperatura favorecen el crecimiento de los mohos y por ende, la contaminación de alimentos y piensos por AFs. El consumo de alimentos contaminados con AFs predispone a diversas enfermedades (Wagacha y Muthomi, 2008). La forma más frecuente es la intoxicación crónica, por el consumo de alimentos contaminados con trazas de AF durante años. Algunos de los efectos de la intoxicación crónica incluyen inmunosupresión, abortos, malformaciones de fetos, hemorragias, vómitos, diarreas, deficiencia en el crecimiento, presencia de algunos tipos de cáncer y muerte dependiendo del tiempo de consumo y de las cantidades ingeridas de alimentos contaminados (Gong, *et al.*, 2004).

La AFB<sub>1</sub> es un contaminante común de los alimentos y la exposición en humanos y animales se produce principalmente a través de la vía oral (Cullen y Newberne, 1994). La exposición del hombre a las Aflatoxinas es continuo ya que se encuentran en cereales (maíz, arroz, trigo, cebada, sorgo, avena y en productos derivados de ellos como lo son las tortillas, la pasta, harinas y cereales para el desayuno), en semillas oleaginosas (nuez, almendra, cacahuate, pistaches, avellanas, semillas de girasol, etc), en especias (chiles, comino, pimienta y otros condimentos), higo, frutas secas (OPS, 1983) así como derivados de origen animal como son el huevo, lácteos (quesos, crema, leche, yogurt), pollo, salami, embutidos, así como también en cervezas (Carvajal-Moreno, 2013).

La AFB<sub>1</sub> se absorbe de manera eficiente en el intestino delgado, el duodeno es el principal sitio de absorción (Hsieh y Wong, 1994) y es transportada por los glóbulos rojos y las proteínas plasmáticas hasta el hígado (Fernandes *et al.*, 2010), que es el sitio



predominante del metabolismo de la AFB<sub>1</sub> (Wild y Montesano, 2009). La toxina entra en la célula y es metabolizada para ser hidroxilada y transformada en varios metabolitos como AFP<sub>1</sub>, AFM<sub>1</sub>, y AFQ<sub>1</sub> (Fernández *et al.*, 2000). La AFB<sub>1</sub> también se considera el principal hepatocancerígeno en animales, aunque los efectos varían según la especie, la edad, el sexo y las condiciones nutricionales generales (Binder, 2007).

Los animales de la industria pecuaria son víctimas de los daños por la AFB<sub>1</sub>, de allí que se hayan estudiado las alteraciones clínicas y los cambios morfológicos en los órganos de los animales que han consumido alimento contaminado (Dilkin *et al.*, 2003).

## **II.5. Probióticos**

### **I.5.1. Definición e importancia**

A principios del siglo XX, el microbiólogo ruso, Elie Metchnikoff postuló que las bacterias ácido-lácticas (BAL) conferían beneficios a la salud capaces de promover la longevidad modificando la microbiota intestinal (WGO, 2011). En su hipótesis planteaba que los procesos de putrefacción en el intestino posibilitan la formación de toxinas que contribuían a la degeneración del cuerpo y propuso que el consumo de bacterias ácido lácticas en la leche fermentada podía disminuir los efectos adversos de estas toxinas, reduciendo así los procesos dañinos en el organismo (Manzano *et al.*, 2012).

En 1930, el Dr. Minoru Shirota aisló de heces humanas una cepa de *Lactobacillus casei* que posteriormente cultivó en un medio lácteo para originar una bebida con probióticos (Manzano *et al.*, 2012).

El término “probióticos” se definió como factor de origen microbiano que estimula la proliferación de otros microbios. Fue introducido por Lilly y Stillwell (1965) y Roy Fuller (1989), consideró que para considerarse probiótico, el microorganismo debía estar presente vivo, con su efecto benéfico al huésped (WGO, 2011).

Los probióticos son microbios vivos benéficos que viven en el intestino y mejoran la salud del hospedante, facilitando la digestión y la absorción de nutrientes, y fortalecer el sistema inmunológico (Oliveira y González-Molero, 2007). Algunos de los beneficios de los probióticos para el consumidor, destacan, mejoría en enfermedades infecciosas, enfermedades crónicas intestinales tales como colitis ulcerosa y gastritis, biodisponibilidad de nutrientes, enfermedades cardiovasculares, diabetes mellitus, obesidad, osteoporosis y cáncer (Marteau *et al.*, 2001; Saavedra 2001). Las bacterias ácido lácticas pueden agregarse a la fórmula de muchos diferentes tipos de productos, incluyendo alimentos, medicamentos y suplementos dietéticos (Oliveira y González-Molero, 2007).

## II.6. Bacterias Ácido Lácticas (BAL)

Las BAL más utilizadas para la preparación de probióticos para el consumo humano, entre las que se encuentran las siguientes especies: *Lactobacillus acidophilus*, *L. plantarum*, *L. casei*, *L. caseis prhamnosus*, *L. fermentum*, *L. reuteri*, *Bifidobacterium bifidum*, *B. infantis*, *B. adolescentis*, *B. longum*, *B. breve*, *B. lactis*, *Enterococcus aecalis*, *E. faecium*, *Lactococcus lactis*, entre otras (Conway, 1996).

### ***Lactobacillus acidophilus***

Fue aislado por primera vez por Moro, en 1900, a partir de heces infantiles y se caracteriza por ser una barra Gram-positiva, crece de manera óptima de 37 °C a 42 °C y es el cultivo probiótico más ampliamente reconocido y distribuido comercialmente (González *et al.*, 1989).

*L. acidophilus* es una cepa probiótica disponible en alimentos y suplementos alimenticios para humanos y ha sido ampliamente investigada por sus propiedades fisiológicas, bioquímicas, genéticas y fermentativas importantes para la funcionalidad probiótica humana (Sanders y Klaenhammer, 2001; Altermann *et al.*, 2004).

### ***Bifidobacterium lactis***

Es una cepa prebiótica con propiedades inmunoestimulantes en humanos (Arunachalam *et al.*, 2000). La suplementación con *B. lactis* mejora la función inmune celular y la fagocitosis de leucocitos (Gill *et al.*, 2001)

## **II.7. Control de Aflatoxinas con probióticos**

Se han utilizado muchos métodos para controlar y disminuir la contaminación de alimentos y piensos con AFs. La eliminación con métodos químicos y físicos tiene algunas desventajas que limitan su uso. Por ejemplo, la insuficiencia de eliminación de toxinas, los altos costos y la pérdida del valor nutricional del producto (Line y Brackett, 1995; El-Nezami *et al.*, 1998a).

Las bacterias se han estudiado por su potencial para degradar las micotoxinas y/o reducir su biodisponibilidad (Gratz, 2007). Las bacterias probióticas del ácido láctico son los microorganismos más importantes asociados al tracto gastrointestinal y son ampliamente utilizados en la industria alimentaria por sus efectos benéficos para la salud humana (Kazemi *et al.*, 2014). Los probióticos reducen la disponibilidad de Aflatoxinas (Topcu *et al.*, 2010).

Algunas cepas de bacterias probióticas se unen a la Aflatoxina, aunque su mecanismo de acción se desconoce, se sugiere una unión física, una adsorción a los componentes bacterianos de la pared celular (polisacáridos y péptidoglicanos) (Kazemi *et al.*, 2014). El-Nezami *et al.*, (1998b) demostraron que los lactobacilos probióticos tienen la capacidad de eliminar las Aflatoxinas de los medios líquidos contaminados.

## **II.8. Validación del método**

### **II.8.1. Límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ)**

El LOD es igual a la concentración del analito (AF) que proporcione una señal 3 veces superior a la señal del ruido. Es la cantidad mínima de analito que puede ser detectada, aunque no necesariamente cuantificada con precisión y exactitud. El LOQ es igual a la concentración de analito (AF) que proporcione una señal 10 veces superior a la señal del ruido (Cruz-Rueda, 2016). Corresponde a la cantidad mínima de analito que puede determinarse cuantitativamente con una adecuada exactitud y precisión.

### **II.8.2. Linealidad**

Es la capacidad para poder obtener resultados que son correspondientes a la concentración del analito (componente de una muestra que se desea analizar) dentro de un rango dado (Cruz-Rueda, 2016).

### III. OBJETIVOS

Comparar la eficacia de siete probióticos comerciales sobre el control *in vitro* de la Aflatoxina B<sub>1</sub> con base en un modelo de digestión humana *in vitro*.

Identificar el tipo de Aflatoxina (AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub>, AFM<sub>1</sub>, AFM<sub>2</sub> y AFL) resultado de la digestión *in vitro* de la Aflatoxina B<sub>1</sub>.

#### IV. METODOLOGÍA

Con objeto de obtener algunos de los probióticos más consumidos, se consideró comprar los que se venden en forma comercial que fueron 7 (Cuadro 2).

**Cuadro 2.** Probióticos utilizados para reducir la biodisponibilidad de la AFB<sub>1</sub>.

Probiótico (marca)	Cantidad (mg mL <sup>-1</sup> )	Especies de bacterias contenidas	UFC*
Probiotix (Bioleven)	350 mg	<b><i>Lactobacillus acidophilus</i></b> <i>Bifidobacterium lactis</i> <i>Bifidobacterium infantis</i> <i>Bifidobacterium breve</i> <b><i>Lactobacillus rhamnosus</i></b> <i>Lactobacillus paracasei</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Bifidobacterium adolescentis</i> <i>Bifidobacterium bifidum</i> <b><i>Bifidobacterium longum</i></b>	30 billones
Sinuberase	550 mg	<i>Lactobacillus sporogenes</i>	1x10 <sup>6</sup>
Simi bacilos Forte	590 mg	<b><i>Lactobacillus acidophilus</i></b> <b><i>Bifidobacterium longum</i></b> <b><i>Lactobacillus rhamnosus</i></b>	1000 millones 333 millones 333 millones
Natural Wisdom	500 mg	<b><i>Bifidobacterium longum</i></b> <b><i>Lactobacillus acidophilus</i></b> <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus licheniformis</i>	1x10 <sup>9</sup>
Digestive Flora	450 mg	<i>Lactobacillus sporogenes</i>	100 millones
Enterogermina	de 5 mL	<i>Bacillus clausii</i>	2 billones
Probioptal	75 mg	<b><i>Lactobacillus acidophilus</i></b>	1x10 <sup>9</sup>

\*UFC (Unidad Formadora de Colonias)

## IV.1. Diseño experimental

### IV.2. Preparación de 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de AFB<sub>1</sub>

Se preparó la solución base de 1000 ng mL<sup>-1</sup> de AFB<sub>1</sub>. Para esto, se midió la absorbancia que da la concentración estándar con el uso de un espectrofotómetro (Genesys 10 UV).

Para ajustar el espectrofotómetro, se colocó metanol puro en una celda de cuarzo, el cual se utilizó como blanco. Posteriormente, se vertió solución de AFB<sub>1</sub> dentro una segunda celda de cuarzo, y se midió la absorbancia a 360 nm en el espectrofotómetro. La absorbancia estándar se obtuvo para hacer una concentración de 1000  $\mu\text{L}$  de AFB<sub>1</sub> y metanol (MeOH), la cual se calculó de la siguiente manera:

$$\text{Concentración de } 1000 \mu\text{L} = \frac{\text{Absorbancia} \times \text{Peso Molecular}}{\text{Coeficiente de extinción}}$$

Sustituyendo:

$$\text{Concentración de } 1000 \mu\text{L} = \frac{0.200 \times 312}{21800}$$

Posteriormente se obtuvo un inverso de la concentración, el resultado fue la cantidad de AFB<sub>1</sub> en microlitros ( $\mu\text{L}$ ) necesarios para preparar una solución de 1000  $\mu\text{L}$  de AFB<sub>1</sub> y la cantidad faltante para completar 1000  $\mu\text{L}$ , se completó con metanol.

