

HABILIDAD DE LOS PROBIÓTICOS PARA UNIR AFLATOXINAS CARCINOGENICAS

ABILITY OF PROBIOTICS TO BIND CARCINOGENIC AFLATOXINS

Silvia Carolina Moreno Rivas, Rosa Idalia Armenta Corral, Gabriela Ramos-Clamont Montfort*

Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. Carretera a la Victoria Km 0.6. C.P. 83304. Hermosillo, Sonora, México.

RESUMEN

Las aflatoxinas se encuentran en gran variedad de alimentos contaminados con los hongos que las producen. Son altamente tóxicas y carcinogénicas, representando un problema de salud pública a nivel mundial. La prevención de la contaminación es vital para el control de las aflatoxinas. También se han desarrollado métodos para eliminar su presencia de los alimentos. Actualmente se estudian microorganismos probióticos, principalmente de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, que unen aflatoxinas con la posibilidad de removerlas de matrices contaminadas. Se ha probado que la capacidad de unión es especie y cepa específica y que se establece a través de los componentes de la pared celular. Sin embargo, el tipo de unión entre probiótico y aflatoxina no ha sido del todo elucidada. Son necesarios estudios más finos que permitan entender la naturaleza química de dicha unión, su estabilidad, condiciones que la afectan y comportamiento en distintos modelos, para escalar su aplicación de manera adecuada.

Palabras clave: Aflatoxinas, probióticos, interacción.

ABSTRACT

Aflatoxins are found in a wide variety of foods contaminated with molds that produce these compounds. They are highly toxic and carcinogenic, which makes them a worldwide public health concern. Prevention of contamination is vital for aflatoxin control. Thus, some methods have been developed to remove them from food. At present probiotic microorganisms that bind aflatoxins and possibly remove them from contaminated media are being investigated. *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* are the principal genus studied. It has been found that probiotic-aflatoxin binding is species and strain-specific and is carried out through cell wall components. However, the type of union between probiotic and aflatoxin has not been completely elucidated. Finest studies are needed to understand the chemical nature of this binding, its stability, the conditions affecting it, and its behavior in different models, to properly scale its application.

Keywords: Aflatoxins, probiotics, interactions.

INTRODUCCIÓN

Las aflatoxinas son toxinas fúngicas que contaminan a los alimentos destinados al consumo animal y humano. La

ganadería y la agricultura son ramas seriamente afectadas por la contaminación con estas toxinas. La contaminación de alimento para ganado disminuye la producción de carne y afecta considerablemente la salud de los animales (Bryden, 2012). En lo que se refiere a la agricultura, la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura) ha venido estimando desde 1995 que un 25% de granos y cereales se contaminan con hongos productores de micotoxinas, después de la cosecha (Wilson *et al.*, 2002). Las pérdidas económicas a nivel mundial son considerables, llegando a cerca de un billón de dólares por año (IARC, 2012).

Las aflatoxinas son consideradas un peligro potencial para la salud pública (Hassanain *et al.*, 2013); producen efectos tóxicos importantes que en el hígado pueden derivar en edemas, hemorragias y hepatitis tóxica; son teratogénicas, mutagénicas, afectan al pulmón y causan inmunosupresión y falla renal (Groopman *et al.*, 2005). Además, están clasificadas como carcinogénicas, principalmente para el esófago y el hígado (Raiola *et al.*, 2015). La gran estabilidad química de las aflatoxinas las mantiene intactas a través del procesamiento industrial de los alimentos y durante su paso por el tracto gastrointestinal y los metabolitos que puedan derivarse de ellas también son tóxicos (Stoev, 2015). La contaminación con aflatoxinas deriva principalmente de condiciones ambientales propicias o de manejo inadecuado durante la cosecha, recolección y almacenamiento de productos vegetales. De allí se introduce a la cadena alimentaria. El establecimiento de programas de Análisis de Riesgos y Puntos Críticos de Control (HACCP, por sus siglas en inglés) puede ser muy útil en la prevención de la contaminación (Hassanain *et al.*, 2013). Sin embargo, la elaboración y aplicación de estos programas requiere de cierta especialización y a pesar de los esfuerzos de la FAO por prestar asistencia en la materia, el problema persiste (Kussaga *et al.*, 2014). Por ello se han desarrollado también métodos de descontaminación. Entre los métodos físicos que se aplican a granos contaminados post-cosecha se encuentran la separación de los granos por clasificación, mientras que la adición de adsorbentes (p.e. arcillas) y la irradiación con rayos gamma y ultravioleta, se aplican para reducir la contaminación de aflatoxinas en piensos y granos contaminados. También se estudian métodos químicos como la aplicación de amoníaco y ozono (Womack *et al.*, 2014).

La descontaminación de aflatoxinas por métodos biológicos es una alternativa a los métodos físicos y químicos.

*Autor para correspondencia: Gabriela Ramos-Clamont Montfort
Correo electrónico: gramos@ciad.mx

Recibido: 07 de febrero de 2015

Aceptado: 20 de enero de 2016

Destacan los estudios realizados con microorganismos que pueden adsorber micotoxinas en su superficie celular. En esta revisión analizaremos la habilidad de algunas bacterias probióticas para unir aflatoxinas, resaltando los posibles mecanismos de unión.

ORIGEN E IMPORTANCIA DE LAS AFLATOXINAS

Las micotoxinas son metabolitos secundarios de origen fúngico. Las especies de los géneros *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium* son las principales productoras, llegando a sintetizar hasta 400 toxinas diferentes (Bryden, 2007). Sin embargo, las de mayor preocupación sanitaria son: las aflatoxinas (*Aspergillus*), las ocratoxinas (*Aspergillus* y *Penicillium*), los tricotecenos y las fumonisinas (*Fusarium*). La afección causada por estas toxinas se conoce como micotoxicosis; sus efectos agudos o crónicos sobre humanos y animales, varían según el tipo de micotoxina (Stoev, 2015). Los efectos crónicos van desde la reducción en el crecimiento y desarrollo, hasta la inmunosupresión y carcinogénesis (Marin *et al.*, 2013). La micotoxina más tóxica es la aflatoxina B₁ que es altamente mutagénica y se ha asociado al cáncer hepático (El-Nezami, 2012).

Las aflatoxinas se producen por 4 especies de *Aspergillus*: *A. flavus*, *A. flavus* ssp. *parasiticus*, *A. nomius* y *A. pseudotamarii* (Pitt, 2000). Químicamente son derivados de las difuranocumarinas (Figura 1), que fluorescen bajo la luz ultravioleta. De acuerdo al color que emiten, se clasifican en aflatoxinas B₁ y B₂ (AFB₁ y AFB₂) que reflejan el azul, y aflatoxinas G₁ y G₂, que reflejan el verde. Los subíndices se refieren a la movilidad cromatográfica (Bhatnagar *et al.*, 2002). Las aflatoxinas M₁ y M₂ son derivados 4-hidroxilados de las AFB₁ y AFB₂, respectivamente. Se producen en el hígado de los

animales que consumen productos contaminados con AFB₁ y AFB₂; se acumulan en otros tejidos y se excretan en la leche (Yiannikouris y Jouany, 2002). La aflatoxina M₁ tiene una toxicidad comparable a la AFB₁ (Stoev, 2015). El anillo lactónico es la porción más reactiva de la molécula de las aflatoxinas, mientras que el grupo bifurano, por su rigidez, favorece la interacción de estas toxinas con algunos componentes celulares (Schatzmayr *et al.*, 2006).

La contaminación con aflatoxinas afecta seriamente a la rama agropecuaria. El ganado porcino es el más susceptible, presentando una DL₅₀ de 0.62 mg/Kg de peso corporal. La intoxicación crónica se manifiesta principalmente con inapetencia, problemas de crecimiento y baja producción de carne. La intoxicación aguda va desde temblores y hemorragias intestinales, hasta la muerte del animal. La DL₅₀ para aves de corral es de 6.3 mg/Kg de peso corporal; dosis bajas de aflatoxinas producen deficiencia en el crecimiento, raquitismo y disminución en el tamaño de los huevos (Bryden, 2012).