Por último, la solución preparada se colocó en un vial de 5 mL y se homogeneizó en un agitador orbital (Vortex G-560).

#### IV.1.2. Tratamientos para reducir la AFB<sub>1</sub> con la digestión humana *in vitro*

Se utilizó la secuencia de digestión *in vitro* publicada por (Moctezuma-Zárate *et al.*, 2015) que considera tres pasos en la digestión según su pH y resumida a continuación:

- a) Agua destilada con pH de 7.0 (Equivalente a la exposición a saliva)

- b) Agua destilada con pH de 1.8 (Equivalente a la exposición a saliva + jugo gástrico)
- c) Agua destilada con pH de 5.8 (Equivalente a la exposición a saliva + jugo gástrico + jugo pancreático).

El pH se ajustó con hidróxido de sodio (NaOH) y ácido clorhídrico (HCl).

Para la digestión *in vitro* se colocaron 100 ng de la solución base en 45 tubos de ensayo para el control positivo, control negativo y el tratamiento y se pusieron a secar las muestras en una estufa por 24 horas. Ya secas las muestras, se realizó en forma independiente de la siguiente manera:

1. Control Positivo: 100 ng de AFB<sub>1</sub> + 5 mL de agua destilada con cada pH (7.0, 1.8 y 5.8).
2. Control negativo: Sin AFB<sub>1</sub>. Una cápsula/ampolleta de probiótico + 5 mL de agua destilada, con cada pH (7.0, 1.8 y 5.8).
3. Tratamiento: mezcla una cápsula/ampolleta de probiótico + 100 ng de AFB<sub>1</sub> + 1 mL de DMSO al 1% + 100 uL de Tween 20 + 5 mL de agua destilada, con cada pH (7.0, 1.8 y 5.8).

Las muestras tratadas con pH 7.0 se dejaron reposar 1 minuto, las muestras de pH 1.8 se dejaron reposar 2 horas y las muestras con pH 5.8 se dejaron reposar por 5 horas. Pasado el tiempo, se centrifugaron las muestras (ALC 4235 centrifuge CWS) y se retuvo el sobrenadante para posteriormente extraer las Aflatoxinas.

#### **IV.1.3. Extracción química de las Aflatoxinas**

Se utilizaron 45 columnas de inmunoafinidad para Aflatoxinas totales (AFt) (Easi Extract Immunoaffinity column R-Biopharm Rhône LTD Code: RP 71/ RP70N) para que las Aflatoxinas quedaran atrapadas en el gel de agarosa (21 columnas se utilizaron para cada muestra del control negativo, 3 para las muestras del control positivo y 21 para las muestras del tratamiento). En cada columna, se pasaron 20 mL de PBS, posteriormente se pasó la muestra (el sobrenadante obtenido de la centrífuga) y por último, se realizó un lavado con



20 mL de agua destilada para eliminar cualquier rastro de colorantes o impurezas de la columna. Se secó al pasar aire por el gel de agarosa de la columna.

Finalmente, se eluyó con 1.5 mL de metanol grado HPLC (J. T. Baker MeOH N° Cat. 67-56-1), el cual ayuda a separar las Aflatoxinas de los anticuerpos (contenidos en el gel de agarosa), y posteriormente se añadieron 1.5 mL de agua destilada con reflujo, es decir, se jaló el émbolo de la jeringa tres veces para romper y desnaturalizar todo el gel de agarosa con los anticuerpos contra Aflatoxinas, y que pasara al eluído todas las Aflatoxinas unidas a él. La solución eluida se vertió en un vial ámbar para proteger las Aflatoxinas de la luz y se pusieron a secar en un horno.

#### **IV.1.4. Derivatización**

Para la derivatización de los eluidos secos de las muestras, se suspendieron con 200  $\mu$ L de acetonitrilo y para aumentar su fluorescencia se adicionaron 800  $\mu$ L de solución derivatizante. La solución derivatizante se preparó con 5 mL de ácido trifluoroacético (ATM) (Sigma-Aldrich, St) + 2.5 mL de ácido acético glacial + 17.5 mL de agua desionizada. Se agitó por 30 segundos. Los viales se pusieron a baño María a 65°C por 10 minutos como lo describen Akiyama *et al.* (2001) y Kok (1994). Posteriormente se llevaron a temperatura ambiente.

#### **IV.1.5. Cuantificación de AFs por cromatografía de líquidos**

Se inyectaron 200  $\mu$ L en un inserto dentro de un vial, de donde la aguja inyectora del cromatógrafo de líquidos con loop de 100  $\mu$ L, tomó 60  $\mu$ L de cada una de las muestras, por triplicado, para el análisis.

Posteriormente, se realizó el análisis para la cuantificación de AFB<sub>1</sub> obtenidas de las muestras, el cual se llevó a cabo en un equipo HPLC (Cromatografía líquida de alta eficacia, por sus siglas en inglés) (Series 1200), con bomba isocrática (G1310A Serie DE62957044), detector de fluorescencia (G1321A Serie DE60456380) y automuestreador (G1329A Serie

DE64761666), todos de Agilent Technologies; con una columna cromatográfica Agilent Eclipse XDS-C18, 4.6x250 mm de 5 µm de grosor de partícula. El programa que se utilizó fue Chem Station 32.

Las condiciones del análisis se llevaron a cabo según la OPS (1983):

- Fase móvil H<sub>2</sub>O/MeOH/ACN (65:20:15)
- Inyección de 60 µL
- Flujo de 1 mL/min.
- Tiempo de análisis: 30 min.
- Longitud de onda de excitación de 360 nm.
- Longitud de onda de emisión de 425 y 450 nm.

## **IV.2. Validación del método**

El procedimiento de validación del método se realizó de acuerdo con la AOAC (2005). Para validar, se consideraron los criterios de Linealidad (curvas de calibración), límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ) y porcentaje de recuperación.

### **IV.2.1. Linealidad**

Para esto, se partió de una solución estándar de cada una de las AFs a estudiar (AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub>, AFM<sub>1</sub>, AFM<sub>2</sub>, AFP<sub>1</sub> y AFL), se obtuvo la absorbancia que da la concentración de los estándares con el uso el espectrofotómetro (Genesys 10 UV Thermo Electro Corporation UV/Vis).

Los estándares de AF en su vial original, se disolvieron en una solución de 1 mL de benceno (Merck, Naucalpan, Edo. Mex., México): acetonitrilo (98:2 v/v), de acuerdo a las indicaciones sugeridas por los Métodos Oficiales AOAC 970.43 para micotoxinas (AOAC, 2005) y se homogeneizó en un agitador orbital (Vortex G-560, Bohemia, NY, USA), y posteriormente se realizaron las curvas de calibración.

## Curvas de calibración

Para hacer cada curva de calibración se hicieron doce concentraciones a partir de las soluciones patrón o stock de  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  de los estándares de AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub>, AFM<sub>1</sub>, AFM<sub>2</sub>, AFP<sub>1</sub> y AFL por separado y se escogieron un mínimo de 4 puntos para hacer la línea de tendencia. Los viales con las diferentes diluciones de cada AF se pusieron a evaporar a sequedad en un horno a 40°C (Novatech BTC-9100), se derivatizaron resuspendiendo en 200  $\mu\text{L}$  de acetonitrilo, a este volumen se le adicionaron 800  $\mu\text{L}$  de solución derivatizante, se agitó la mezcla en un agitador orbital (Vortex G-560, Bohemia, N.Y., EEUU) por 30 segundos.

Los viales se mantuvieron en baño María a 65 °C por 10 minutos según describen Kok (1994) y Akiyama *et al.* (2001). Finalmente, se inyectaron 60  $\mu\text{L}$  por triplicado en el HPLC, para cuantificar. Con base en las áreas obtenidas y las concentraciones de las diferentes diluciones, se obtuvieron las ecuaciones de cada curva de calibración y los coeficientes de correlación con el programa Excel.

### IV.3. Análisis estadísticos

El nivel de concentración de Aflatoxinas restantes después de aplicarle el tratamiento, fue resumido en mediana y rango (los valores mínimo y máximo) para cada una de las diferentes etapas de la digestión humana *in vitro*. La concentración de Aflatoxinas entre los siete probióticos estudiados (Digestive Flore, Enterogermina, Probiotics Natural Wisdom, Probiotix, Probioptal, Simi Bacilos y Sinuberase), así como entre los siete probióticos y control positivo fue comparada por medio de la prueba de Kruskal-Wallis, debido al número de réplicas y la falta de compatibilidad del supuesto de la normalidad del análisis de varianza paramétrica. Con las Aflatoxinas que presentaron la diferencia entre probióticos más el control positivo (AFB<sub>1</sub>, AFL y AF totales) se realizó un procedimiento de comparación múltiple por medio del método de Dunn con control para rangos unidos. Para esta comparación que incluye el control positivo, éste fue utilizado como control.

La Aflatoxina B<sub>2</sub>, Aflatoxina G<sub>1</sub>, Aflatoxina G<sub>2</sub>, Aflatoxina M<sub>1</sub>, Aflatoxina M<sub>2</sub> y Aflatoxina P<sub>1</sub>, se compararon entre ellas, debido a la ausencia de AFs en el control positivo; se eligió arbitrariamente uno de los probióticos que presentaron la ausencia total de AFs (Digestive Flore) con el fin de detectar el probiótico que presentara el nivel de control diferente a cero.

El nivel de significancia estadística fue establecido como  $P < 0.05$ . Todos los análisis estadísticos fueron llevados a cabo con el uso del paquete estadístico JMP11 de SAS Institute, Inc.

## V. RESULTADOS

### V.1. Validación del método

Con la recopilación y el análisis de datos obtenidos con la experimentación, se comprobó que el método de detección y cuantificación de AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub>, AFM<sub>1</sub>, AFM<sub>2</sub>, AFP<sub>1</sub> y AFL en las muestras de probióticos de la Ciudad de México por el método de cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC) cumple con los requisitos para el análisis de las muestras.

#### Linealidad

A partir de los resultados obtenidos en los cromatogramas para cada repetición de AF, se obtuvieron las curvas de calibración, donde se tomó en cuenta el tiempo de retención de cada AF para poder obtener el Área, el límite de LOD y el LOQ (Cuadro 3).