En lo que se refiere a la agricultura, la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) estima que un 25% de los cultivos de alimentos es afectado por la presencia de hongos y sus micotoxinas, inhabilitando su consumo (Wilson *et al.*, 2002). A nivel mundial, la contaminación por aflatoxinas en el sector agropecuario resulta en pérdidas económicas estimadas en casi un billón de dólares por año (IARC, 2012).

EFFECTOS DE LAS AFLATOXINAS EN LA SALUD DE HUMANOS

Las aflatoxinas (AFs) llegan al humano por la ingestión de granos contaminados y de alimentos que derivan de los mismos (aceite, vino, nueces, tortillas, mantequilla de cacahuete, mazapanes, etc.). También, a través del consumo de carne y leche proveniente de animales, que a su vez, ingirieron alimento contaminado con estas micotoxinas (Yiannikouris y Jouany, 2002). La gran estabilidad química de estas moléculas, las mantiene intactas a través de la preparación industrial de los alimentos y durante su paso por el tracto gastrointestinal (Stoev, 2015).

Las aflatoxinas AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂ son potentes carcinogénicas; la AFM₁ es 10 veces menos cancerígena que la AFB₁ caracterizada como la aflatoxina más tóxica y el carcinogénico hepático más potente (IARC, 2002). El sistema hepático microsomal del citocromo P450, transforma a la AFB₁ en AFB₁-8-9-epóxido, un metabolito muy reactivo que forma aductos con las proteínas, el ARN y el ADN de los hepatocitos. La unión del AFB₁-8-9-epóxido con el ADN puede llegar a causar mutaciones en el codón 249 del gen supresor de tumores p53 que es una alteración característica en cáncer de hígado (Wild y Turner, 2002).

La toxicidad aguda en humanos es la menos documentada. Ocurre esporádicamente por el consumo de alimentos altamente contaminados con AFs. Induce vómito, anorexia hemorragias, daño al hígado, edema pulmonar y cerebral, necrosis y muerte, si las dosis son muy altas (Wild y

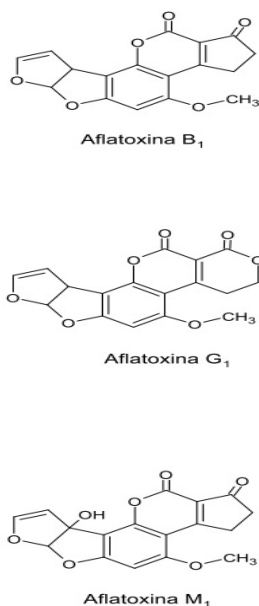


Figura 1. Estructura química de las principales aflatoxinas.
Figure 1. Chemical structure of main aflatoxins.

Gong, 2010). En el 2004 se presentó un caso en Kenia con la intoxicación de 325 personas que derivaron en 125 muertes por consumo de maíz contaminado con niveles de aflatoxinas entre 20 y 8000 µg/Kg (Lewis *et al.*, 2005). La toxicidad crónica es más común y se debe al consumo de pequeñas cantidades de AFs. Sus efectos dependen de diversos factores como la edad, el estado nutricional y de salud, el tiempo y la dosis de exposición (Wild y Gong, 2010). En los humanos la toxicidad crónica por aflatoxinas puede provocar cáncer hepático, aumentando hasta 30 veces el riesgo de este padecimiento en personas infectadas con el virus de la hepatitis B (Groopman *et al.*, 2005).

La exposición crónica a AFs también está asociada a desórdenes en el sistema inmune y a disminución en el peso y talla de infantes. Además, induce disminución en la actividad de linfocitos B y T y de las funciones efectoras de los macrófagos; disminuye la resistencia a infecciones crónicas y secundarias (Raiola *et al.*, 2015). Otros efectos documentados incluyen encefalopatía, reducción en la producción de esperma y la viabilidad de los espermatozoides, así como degeneración testicular y degeneración de lípidos en las vísceras (CAST, 2003).