**Cuadro 3.** Rangos de límites de detección para cada AF por pruebas de linealidad.

Aflatoxina	LOD (ng g <sup>-1</sup> )	Rango TR	R <sup>2</sup>
AFB <sub>1</sub>	0.5	7.085-8.849	0.9986
AFB <sub>2</sub>	0.05	17.452-20.228	0.9817
AFG <sub>1</sub>	0.5	7.681-9.541	0.9898
AFG <sub>2</sub>	0.5	11.215-14.513	0.9946
AFM <sub>1</sub>	0.05	2.920-3.024	0.9917
AFM <sub>2</sub>	0.05	20.208-22.447	0.9946
AFP <sub>1</sub>	0.05	15.563-19.318	0.9960
AFL	0.01	3.032-5.569	0.9978

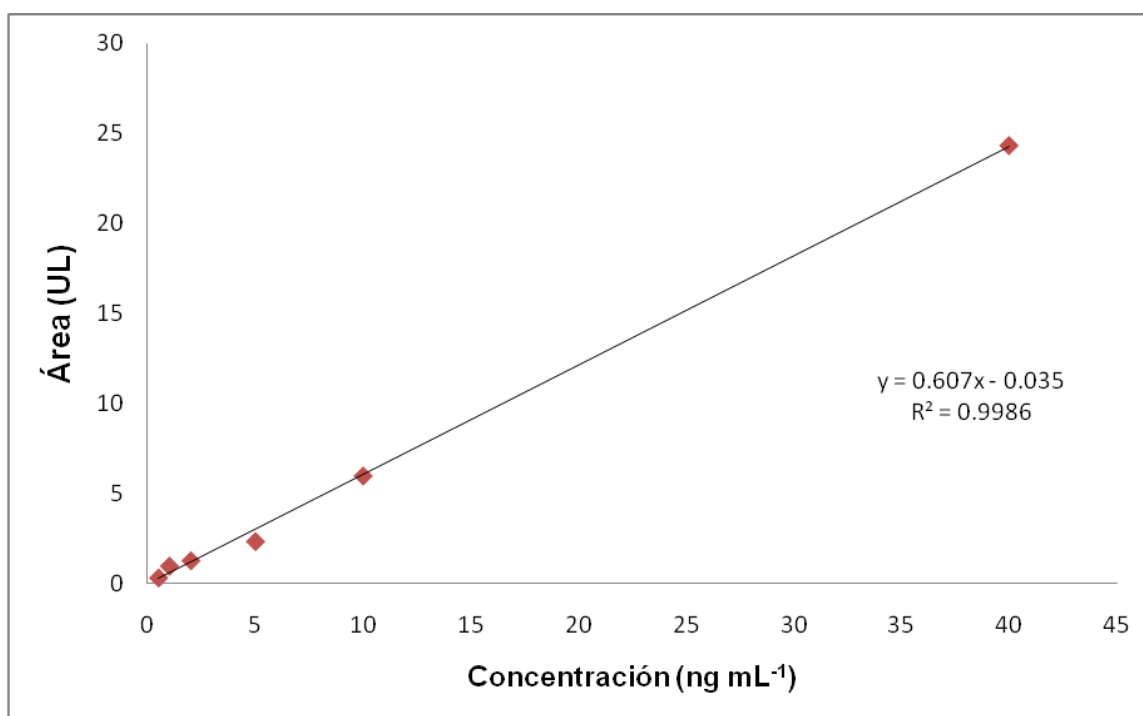
Con base en las áreas obtenidas y las concentraciones de las diferentes diluciones, se obtuvieron las ecuaciones de cada curva de calibración y los coeficientes de correlación con el programa Excel. Las gráficas de las curvas de calibración se graficaron con la concentración de AF como variable dependiente contra el Área.

### V.1.1. Curva de calibración de AFB<sub>1</sub>

En el Cuadro 4 se muestran los parámetros de concentración, área y tiempo de retención usados para calcular la curva de AFB<sub>1</sub>. En la Figura 3 se muestra la gráfica de la curva de calibración obtenida de AFB<sub>1</sub>.

**Cuadro 4.** Curva de calibración de AFB<sub>1</sub>.

Concentración (ng mL <sup>-1</sup> )	Área (UL)	Tiempo de Retención (min)
0.5	0.341	8.849
1	0.993	8.695
2	1.295	7.877
5	2.357	7.638
10	5.995	7.347
40	24.317	7.085



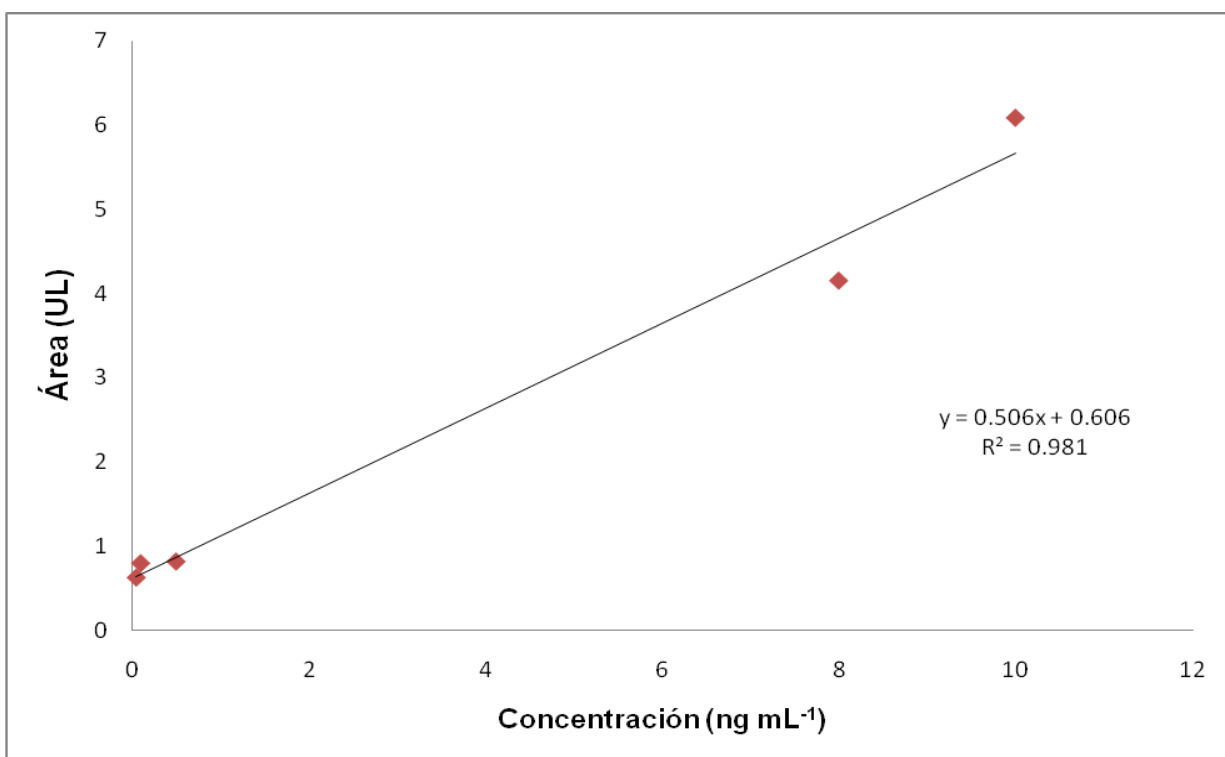
**Figura 3.** Curva de calibración de AFB<sub>1</sub>.

### V.1.2. Curva de calibración AFB<sub>2</sub>

En el **Cuadro 5** se muestran los parámetros de concentración, área y tiempo de retención usados para calcular la curva de AFB<sub>2</sub>. En la **Figura 4** se muestra la gráfica de la curva de calibración obtenida de AFB<sub>2</sub>.

**Cuadro 5.** Curva de calibración de AFB<sub>2</sub>.

Concentración (ng mL <sup>-1</sup> )	Área (UL)	Tiempo de Retención (min)
0.05	0.63	17.452
0.1	0.8	18.141
0.5	0.82	18.93
8	4.15	20.062
10	6.08	20.228



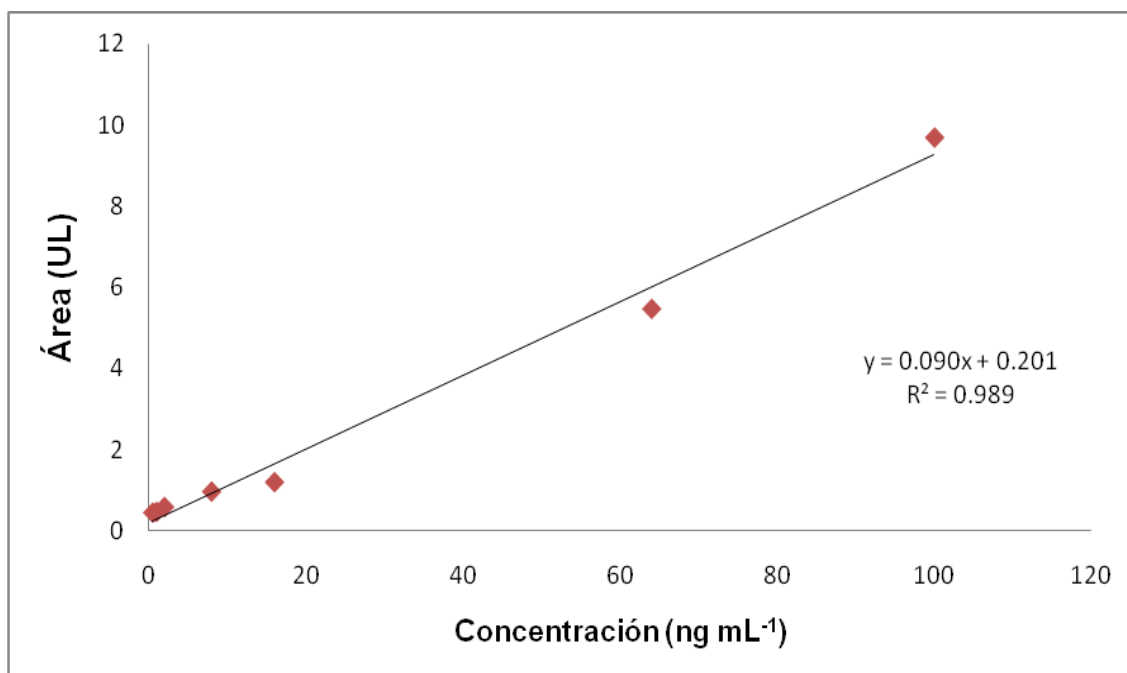
**Figura 4.** Curva de calibración de AFB<sub>2</sub>.

### V.1.3. Curva de calibración AFG<sub>1</sub>

En el **Cuadro 6** se muestran los parámetros de concentración, área y tiempo de retención usados para calcular la curva de AFG<sub>1</sub>. En la **Figura 5** se muestra la gráfica de la curva de calibración obtenida de AFG<sub>1</sub>.

**Cuadro 6.** Curva de calibración de AFG<sub>1</sub>.

Concentración (ng mL <sup>-1</sup> )	Área (UL)	Tiempo de Retención (min)
0.5	0.44	8.473
1	0.46	7.681
2	0.58	9.541
8	0.96	9.003
16	1.19	9.166
64	5.46	9.101
100	9.68	9.095



**Figura 5.** Curva de calibración de AFG<sub>1</sub>.

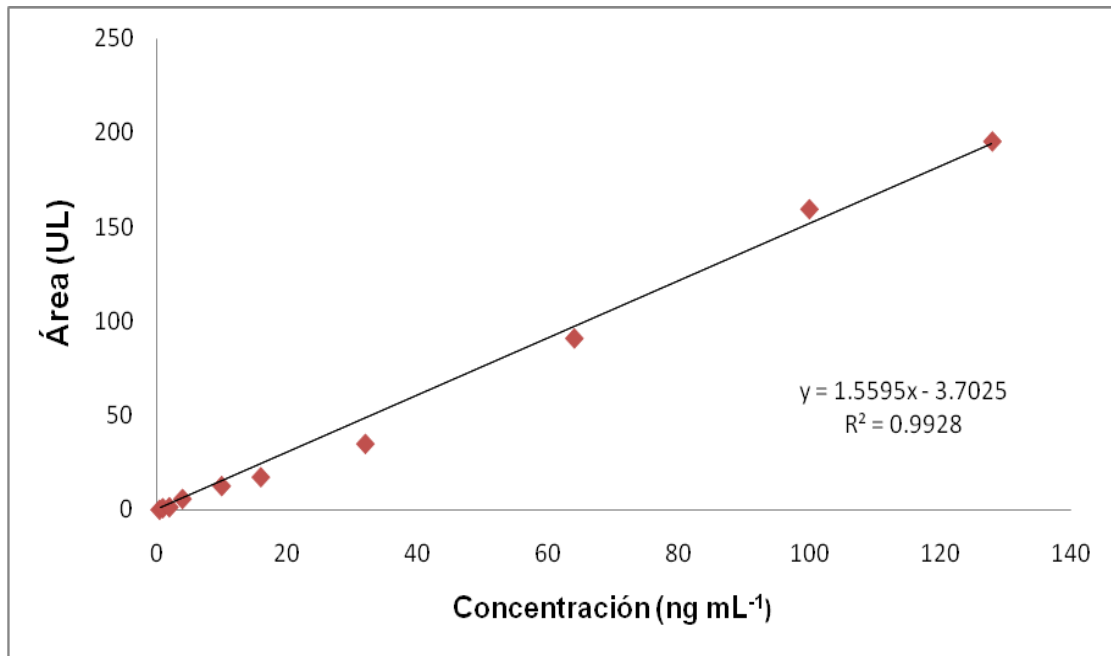


#### V.1.4. Curva de calibración AFG<sub>2</sub>

En el **Cuadro 7** se muestran los parámetros de concentración, área y tiempo de retención usados para calcular la curva de AFG<sub>2</sub>. En la **Figura 6** se muestra la gráfica de la curva de calibración obtenida de AFG<sub>2</sub>.

**Cuadro 7.** Curva de calibración de AFG<sub>2</sub>.

Concentración (ng mL <sup>-1</sup> )	Área (UL)	Tiempo de Retención (min)
0.5	0.20	14.177
1	1.05	11.215
2	1.57	12.062
4	5.91	12.002
10	12.78	14.507
16	17.47	14.513
32	35.12	14.476
64	91.13	14.492
100	159.66	14.464
128	195.61	14.455



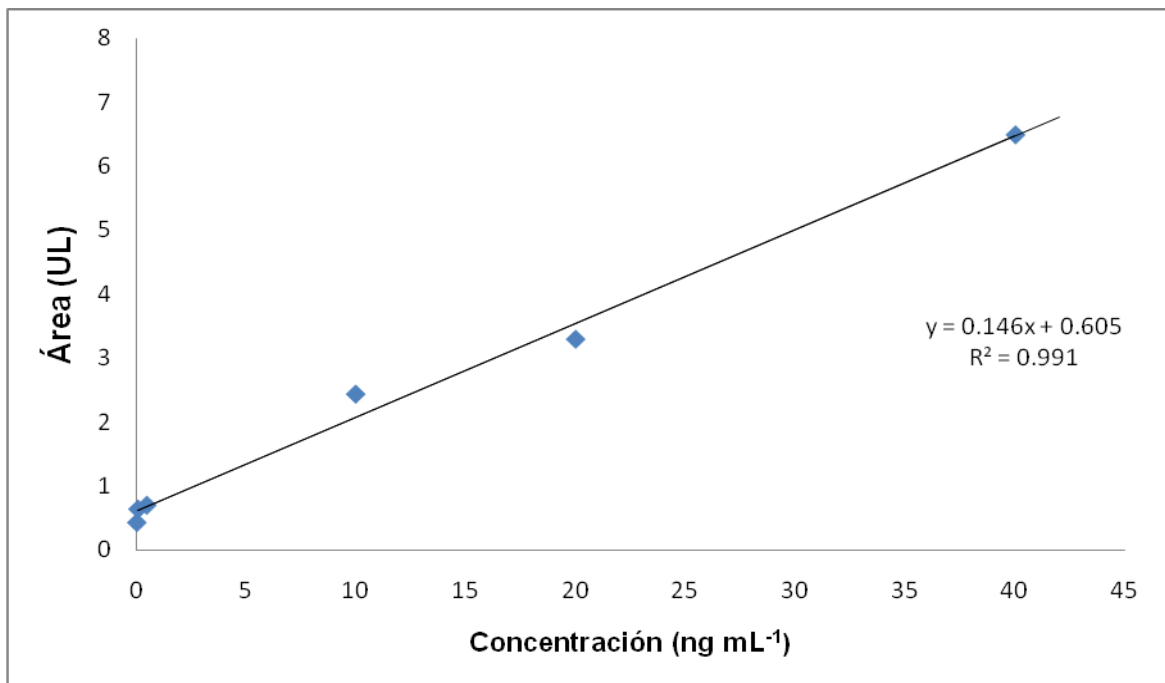
**Figura 6.** Curva de calibración de AFG<sub>2</sub>.

### V.1.5. Curva de calibración AFM<sub>1</sub>

En el **Cuadro 8** se muestran los parámetros de concentración, área y tiempo de retención usados para calcular la curva de AFM<sub>1</sub>. En la **Figura 7** se muestra la gráfica de la curva de calibración obtenida de AFM<sub>1</sub>.

**Cuadro 8.** Curva de calibración de AFM<sub>1</sub>.

Concentración (ng mL <sup>-1</sup> )	Área (UL)	Tiempo de Retención (min)
0.05	0.425	3.024
0.1	0.636	2.941
0.5	0.696	3.008
10	2.436	2.935
20	3.296	2.971
40	6.495	2.920



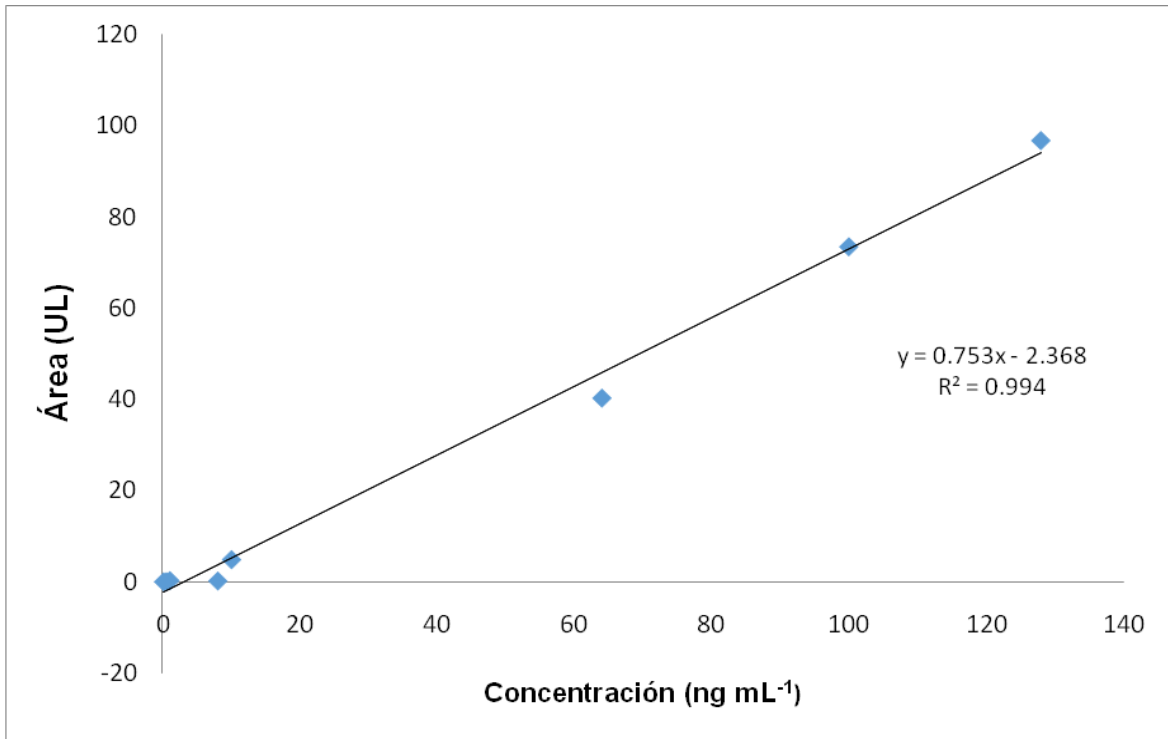
**Figura 7.** Curva de calibración de AFM<sub>1</sub>.

### V.1.6. Curva de calibración AFM<sub>2</sub>

En el **Cuadro 9** se muestran los parámetros de concentración, área y tiempo de retención usados para calcular la curva de AFM<sub>2</sub>. En la **Figura 8** se muestra la curva de calibración obtenida de AFM<sub>2</sub>.

**Cuadro 9.** Curva de calibración de AFM<sub>2</sub>.

Concentración (ng mL <sup>-1</sup> )	Área (UL)	Tiempo de retención (min)
0.05	0.146	20.208
0.5	0.16	22.447
2	0.5	20.544
64	38.9	20.966
100	73.412	20.905
128	90.17	20.844



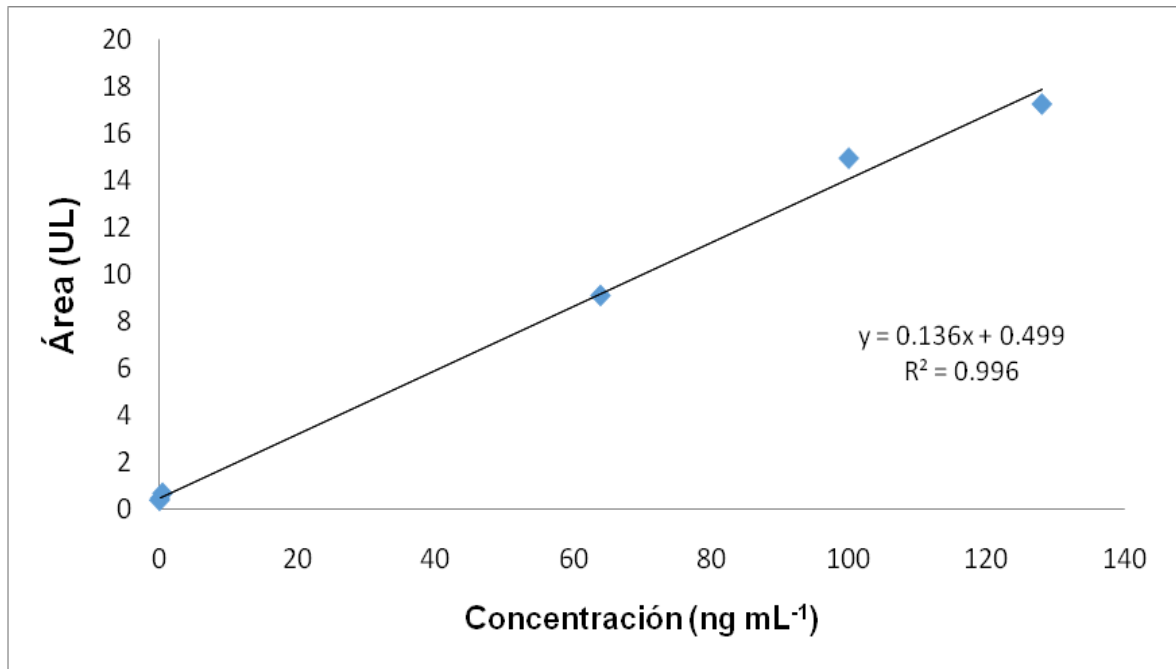
**Figura 8.** Curva de calibración de AFM<sub>2</sub>.