OCURRENCIA Y NIVELES PERMITIDOS DE AFLATOXINAS EN ALIMENTOS

Las AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂ se encuentran como mezclas en cereales y sus derivados, nueces, cacahuates y especias contaminados. Regularmente la AFB₁ es la que se encuentra en mayor proporción. Los reportes de los países de la Unión Europea indican mayor contaminación en nueces de la india, especias y pistachos (0.2 a 0.4 µg/Kg de AFs totales). Otros alimentos contaminados son higos, dátiles, almendras y avellanas (EFSA, 2007). La contaminación con aflatoxinas en maíz ocurre principalmente en los países en desarrollo (Kussaga *et al.*, 2014; Lewis *et al.*, 2005). La AFM₁ se encuentra principalmente en leche y procede de la contaminación de alimento para ganado (harina de maíz, de algodón, de cacahuate y otros) (Wild y Gong, 2010).

El número de países que regulan el contenido de aflatoxinas en los alimentos ha aumentado significativamente a través de los años. Los límites tolerados dependen del tipo y destino del alimento y del país que los exporta y pueden enunciarse de acuerdo al contenido total de AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFB₂, o estar indicadas específicamente para la AFB₁ (Marin *et al.*, 2013).

En la Unión Europea (UE), el límite de AFB₁ para cacahuate, nuez, fruta seca y sus derivados y para cereales y derivados es de 2.0 µg/kg. El límite máximo de AFB₁ para almendras, pistachos y albaricoques es de 12.0 µg/kg. Algunos países como Alemania, Dinamarca, Austria, Finlandia, Suecia y España tienen sus propios límites para AFB₁. Por ejemplo 4 µg/kg en Austria, mientras que Australia, Nueva Zelanda, Canadá y los países de Medio Oriente permiten 15.0 µg/kg en diferentes tipos de nueces, pistachos y cacahuates. En Estados Unidos de Norteamérica el límite para esta aflatoxina es de 20.0 µg/kg. Por otro lado, la India permite hasta 30.0 µg/

kg en trigo, maíz, sorgo, arroz, lentejas y otras leguminosas (Kubo, 2012).

En México, la regulación de aflatoxina M₁ está dictada por la Norma Oficial Mexicana NOM-243-SSA1-2010, para leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado y derivados lácteos, donde se estipula que el límite máximo permitido de AFM₁ en este tipo de productos es de 0.5 µg/L. Dicho límite está basado en una equivalencia parcial con la norma del Codex Alimentarius para nivel máximo de AFM₁ en leche (CODEX STAN 232-2001). Este mismo límite se encuentra establecido en los Estados Unidos de Norteamérica y en los países del Mercosur (Marin *et al.*, 2013; CAST, 2003). En cambio, en la Unión Europea (UE), el límite de AFM₁ es 10 veces menor (0.05 µg/L) para leche cruda, leche pasteurizada y derivados lácteos. En el caso de leches de fórmula para lactantes el límite en la UE es de 0.025 µg/L (Diario Oficial de la Unión Europea, 2010). Esta diferencia en el límite máximo permitido en la UE se estableció desde 1994, y se fundamenta en el hecho de que al ser las aflatoxinas potentes carcinógenos, cualquier cantidad es suficiente para tener un efecto dañino en el organismo, por lo que los niveles deben de ser tan bajos como sean posibles (FAO, 2001).