### V.1.7. Curva de calibración AFP<sub>1</sub>

En el **Cuadro 10** se muestran los parámetros de concentración, área y tiempo de retención usados para calcular la curva de AFP<sub>1</sub>. En la **Figura 9** se muestra la gráfica de la curva de calibración obtenida de AFP<sub>1</sub>.

**Cuadro 10.** Curva de Calibración de AFP<sub>1</sub>.

Concentración (ng mL <sup>-1</sup> )	Área (UL)	Tiempo de retención (min)
0.05	0.356861	15.563
0.1	0.432036	16.711
0.5	0.658508	16.817
64	9.10722	19.318
100	14.97025	18.065
128	17.28316	18.213



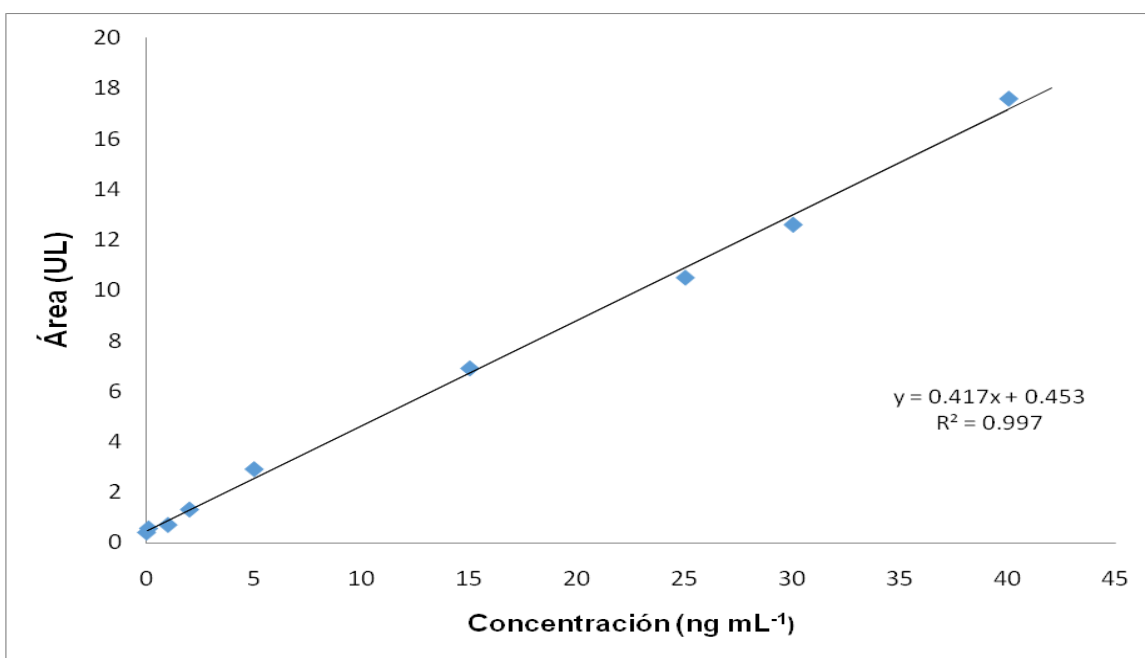
**Figura 9.** Curva de calibración de AFP<sub>1</sub>.

### V.1.8. Curva de calibración Aflatoxicol (AFL)

En la **Cuadro 11** se muestran los parámetros de concentración, área y tiempo de retención usados para calcular la curva de AFL. En la **Figura 10** se muestra la gráfica de la curva de calibración obtenida de AFL.

**Cuadro 11.** Curva de Calibración de AFL.

Concentración (ng mL <sup>-1</sup> )	Área (UL)	Tiempo de retención (min)
0.01	0.39	4.605
0.1	0.55	3.513
1	0.69	4.859
2	1.3	4.16
5	2.9	3.353
15	6.9	4.265
25	10.5	3.032
30	12.6	3.81
40	17.6	5.569



**Figura 10.** Curva de calibración de AFL.

## V.2. Límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ)

El Límite de detección (LOD) del equipo se estableció en relación con el ruido en el cromatograma (**Cuadro 12**).

**Cuadro 12.** LOD y LOQ para cada Aflatoxina.

Aflatoxina	LOD (ng g <sup>-1</sup> )	LOQ (ng g <sup>-1</sup> )
AFB <sub>1</sub>	0.5	5
AFB <sub>2</sub>	0.05	0.5
AFG <sub>1</sub>	0.5	5
AFG <sub>2</sub>	0.5	5
AFM <sub>1</sub>	0.05	0.5
AFM <sub>2</sub>	0.05	0.5
AFP <sub>1</sub>	0.05	0.5
AFL	0.01	0.1

## V.3. Probióticos en la digestión humana *in vitro*.

En el tratamiento a pH 7.0 equivalente al de la digestión bucal con saliva, las concentraciones de AF fueron para AFB<sub>1</sub> (0 a 93.97 ng g<sup>-1</sup>), para AFB<sub>2</sub> (0 a 105.3 ng g<sup>-1</sup>), para AFG<sub>1</sub> (0 a 5 ng g<sup>-1</sup>), para AFG<sub>2</sub> (0 a 0.78 ng g<sup>-1</sup>), para AFM<sub>2</sub> (0 a 5.26 ng g<sup>-1</sup>), para AFL (0 a 37.96 ng g<sup>-1</sup>) y para AFM<sub>1</sub> y AFP<sub>1</sub> (0 ng g<sup>-1</sup>) con los siete probióticos. El probiótico Simi Bacilos Forte no presentó concentración de AFB<sub>1</sub> ni sus hidroxilados, mientras que el probiótico con más AFt fue Probioptal (110.81 ng g<sup>-1</sup>) a este pH (**Cuadro 13**).

**Cuadro 13.** Concentración promedio de Aflatoxinas ( $\text{ng g}^{-1}$ ) en el tratamiento a pH 7.0.

Probiótico	AFB <sub>1</sub>	AFB <sub>2</sub>	AFG <sub>1</sub>	AFG <sub>2</sub>	AFM <sub>1</sub>	AFM <sub>2</sub>	AFP <sub>1</sub>	AFL	AF <sub>t</sub>
Natural Wisdom	0	0	5	0.78	0	0	0	37.96	43.74
Digestive Flore	0	0	0	0	0	0	0	30.77	30.77
Probiotix	93.97	0	0	0	0	0	0	0	93.97
Sinuberase	28.36	0	0	0	0	5.26	0	0	33.63
Probviotal	0	105.3	0	0.33	0	0	0	5.15	110.81
Simi Bacilos	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Enterogermina	0	0	0	0	0	3.39	0	0	3.39

Cinco probióticos (Probióticos Natural Wisdom, Digestive Flore, Probviotal, Simi Bacilos Forte y Enterogermina) destruyeron y/o biotransformaron a la AFB<sub>1</sub> en otras AF o en metabolitos hidroxilados; Probiotix no destruyó a la AFB<sub>1</sub> y conservó 93.97  $\text{ng g}^{-1}$  mientras que Sinuberase, a este pH, conservó el 28.36% de la concentración.

En pH 7.0, no destruye a la AFB<sub>1</sub> ni la transforma en otras. En pH 1.8, baja la concentración de AFB<sub>1</sub> en un 90%, aunque deja un 10% (10.73  $\text{ng}$ ) y la biotransforma en AFB<sub>2</sub> y AFG<sub>2</sub> que no son cancerígenas y trazas de AFL. En pH 5.8, destruye a la AFB<sub>1</sub> en 87% aproximadamente y no la biotransforma en AFL.

Sinuberase, en un pH de 7.0, elimina a la AFB<sub>1</sub> en un 60% y la biotransforma en AFM<sub>2</sub> que no es cancerígena. A un pH de 1.8, sólo elimina un 6% a la AFB<sub>1</sub> sin biotransformarla y a un pH de 5.8, la elimina completamente evitando así en cáncer colorrectal.

Probviotal, a un pH de 7.0, elimina en un 100% a la AFB<sub>1</sub>, pero la biotransforma en gran cantidad en AFB<sub>2</sub> y trazas de AFG<sub>2</sub> que no son cancerígenas, y AFL a una concentración que no se considera mutagénica. A un pH de 1.8, elimina casi en su totalidad a la AFB<sub>1</sub> y sólo un 9% la biotransforma a AFL. A un pH de 5.8, elimina un 86% a la AFB<sub>1</sub> y la concentración restante la biotransforma en AFL.

Simi Bacilos Forte, a un pH de 7.0 elimina completamente la AFB<sub>1</sub> y no hace ninguna biotransformación. A un pH de 1.8, elimina a la AFB<sub>1</sub> y la biotransforma en AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>2</sub> que

no son cancerígenas y en AFL a una concentración que no produce mutación. A pH 5.8, elimina en un 100% a la AFB<sub>1</sub> y sólo biotransforma una pequeña cantidad (3.04 ng) a AFL.

Enterogermina, a un pH de 7.0, elimina a la AFB<sub>1</sub> y la biotransforma en gran cantidad a AFB<sub>2</sub> y un poco en AFG<sub>2</sub> que no son cancerígenas y sólo un 5% en AFL. A pH 5.8, baja considerablemente la concentración de AFt, eliminando en un 98% la AFB<sub>1</sub>, y la biotransforma en trazas de AFB<sub>2</sub> y AFM<sub>2</sub> que no son cancerígenas.

En el **Cuadro 14** se muestran los resultados obtenidos Con el tratamiento a pH 1.8 los rangos de AF obtenidos fueron para AFB<sub>1</sub> (0 a 93.97 ng g<sup>-1</sup>), para AFB<sub>2</sub> (0 a 174.29 ng g<sup>-1</sup>), para AFG<sub>2</sub> (0 a 32.82 ng g<sup>-1</sup>), para AFM<sub>1</sub> (0 a 32.82 ng g<sup>-1</sup>), para AFL (0 a 30.29 ng g<sup>-1</sup>) y AFG<sub>1</sub>, AFM<sub>2</sub> y AFP<sub>1</sub> tuvieron 0 ng g<sup>-1</sup> con los siete probióticos. El probiótico Probvioptal presentó las menores concentraciones de AFt con 9.51 ng g<sup>-1</sup>, mientras que el probiótico que más presentó AFt fue Enterogermina con una concentración total de 180.7 ng g<sup>-1</sup> de donde 174.3 fueron de AFB<sub>2</sub> que no es cancerígena a este pH.