PREVENCIÓN DE LA CONTAMINACIÓN POR HONGOS PRODUCTORES DE AFLATOXINAS

Como ya se indicó, las pérdidas anuales derivadas de la contaminación por micotoxinas son considerables y comprenden desde la producción hasta la comercialización de materias primas y alimentos. Por ello y por las consecuencias a la salud, se busca implementar sistemas de control que prevengan la contaminación con dichas toxinas. Ello implica llevar a cabo buenas prácticas agrícolas, de almacenamiento y manufactura, así como el Análisis de Riesgos y Puntos Críticos de Control (Denli y Pérez, 2006; FAO, 2003). La producción de micotoxinas en el campo disminuye significativamente evitando que el grano sea dañado tanto mecánicamente como por el ataque de insectos. Para ello, puede ayudar elegir variedades que muestren resistencia al ataque de hongos o las que expresen la toxina de *Bacillus thuringiensis*. También es importante la irrigación y fertilización adecuada, la cosecha a tiempo y con equipo en buenas condiciones, y el uso racional de agentes químicos y biológicos (Peraica *et al.*, 2002).

Durante el almacenamiento deben controlarse factores críticos como la temperatura y la disponibilidad de agua en el grano, así como el control de plagas. También es importante dar el mantenimiento adecuado a los silos, secar al grano convenientemente y protegerlo de la humedad después del secado, evitando tiempos excesivos de almacenamiento (Kussaga *et al.*, 2014).

DESCONTAMINACIÓN O DETOXIFICACIÓN DE AFLATOXINAS

Para el caso de productos contaminados, se busca reducir o eliminar la presencia de aflatoxinas mediante diversas

medidas correctivas. La descontaminación o detoxificación puede realizarse por métodos físicos, químicos y biológicos, o por combinaciones de ellos. La condición es que no alteren las propiedades nutricionales y organolépticas del alimento (Soriano, 2007). La limpieza, clasificación y segregación de los granos puede ayudar a disminuir los niveles de contaminación, más no prevenirlos completamente (Kussaga *et al.*, 2014). Una gran variedad de productos químicos han sido probados en la descontaminación de AFs. Entre ellos destacan varios ácidos, bases, aldehídos, agentes oxidantes, bisulfito de sodio y algunos gases. Sin embargo, el uso de la mayoría es impráctico. La razón es que algunos dan lugar a la formación de residuos tóxicos y otros afectan las características sensoriales y nutricias del alimento (Soriano, 2007).

Entre los métodos químicos implementados se encuentra el uso de sales de amonio. Estos compuestos degradan a las micotoxinas a metabolitos menos tóxicos. Se usan como tratamiento para harinas de pasta de algodón, girasol y cacahuate destinadas a consumo animal. Sin embargo, disminuye el valor nutricional del alimento (Bryden, 2012). Actualmente se evalúan el uso de bisulfito de sodio y de ozono en la posible destrucción de aflatoxinas (Adegoke y Letuma, 2013).

La adición de adsorbentes o unidores de aflatoxinas a los alimentos contaminados, es una técnica prometedora. La estrategia pretende que el adsorbente establezca fuertes interacciones con las aflatoxinas para impedir que estas se absorban en el tracto gastrointestinal del animal (Womack *et al.*, 2014). Entre las arcillas que se usan se encuentra el aluminosilicato de sodio y calcio (HASCAS), que ha demostrado ser inocuo para animales y humanos (Adegoke y Letuma, 2013). El HASCAS es específico para aflatoxinas y su eficiencia depende de la dosis (Smith *et al.*, 1994). El carbón activado resulta efectivo para adsorber algunas micotoxinas como la zearalenona (Alegakis *et al.*, 1999). Sin embargo, para las aflatoxinas los resultados son muy variables debido a que el proceso de absorción no siempre es eficiente (Diaz *et al.*, 2004; Bonna *et al.*, 1991; Galvano *et al.*, 1996). Otras arcillas que pueden resultar eficaces son la bentonita de sodio y la tierra de diatomeas (Womack *et al.*, 2014). Entre los métodos biológicos se propone el uso de carbohidratos complejos, como los galactomananos y el de microorganismos, como levaduras y los probióticos capaces de unir aflatoxinas (Ahlberg *et al.*, 2015; Campagnollo *et al.*, 2015).