**Cuadro 14.** Concentración promedio de Aflatoxinas (ng g<sup>-1</sup>) en el Tratamiento a pH 1.8.

Probiótico	AFB <sub>1</sub>	AFB <sub>2</sub>	AFG <sub>1</sub>	AFG <sub>2</sub>	AFM <sub>1</sub>	AFM <sub>2</sub>	AFP <sub>1</sub>	AFL	AF <sub>t</sub>
Natural Wisdom	3.63	0	0	0	32.82	0	0	30.29	66.74
Digestive Flore Probiotix	78.04	0	0	0	0	0	0	0	78.04
Sinuberase	10.73	0.67	0	4.02	0	0	0	0.89	16.31
Probvioptal	93.70	0	0	0	0	0	0	0	93.70
Simi Bacilos	0.41	0	0	0	0	0	0	9.1	9.51
Enterogermina	0	13.19	0	0.20	0	0	0	8.37	21.76
	0	174.29	0	1.59	0	0	0	4.85	180.7

En la **Cuadro 15** se muestran los resultados obtenidos en el tratamiento a pH 5.8. Los rangos obtenidos de van de 0 a 57.64 ng g<sup>-1</sup> para AFB<sub>1</sub>, 0 a 0.50 ng g<sup>-1</sup> para AFB<sub>2</sub>, 0 a 3.4 ng g<sup>-1</sup> para AFM<sub>2</sub>, 0 a 76.01 ng g<sup>-1</sup> para AFL y se obtuvo 0 ng g<sup>-1</sup> para AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub>, AFM<sub>1</sub> y AFP<sub>1</sub> con los siete probióticos. El probiótico Sinuberase no presentó concentraciones de AF ni sus hidroxilados, mientras que el probiótico que más presentó AFt fue Natural Wisdom con una concentración de 76.01 ng g<sup>-1</sup> a este pH.



**Cuadro 15.** Concentración promedio de Aflatoxinas ( $\text{ng g}^{-1}$ ) en el Tratamiento a pH 5.8.

<b>Probiótico</b>	<b>AFB<sub>1</sub></b>	<b>AFB<sub>2</sub></b>	<b>AFG<sub>1</sub></b>	<b>AFG<sub>2</sub></b>	<b>AFM<sub>1</sub></b>	<b>AFM<sub>2</sub></b>	<b>AFP<sub>1</sub></b>	<b>AFL</b>	<b>AF<sub>t</sub></b>
Natural Wisdom	0	0	0	0	0	0	0	76.01	76.01
Digestive Flore	57.64	0	0	0	0	0	0	0	57.64
Probiotix	13.66	0	0	0	0	0	0	0	13.66
Sinuberase	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Probvioletal	0	0	0	0	0	0	0	13.51	13.51
Simi Bacilos Forte	0	0	0	0	0	0	0	3.04	3.04
Enterogermina	1.97	0.50	0	0	0	3.4	0	0	5.87

En el **Cuadro 16** se muestran los resultados obtenidos en el Control Negativo, a los tres diferentes pH trabajados. En la biotransformación sólo se tomó en cuenta AFB<sub>1</sub> y su transformación a AFL. Se puede ver que cuando la AFB<sub>1</sub> es alta, el AFL es escaso y viceversa. La transformación de AFB<sub>1</sub> a AFG<sub>1</sub> y AFG<sub>2</sub> puede suceder por diferentes caminos metabólicos y como no se marcaron radiactivamente las Aflatoxinas, no se puede comprobar su transformación a las AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub>.

**Cuadro 16.** Concentración promedio de Aflatoxinas ( $\text{ng g}^{-1}$ ) en el Control Negativo a los tres pH.

<b>Probiótico</b>	<b>pH 7</b>		<b>pH 1.8</b>		<b>pH 5.8</b>	
	<b>AFB<sub>1</sub></b>	<b>AFL</b>	<b>AFB<sub>1</sub></b>	<b>AFL</b>	<b>AFB<sub>1</sub></b>	<b>AFL</b>
Natural Wisdom	2.91	1.1	0.11	2.82	0.86	0.04
Digestive Flore	0.18	10.55	0.61	0.32	0.11	2.46
Probiotix	0.03	4.43	0.11	5.87	0.05	0.05
Sinuberase	0.18	10.55	0.61	0.32	0.11	2.46
Probvioletal	0.13	3.08	0.15	1.24	3.05	0.14
Simi Bacilos Forte	0.12	12.98	0.18	2.89	2.32	2.24
Enterogermina	0.14	6.00	0.21	1.79	0.54	0.11

En el **Cuadro 17** se muestran los resultados obtenidos en el Control Positivo a los tres pH trabajados. Cabe mencionar que la AFB<sub>1</sub> suministrada, se biotransformó directamente en AFL a los tres pH, siendo el pH 1.8 el que más concentración se biotransformó.

**Cuadro 17.** Concentración de Aflatoxinas (ng g<sup>-1</sup>) en el Control Positivo a los tres pH.

<b>pH</b>	<b>Concentración AFB<sub>1</sub> (ng g<sup>-1</sup>)</b>	<b>Concentración AFL (ng g<sup>-1</sup>)</b>
7	139.11	48.06
1.8	198.38	89.19
5.8	93.31	11.69

#### V.4. Análisis estadísticos

En el **Cuadro 18** se muestran los resultados obtenidos con pH 7.0. Se observa que, de acuerdo al valor de P global, se encontraron diferencias significativas entre la AFB<sub>1</sub>, AFL y AF totales con respecto al Control positivo y los probióticos. Mientras que, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> Y AFM<sub>2</sub> presentan diferencia significativa entre probióticos.

La comparación múltiple de Dunn muestra que Natural Wisdom muestra diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) con respecto a Digestive Flore en AFG<sub>1</sub>. Por otro lado, para AFM<sub>2</sub>, solo Enterogermina mostró diferencia significativa.

**Cuadro 18.** Concentración de Aflatoxinas (ng g<sup>-1</sup>) de los siete probióticos a pH 7.0.

AF	Control positivo y probióticos. Mediana (mínimo, máximo)								Valor de P
	Control positivo	Digestive Flore	Enterogermina	Probióticos Natural Wisdom	Probiotix	Probioptal	Simi Bacilos	Sinuberase	
AFB <sub>1</sub>	160.0 (7.8, 249.5)	0.00 (0.00)*	0.00 (0.00)*	0.00 (0.00)*	102.3 (58.3, 121.3)	0.00 (0.00)*	0.00 (0.00)*	28.1 (22.0, 35.0)	0.003
AFB <sub>2</sub>	---	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	58.4 (0.0, 257.6)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.003
AFG <sub>1</sub>	---	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	7.3 (0.0, 7.8)*	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.049
AFG <sub>2</sub>	---	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.9 (0.0, 1.5)	0.00 (0.00)	0.2 (0.0, 0.8)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.068
AFM <sub>1</sub>	---	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	---
AFM <sub>2</sub>	---	0.00 (0.00)	3.0 (2.0, 5.1)*	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	6.3 (0.0, 9.5)	0.017
AFP <sub>1</sub>	---	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	---
AFL	45.1 (11.0, 88.0)	13.1 (0.9, 78.2)	0.00 (0.00)*	17.7 (14.9, 81.3)	0.00 (0.00)*	5.6 (4.0, 5.9)	0.00 (0.00)*	0.00 (0.00)*	0.003
AF totales	205.2 (95.8, 260.5)	13.1 (0.9, 78.3)	3.0 (2.0, 5.1)*	26.3 (22.1, 82.8)	102.3 (58.3, 121.3)*	62.5 (5.9, 264.0)	0.00 (0.00)*	28.3 (28.1, 44.6)*	0.016

AF: Aflatoxina. AFB<sub>1</sub>: Aflatoxina B<sub>1</sub>. AFB<sub>2</sub>: Aflatoxina B<sub>2</sub>. AFG<sub>1</sub>: Aflatoxina G<sub>1</sub>. AFG<sub>2</sub>: Aflatoxina G<sub>2</sub>. AFM<sub>1</sub>: Aflatoxina M<sub>1</sub>. AFM<sub>2</sub>: Aflatoxina M<sub>2</sub>. AFP<sub>1</sub>: Aflatoxina P<sub>1</sub>. AFL: Aflatoxicol.

El valor de P global fue calculado por la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis. Con AFB<sub>1</sub>, AFL y AF totales la comparación múltiple fue efectuada por la técnica de Dunn, siendo el control positivo referencia de comparación. Con los metabolitos AFB<sub>2</sub> – AFP<sub>1</sub> la comparación múltiple fue efectuada

por la técnica de Dunn, siendo un probiótico que presentó la concentración 0 (Digestive Flore) como referencia de comparación \*P<0.1

En el **Cuadro 19** se muestran los resultados obtenidos con pH 1.8. De acuerdo al valor de P global, se encontraron diferencias significativas entre AFB<sub>1</sub>, AFL con respecto al Control positivo y los probióticos. Mientras que, AFG<sub>2</sub> Y AFM<sub>1</sub> presentaron diferencia significativa entre probióticos. La comparación múltiple de Dunn muestra que para la para la AFG<sub>2</sub>, Probiotix presentó diferencia significativa von respecto a los demás probióticos, para AFM<sub>1</sub>, Probiotics Natural Wisdom presentó diferencia significativa (P<0.1) con respecto a los demás probióticos.

**Cuadro 19.** Concentración de Aflatoxinas (ng g<sup>-1</sup>) de los siete probióticos a pH 1.8.

AF	Control positivo y probióticos. Mediana (mínimo, máximo)								Valor de P
	Control positivo	Digestive Flore	Enterogermina	Probiotics Natural Wisdom	Probiotix	Probioptal	Simi Bacilos	Sinuberase	
AFB <sub>1</sub>	210.6 (143.0, 241.6)	84.2 (0.0, 149.9)	0.00 (0.00)*	4.5 (1.0, 5.4)	13.9 (0.0, 18.3)	0.1 (0.0, 1.1)	0.00 (0.00)*	101.4 (74.3, 105.4)	0.016
AFB <sub>2</sub>	---	0.00 (0.00)	137.8 (0.0, 385.0)	0.00 (0.00)	0.81 (0.0, 1.2)	0.00 (0.00)	16.38 (0.0, 23.18)	0.00 (0.00)	0.097
AFG <sub>1</sub>	---	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	---
AFG <sub>2</sub>	---	0.00 (0.00)	1.38 (0.0, 3.4)	0.00 (0.00)	4.0 (3.5, 4.5)*	0.00 (0.00)	0.25 (0.0, 0.3)	0.00 (0.00)	0.015
AFM <sub>1</sub>	---	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	44.15 (0.0, 54.3)*	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.049
AFM <sub>2</sub>	---	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	---
AFP <sub>1</sub>	---	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	---
AFL	94.1 (43.9, 129.5)	0.00 (0.00)**	5.1 (0.0, 9.39)	15.5 (8.2, 67.2)	0.5 (0.0, 2.1)	7.1 (5.7, 14.6)	8.9 (6.8, 9.6)	0.00 (0.00)**	0.006
AF totales	304.7 (186.9, 371.1)	84.2 (0.0, 149.9)	144.4 (0.0, 397.8)	53.3 (20.9, 126.1)	18.0 (5.2, 25.7)	7.2 (5.6, 15.7)	26.2 (8.9, 30.2)	101.4 (74.3, 105.4)	0.108

AF: Aflatoxina. AFB<sub>1</sub>: Aflatoxina B<sub>1</sub>. AFB<sub>2</sub>: Aflatoxina B<sub>2</sub>. AFG<sub>1</sub>: Aflatoxina G<sub>1</sub>. AFG<sub>2</sub>: Aflatoxina G<sub>2</sub>. AFM<sub>1</sub>: Aflatoxina M<sub>1</sub>. AFM<sub>2</sub>: Aflatoxina M<sub>2</sub>. AFP<sub>1</sub>: Aflatoxina P<sub>1</sub>. AFL: Aflatoxicol.