DESCONTAMINACIÓN BIOLÓGICA: PROBIÓTICOS QUE UNEN MICOTOXINAS

La mayoría de los métodos físicos y químicos usados en la descontaminación de aflatoxinas presentan diversas limitaciones que comprometen su aplicación. Se han usado principalmente en alimento para ganado, como es el caso de los adsorbentes de aflatoxinas. Algunos de ellos deben añadirse en cantidades importantes, afectando el valor nutricional del alimento. Otros, como las arcillas pueden contener residuos tóxicos, como dioxinas y metales pesados (O'Day y Vlassopoulos, 2010).

La desintoxicación biológica es un método prometedora para materias primas y alimentos contaminados ya que permite la eliminación de AFs en condiciones poco agresivas, preservando los atributos del alimento (Adegoke y Letuma, 2013). El proceso se basa en el establecimiento de interacciones biológicas entre las aflatoxinas y los elementos de la pared celular de algunos microorganismos generalmente reconocidos como seguros (GRAS, por sus siglas en inglés), como las bacterias ácido lácticas y otros probióticos (Salim, 2011).

El-Nezami *et al.* (1998) estudiaron la capacidad de diferentes bacterias Gram+ y Gram- para eliminar aflatoxina B₁ de un medio contaminado. Las Gram+ mostraron los mejores resultados, entre ellas *Lactobacillus rhamnosus* GG y *L. rhamnosus* LC705, las cuales removieron hasta el 80% de la AFB₁ presente. Shetty y Jespersen (2006) examinaron la habilidad de enlazar aflatoxina B₁ por diferentes cepas de bacterias ácido lácticas y levaduras. Los mejores resultados se obtuvieron con las cepas de *L. plantarum* y *L. fermentum*, las cuales eliminaron el 60% de AFB₁ de una solución salina contaminada.

Experimentos *in vitro*, demostraron que varias especies de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* viables, son capaces de unir AFM₁ en soluciones acuosas y en leche reconstituida. Los rangos de unión encontrados fueron de 10.22 a 26.65% y de 7.85 a 25.94%, respectivamente. La bacteria que presentó mayor porcentaje de unión fue *Bifidobacterium bifidum* Bb 13 (Kabak y Var, 2008). Los autores no encontraron diferencia estadística significativa ($p \leq 0.05$), al realizar el experimento con las bacterias muertas (90°C, 15 min) o al ensayar diferente concentración de AFM₁ (5, 10, 20 ng.mL⁻¹) y tiempos de exposición a la bacteria (0, 4 y 24h; 37 °C), indicando que la unión se presenta en los primeros momentos de la exposición. Después de cada tiempo de incubación las bacterias se precipitaron por centrifugación y se determinó el contenido de aflatoxina en el sobrenadante por HPLC.

Pierides *et al.* (2000), investigaron la capacidad de unión a AFM₁ con diferentes especies de *Lactobacillus* en soluciones acuosas encontrando capacidades de unión entre 18 y 54 %. En este estudio *L. rhamnosus* LC705 unió mayor cantidad de aflatoxina cuando se encontraba viable en leche que cuando fue inactivado por calor o cuando el estudio se realizó en solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS). Por otra parte, Serrano-Niño *et al.* (2013) observaron que *B. bifidum* NRRL B-41410 y *L. johnsonii* NRRL B-2178 pudieron unir 45 y 32 % de AFM₁ en leche contaminada. Se conoce poco sobre el efecto que tienen los componentes de la matriz (p.e. leche u otro alimento) en la unión bacteria-AF, siendo un área de oportunidad para nuevas investigaciones.

Kabak y Ozbey (2012) determinaron la bio-accesibilidad *in vitro* de diferentes AFs en 7 alimentos contaminados y la efectividad de diferentes probióticos (*B. longum*, *L. rhamnosus*, *B. species 420*, *L. acidophilus* NCFM 150B y *L. casei* Shirota) para disminuirla. La bio-accesibilidad encontrada en AFB₁ (85.1-98.1%), AFG₁ (85.3-95.1%), AFB₂ (83.3-91.8%) y AGB₂ (80.7-91.2%) fue independiente del tipo de alimento