El valor de P global fue calculado por la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis. Con AFB<sub>1</sub>, AFL y AF totales la comparación múltiple fue efectuada por la técnica de Dunn, siendo el control positivo referencia de comparación. Con los metabolitos AFB<sub>2</sub> – AFP<sub>1</sub> la comparación múltiple fue efectuada

por la técnica de Dunn, siendo un probiótico que presentó la concentración 0 (Digestive Flore) como referencia de comparación \*P<0.1, \*P<0.05, \*\*P<0.01

En el **Cuadro 20** se muestran los resultados obtenidos con pH 5.8. De acuerdo al valor de P global, AFL presentó diferencia significativa entre el Control Positivo y los probióticos. Mientras que, AFB<sub>2</sub> y AFM<sub>2</sub> presentaron diferencia significativa entre probióticos. La comparación múltiple de Dunn muestra que, para la AFB<sub>2</sub>, Enterogermina presentó diferencia significativa (P<0.01) con respecto a los demás probióticos y para AFM<sub>2</sub>, Enterogermina presentó diferencia significativa (P<0.05).

**Cuadro 20.** Concentración de Aflatoxinas (ng g<sup>-1</sup>) de los siete probióticos a pH 5.8.

Control positivo y probióticos. Mediana (mínimo, máximo)									
AF	Control positivo	Digestive Flore	Enterogermina	Probiotics Natural Wisdom	Probiotix	Probvioptal	Simi Bacilos	Sinuberase	Valor de P
AFB <sub>1</sub>	103.3 (67.9, 108.7)	79.7 (0.0, 93.2)	1.9 (1.9, 2.1)	0.00 (0.00)*	15.31 (9.4, 16.3)	0.00 (0.00)*	0.00 (0.00)*	0.00 (0.00)*	0.007
AFB <sub>2</sub>	---	0.00 (0.00)	0.6 (0.0, 0.9)**	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.003
AFG <sub>1</sub>	---	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	---
AFG <sub>2</sub>	---	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	---
AFM <sub>1</sub>	---	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	---
AFM <sub>2</sub>	---	0.00 (0.00)	4.1 (0.0, 6.1)*	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.049
AFP <sub>1</sub>	---	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	---
AFL	4.6 (0.0, 30.5)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	71.3 (0.0, 156.8)	0.00 (0.00)	14.5 (11.6, 14.5)	0.0 (0.0, 9.12)	0.00 (0.00)	0.026
AF totales	113.3 (67.9, 133.8)	79.7 (0.0, 93.2)	7.1 (1.9, 8.6)	71.3 (0.0, 156.8)	15.3 (9.4, 16.3)	14.5 (11.6, 14.5)	0.0 (0.0, 9.12)	0.00 (0.00)	0.070

AF: Aflatoxina. AFB<sub>1</sub>: Aflatoxina B<sub>1</sub>. AFB<sub>2</sub>: Aflatoxina B<sub>2</sub>. AFG<sub>1</sub>: Aflatoxina G<sub>1</sub>. AFG<sub>2</sub>: Aflatoxina G<sub>2</sub>. AFM<sub>1</sub>: Aflatoxina M<sub>1</sub>. AFM<sub>2</sub>: Aflatoxina M<sub>2</sub>. AFP<sub>1</sub>: Aflatoxina P<sub>1</sub>. AFL: Aflatoxicol.

El valor de P global fue calculado por la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis. Con AFB<sub>1</sub>, AFL y AF totales la comparación múltiple fue efectuada por la técnica de Dunn, siendo el control positivo referencia de comparación. Con los metabolitos AFB<sub>2</sub> – AFP<sub>1</sub> la comparación múltiple fue efectuada

por la técnica de Dunn, siendo un probiótico que presentó la concentración 0 (Digestive Flore) como referencia de comparación  $\bullet P < 0.1$ ,  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$

## VI. DISCUSIÓN

A un pH 7.0, Simi Bacilos Forte ( $0 \text{ ng g}^{-1}$ ) y Enterogermina que tiene trazas de AFM<sub>2</sub> ( $3.39 \text{ ng g}^{-1}$ ) que no es cancerígena (OPS, 1983), resultaron ser los tratamientos que mejor inhiben la concentración de AFB<sub>1</sub>.

A pH 1.8, nuevamente Simi Bacilos Forte presenta transformación total de AFB<sub>1</sub> hacia AFB<sub>2</sub> y AFG<sub>2</sub> que no son mutagénicas y el AFL tiene una concentración de 8.37, que es menor a  $10 \text{ ng}$  y en esta cantidad aún no produce una mutación. El riesgo que presenta Enterogermina es que tuvo alta concentración de AFP<sub>1</sub> ( $52.78 \text{ ng g}^{-1}$ ), que, aunque es un metabolito menos tóxico que la AFB<sub>1</sub>, sigue siendo cancerígeno. El AFL ( $4.85 \text{ ng g}^{-1}$ ) es el que tiene más riesgo de convertirse en AFB<sub>1</sub>, aunque la concentración es baja y aun no produce mutación (Carvajal *et al.*, 2004).

A pH de 5.8 (digestión completa), el probiótico Simi Bacilos Forte da un buen control, teniendo solamente AFL bajo ( $3.04 \text{ ng g}^{-1}$ ). Por otro lado, Sinuberase, resultó el mejor control a este pH, sin embargo, es alto en AFB<sub>1</sub> ( $93.70 \text{ ng g}^{-1}$ ) a pH 1.8.

Probióticos Natural Wisdom, transforma a la AFB<sub>1</sub> en AFL a pH 7.0, pH 1.8 y pH 5.8, sin embargo, AFL también es altamente cancerígeno (Soriano del Castillo, 2007). A pH 1.8 transforma a la AFB<sub>1</sub> en AFM<sub>1</sub> que es un hidroxilado clasificado como Grado 2, probablemente cancerígeno (OPS, 1983; Soriano del Castillo, 2007).

Digestive Flore, no da una protección completa pues con pH de 7.0 transforma un 70% de la AFB<sub>1</sub> en AFL que sigue siendo cancerígeno según lo indica la OPS (1983), mientras que con el pH 1.8 y 5.8 no destruyen a la AFB<sub>1</sub>.

Probiotix, si bien baja la cantidad de AFB<sub>1</sub>, en los tres pH mantiene un nivel de concentración que aún es mutágeno (a partir de  $10 \text{ ng g}^{-1}$ ) (OPS, 1983; Carvajal 2004).

*Abdelmotilib et al* en el 2018 mencionó que la combinación de bacterias probióticas reduce la concentración de AFM<sub>1</sub> en la leche contaminada con Aflatoxinas; el porcentaje de

eliminación de AFM<sub>1</sub> más alto se registró como; 80.56%, 86.64%, 88.60% y 90.88% en las muestras de leche tratadas utilizando especies de bacterias probióticas como *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum*, las cuales coinciden con las especies presentes en los probióticos utilizados.

Peltonen *et al.*, en el 2000 evaluó la capacidad de seis bacterias probióticas para unirse a la Aflatoxina B<sub>1</sub>. Las cepas estudiadas incluyeron cepas de *Lactobacillus* y una cepa de *Bifidobacterium* tal como en la presente investigación. Las cepas se incubaron *in vitro* con Aflatoxina B<sub>1</sub> y el residuo de toxina en el sobrenadante se midió mediante cromatografía líquida de alta resolución. Se encontró que la capacidad de unión a Aflatoxinas de las cepas oscilaba entre 5,8 y 31,3%, lo cual concuerda con la presente investigación en donde el grado de inhibición varió dependiendo el probiótico (cepas bacterianas) y dependiendo el pH. Los datos pueden explicar algunos de los efectos antimutagénicos y anticancerígenos de los microorganismos probióticos.

Las AF en los controles negativos tienen trazas y esto se explica porque son bacilos lácticos cultivados en leche, y pueden arrastrar algunas AF de la leche, que se pegan a la membrana de la bacteria (Abdelmotilib *et al.*, 2018; Carvajal *et al.*; 2013).

## VII. CONCLUSIONES

Aunque todos los probióticos bajaron considerablemente las concentraciones de AFB<sub>1</sub>, algunos de ellos la transformaron en AFL, por lo cual no se puede tomar como control ya que el AFL es cancerígeno y tiene una biotransformación directa con la AFB<sub>1</sub>.

De acuerdo con los resultados obtenidos, se puede concluir que el probiótico Simi Bacilos Forte es el que tiene un mejor control sobre las Aflatoxinas en toda la digestión humana *in vitro*.

Los siete probióticos analizados, biotransforman a la AFB<sub>1</sub> en metabolitos secundarios menos tóxicos; sin embargo, algunos de ellos, conservan concentraciones mutagénicas.



## VIII. REFERENCIAS

- Abdelmotilib NM, Hamad GM, Elderea HB, Salem EG, El Sohaimy SA (2018) Aflatoxin M1 reduction in milk by a novel combination of probiotic bacterial and yeast strains. *European Journal of Nutrition & Food Safety*, 8: 83-99.
- Akiyama H, Goda Y, Tanaka T, Toyoda M (2001) Determination of aflatoxins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> and G<sub>2</sub> in spices using a multifunctional column clean-up. *Journal of Chromatography A*, 932:153-157.
- AOAC, Association of Official Analytical Chemist International (2006) Official methods of analysis of AOAC International. Natural Toxins. *In: Trucksess MW. Chapter (Eds). Chapter*, 49:1-99.
- Altermann E, Russell MW, Azcarate-Peril MA, Barrangou R, Buck BL, McAuliffe O, Souther N, Dobson A, Duong T, Callanan M, Lick S, Hamrick A, Cano R, Klaenhammer TR (2004) Complete genome sequence of the probiotic lactic acid bacterium *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102: 3906-3912.
- Arrúa AA, Moura J, Fernández D (2013) Aflatoxinas, un riesgo real. *Reportes científicos de la Facen*, 4: 68-81.
- Arunachalam K, Gill HS, Chandra RK (2000) Enhancement of natural immune function by dietary consumption of *Bifidobacterium lactis* (HN019). *European Journal of Clinical Nutrition*, 54:1-5.
- Asao T, Buchi G, Andel-Kader MM, Chang SB, Wick EL, Wogan GN (1965) The structures of aflatoxins B<sub>1</sub> and G<sub>1</sub>. *Journal of American Chemistry Society*, 87: 882-886.

- Bauza R (2007) Las micotoxinas, una amenaza constante en la alimentación animal. IX Encuentro de Nutrición y Producción en Animales Monogástricos, Uruguay, 21-28.
- Bhatnagar D, Ehrlich KC, Clevel TE (2003) Molecular genetics analysis and regulation of aflatoxin biosynthesis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 61: 83-93.
- Binder EM (2007) Managing the risk of mycotoxins in modern feed production. *Animal Feed Science and Technology*, 133: 149–166.
- Bogantes P, Bogantes D, Bogantes S (2004) Aflatoxinas. *Acta Médica Costarricense*, 46: 173-178.
- Cabañes FJ, Abarca ML, Bragulat MR, Castellá G (2007) Especies productoras de micotoxinas. *In: Micotoxinas en alimentos*. Soriano del Castillo J.M. (Eds.). 2007. Ediciones Díaz de Santos, p 29-61.
- Canestrari G, Ricci B, Pizzamiglio V, Biancardi A, Piazza P, Meriardi G, Tosi G, Giacometti F, Nocetti M, Fustini M, Serraino A, Formigoni A (2016) Aflatoxin B<sub>1</sub>: Risk Management in Parmigiano Reggiano. *Dairy Cow Feed. Italian Journal of Food Safety*, 5: 5291 p.
- Carballo M, de Miguel JA (1987) Rapid detection of aflatoxin-producing strains of the *Aspergillus flavus* group isolated from mixed feed and cereal grain in Spain. *Science of Food and Agriculture*, 40: 11-15.
- Carvajal M (2013) Transformación de la Aflatoxina B<sub>1</sub> de alimentos en el cancerígeno humano, aducto AFB<sub>1</sub>-ADN. *Revista especializada de químico-biológicas*, 16: 109-120.
- Carvajal M, Espinosa J, Moctezuma G, Gonsebatt ME, Pérez-López I (2004) Minimal amount of AFB<sub>1</sub> to produce a mutation in Ames test with *Salmonella typhimurium* TA-98. *Revista Mexicana de Micología*, 19: 71-79.

- Carvajal M, Moctezuma G, Espinosa J, Rojo F, López-Ridaura S, López-Cruz EA (2000) Aflatoxins in Mexican tortillas and the effects of lime treatment and digestive enzymes on their mutagenicity. In: Mycotoxins and Phycotoxins in Perspective at the turn of the Millenium. IUPAC/AOAC International, p 133-141.
- Carrillo L (2003) Los hongos de los alimentos y forrajes. Universidad Nacional de Salta, Argentina, 128 p.
- Conway P (1996) Selection criteria for probiotic microorganisms. Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition, 5: 10-14.
- Cruz-Rueda V (2016) Curso de Validación de métodosanalíticos. Centro de capacitación. R. H. World SA de CV. Consultado el 5 de noviembre del 2018 en <http://www.rhworld.com.mx>
- Cullen JM, Newberne PM (1994) Acute hepatotoxicity of aflatoxin. *In: The Toxicology of Aflatoxin. Human health, veterinary, and agricultural significance.* Eaton DL, Groopman JD. (Eds). 1994. Academic Press, Inc., p 3-26.
- Dilkin P, Zorzete P, Mallmann CA, Gomes JDF, Utiyama CE, Oetting LL, Correa B (2003) Toxicological effects of chronic low doses of aflatoxin B1 and fumonisin B1-containing *Fusarium moniliforme* culture material in weaned piglets. Food and Chemical Toxicology, 41: 1345–1353.
- Eaton DL, Gallagher EP (1994) Mechanisms of aflatoxin carcinogenesis. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 34: 135-172.
- El-Nezami H, Kankaanpaa P, Salminen S, Ahokas J (1998 a) Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind food carcinogens. Food and Chemical Toxicology, 36:321-326.

- El-Nezami H, Kankaanpaa P, Salminen S, Ahokas J (1998 b) Physico chemical alterations enhance the ability of dairy strains of lactic acid bacteria to remove aflatoxin from contaminated media. *Journal of Food Protection*, 61:466-468.
- Fernandes CA, Kobashigawa E, Alves T, Mestieri L, Albuquerque R, Benedito LM (2010) Aflatoxin B1 residues in eggs of laying hens fed a diet containing different levels of the mycotoxin. *Food Additives and Contaminants*, 17: 459- 462.
- Fernández A, Hernández M, Verde MT, Sanz M (2000) Effect of aflatoxin on performance, hematology, and clinical immunology in lambs. *The Canadian Journal of Veterinary Research*, 64: 53-58.
- Frisvad JC, Thrane U, Samson RA (2007) Mycotoxin producers. *In: Dijksterhuis J, Samson RA, (Eds). 2007. A multifaceted approach to fungi and Food. Food Mycology*, 135-159. Dijksterhuis J, Samson RA (Eds). 1st Ed. Taylor and Francis Group. USA.
- Gilbert J, Anklam E (2002) Validation of analytical methods for determining mycotoxins in food stuffs. *Trends in Analytical Chemistry*, 21: 468-486.
- Gill HS, Rutherford KJ, Cross ML, Gopal PK (2001) Enhancement of immunity in the elderly by dietary supplementation with the probiotic *Bifidobacterium lactis* HN019. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 74: 833-829.
- Gong Y, Hounsa A, Egal S, Turner PC, Sutcliffe AE, Hall AJ, Cardwell K, Wild CP. (2004) Postweaning exposure to Aflatoxin results in impaired child growth: A longitudinal study in Benin, West Africa. *Environ Health Perspect* 112: 1334–1338. doi:10.1289/ehp.6954
- González SN, Apella MC, Romero N, Pesce de Ruiz Holgado AA, Oliver G (1989) Superoxide dismutase activity in some strains of lactobacilli: induction by manganese. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, 37: 3026-3028.

- Gratz S (2007) Aflatoxin binding by probiotics. Experimental studies on intestinal aflatoxin transport, metabolism and toxicity. Kuopio University Publications D. Medical Sciences, 89 p.
- Gratz S, Mykkänen H, El-Nezami H (2005) Aflatoxin B<sub>1</sub> binding by a mixture of *Lactobacillus* and *Propionibacterium*: *In vitro* Versus *ex vivo*. Journal of Food Protection, 68: 2470–2474.
- Hsieh D, Wong J (1994) Pharmacokinetics and Excretion of Aflatoxin. *In*: The toxicology of Aflatoxin. Human health, veterinary, and agricultural significance. Eaton DL & Groopman JD. (Eds). 1994. Academic Press, Inc., p 3-26.
- IARC (2002) Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, 82: 171.
- Kazemi R, Hassani M, Mohammad M, Ebadi S, Tajehmiri A (2014) Biological control of aflatoxin B<sub>1</sub> by probiotic bacteria. Trends in Life Sciences, 3: 6 p.
- Kok W (1994) Derivatization reactions for the determination of Aflatoxins by liquid chromatography with fluorescence detection. Journal of Chromatography B, 659: 127-137.
- Lawlor PG, Lynch PB (2005) Mycotoxin management. Africa Farming Food Process, 46: 12-13.
- Line JE, Brackett RE (1995) Factors Affecting Aflatoxin B<sub>1</sub> removal by *Flavobacterium aurantiacum*. Journal of Food Protection, 58:91-94.

- Liu Y, Wu F (2010) Global burden of aflatoxin-induced hepatocellular carcinoma: A Risk Assessment. *Environ Health Perspect*, 118: 818-824.
- Manzano CA., Estupiñán DG., Poveda EE.2012. Clinical effects of probiotics: what does the evidence says *Rev Chilena de la Nutrición* 39 (1): 98-110.
- Marteau PR, De Vrese M, Cellier CJ, Schrezenmeir J (2001). Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73: 430-436.
- Moctezuma-Zárate MG, Carvajal-Moreno M, Espinosa-Aguirre JJ, Gonsebatt-Bonaparte ME, Rojo-Callejas F, Castillo-Urueta P, Pérez-López I, Ruiz-Velasco S (2015) Role of pH in the mutagenicity of Aflatoxin B<sub>1</sub> in maize tortillas during *in vitro* human digestion model. *Journal of Food and Nutritional Disorders*, 4:1-10.
- Moreno SC, Armenta RI y Ramos-Clamont G (2016) Habilidad de los probióticos para unir Aflatoxinas carcinogénicas. *Biocencia, Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud*, 17: 43-51.
- Okoli IC, Nweke CU, Okoli CG, Opara MN (2006) Assessment of the mycoflora of commercial poultry feeds sold in the humid tropical environment of Imo State, Nigeria. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 3: 9-14.
- Olveira G, González-Molero I (2007) Probióticos y prebióticos en la práctica clínica. *Nutrición Hospitalaria*, 22: 26-34.
- OPS, Organización Panamericana de la Salud (1983) Criterios de Salud Ambiental 11. Micotoxinas. *Publicación Científica 453*. Organización Mundial de la Salud, p 1-133.
- Ornelas-Aguirre JM, Fimbres-Morales A (2015) Aflatoxinas y su asociación con el desarrollo de carcinoma hepatocelular. *Ciencia e Investigación Médico Estudiantil de Latinoamérica*, 20: 8 p.

- Pariza WM (1996) Toxic substances. *In: Food Chemistry, Third edition.* Fennema OR (1996). Marcel Dekker, p 825-841.
- Peltonen KD, El-Nezami HS, Salminen SJ, Ahokas JT (2000) Binding of aflatoxin B1 by probiotic bacteria. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 80: 1942-1945.
- Pitt JI, Basílico JC, Abarca ML, López C (2000) Mycotoxins and toxigenic fungi. *Medical Mycology*, 38: 41-46.
- Reyes W, Patricio S, Isaías VH, Nathal MA, De Lucas E, Rojo F (2009) Total Aflatoxins in cows feed and AFM<sub>1</sub> in milk in dairy herds from Jalisco State, Mexico. *Revista técnica pecuaria en México*, 47: 223-230.
- Ruíz MJ, Front G (2007) Toxicidad y evaluación de riesgos. *In: Micotoxinas en alimentos.* Soriano del Castillo J.M. (Ed). 2007. Ediciones Díaz de Santos, p 15-27.
- Saavedra JM (2001) Clinical applications of probiotic agents. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73: 1147-1151.
- Sanders ME, Klaenhammer TR (2001) Invited Review: The scientific basis of *Lactobacillus acidophilus* NCFM functionality as a probiotic. *Journal of Dairy Science*, 84: 319–331.
- Sodhi S, Brar APS, GhaiJK, Brar RS (2005) Biochemical and immunological effects of dietary exposure to aflatoxin B1 in broiler chicks. *Indian J Poult Sci* 40:155-157.
- Sogbe EJ, Díaz CT, Ascanio E, Utrera V, Zerpa H, Ramírez OJ (2005) Lesiones pancreáticas en lechones destetados inducidas por ingestión de alimento contaminado con 100 ppb de Aflatoxina B<sub>1</sub>. *Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias*, 46: 1345-1353.

- Soriano del Castillo José Miguel (2007) Micotoxinas en alimentos. Ediciones Díaz de Santos. 396 p.
- Steyn PS, Vleggaar R, Wessels PL 1980. The biosynthesis of aflatoxin and its congeners. *In: The biosynthesis of mycotoxins*. Steyn (Eds). Academic Press. New York, U.S.A., p 105-155.
- Sweeney MJ, Dobson ADW (1999) Molecular biology of mycotoxin biosynthesis. *FEMS Microbiology Letters*, 175: 149-163.
- Topcu A, Bulat T, Wishah R, Boyac IH (2010) Detoxification of aflatoxin B<sub>1</sub> and patulin by *Enterococcus faecium* strains. *International Journal Food Microbiology*, 139:202–205.
- Urrego JR, Díaz GJ (2006) Aflatoxinas: Mecanismos de toxicidad en la etiología de cáncer hepático celular. *Revista de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia*, 54: 108-116.
- Wagacha M, Muthomi JW (2008) Mycotoxin problem in Africa: Current status, implications to food safety and health and possible management strategies. *International Journal of Food Microbiology* 124(1):1-12. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.01.008
- Wild CP, Montesano R (2009) Model of interaction: Aflatoxins and hepatitis viruses in liver cancer etiology and prevention. *Cancer Letters*, 286:22-28.
- WGO, World Gastroenterology Organisation (2011) Prebiotics and Probiotics. *Journal Clinical Gastroenterology*, 46: 468-481.