estudiado. La presencia de probióticos disminuyó significativamente ($p < 0.05$) la bio-accesibilidad (10.5 a 35.6 %), dependiendo del tipo de aflatoxina, del alimento y de la especie de probiótico. En general el probiótico más eficiente fue *L. acidophilus* NCFM 150B y el que menos unió aflatoxinas fue *L. casei* Shirota. Serrano-Niño *et al.* (2013) llevaron a cabo un estudio de bio-accesibilidad similar, determinando la capacidad de 4 cepas (*Lactobacillus reuteri* NRRL B-14171, *Lactobacillus rhamnosus* NRRL B-442, *Lactobacillus johnsonii* NRRL B-2178 y *Bifidobacterium bifidum* NRRL B-41410) para disminuir la bioaccesibilidad de AFM₁. La reducción de la bio-accesibilidad fluctuó desde 22.72 hasta 45.17 % dependiendo de la cepa, siendo el probiótico más eficiente *B. bifidum* NRRL B-41410.

La concentración de bacteria también es importante (Peltonen *et al.*, 2001). Ésta debe exceder siempre 1×10^9 UFC/mL y su efectividad es cepa específica (Peltonen *et al.*, 2001; Bolognani *et al.*, 1997). Por ejemplo, concentraciones de 2×10^9 UFC/mL de *L. rhamnosus* GG y *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* JS, removieron 74 y 63 % de AFB₁, mientras que 5×10^9 UFC/mL de *L. acidophilus* o *B. longum* removieron únicamente el 13 % (Bolognani *et al.*, 1997). Por otro lado, concentraciones de 10^{10} UFC/mL de *L. rhamnosus* GG, remueven hasta el 80 % de la AFB₁ presente. Pizzolitto *et al.* (2012) analizaron la unión de *L. rhamnosus* I, y *L. fermentum* 23 a diferentes concentraciones (50, 100 y 500 ng/mL) de AFB₁, encontrando mayores porcentajes de unión a la concentración de 50 ng/mL.

El-Khoury *et al.* (2011), probaron que la combinación de bacterias ácido lácticas (BAL), *L. bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*, une hasta 90% de AFM₁, dependiendo del tiempo de exposición. Resultados similares reportaron Corassin *et al.* (2013), al utilizar a las BAL en combinación con *Saccharomyces cerevisiae*.

En resumen, la capacidad de los probióticos para unir aflatoxinas depende de género, especie y cepa, del tipo y concentración de aflatoxina; de la concentración y viabilidad de la bacteria y del tipo de matriz contaminada. Además, puede presentarse un efecto sinérgico cuando se usan mezclas de probióticos.

Caracterización de la unión probiótico-aflatoxina

La caracterización del complejo probiótico-aflatoxina es crucial para poder escalar la remoción por bacterias, a nivel industrial. Como ya se indicó, la afinidad de la unión depende del tipo de bacteria y de aflatoxina estudiada. Es importante entonces, conocer las moléculas involucradas en el biorreconocimiento de la bacteria hacia la aflatoxina y las interacciones que se establecen, con el fin de escoger la especie o cepa más adecuada.

En estudios con *L. rhamnosus* GG y *L. rhamnosus* LC705 se demostró que la unión con AFs ocurre en la superficie de la bacteria (Haskard *et al.*, 2000, 2001; Peltonen *et al.*, 2001). La interacción se lleva a cabo tanto con bacterias viables como no-viables y puede detectarse con anticuerpos anti-aflatoxina, cuya masa molecular (55 kDa) les impide atravesar

la pared celular bacteriana (Kabak y Var, 2008; Haskard *et al.*, 2000, 2001). La unión no produce cambios en la molécula de aflatoxina y puede clasificarse como un proceso de bio-adsorción (Pizzolitto *et al.*, 2012).

La asociación se lleva a cabo mediante interacciones no covalentes (reversibles). Prueba de ello fue que la interacción se perdió al lavar las bacterias con solventes orgánicos, siendo el cloroformo el más efectivo para romper la unión. Los lavados consecutivos con agua también producen la liberación de AFs (Oatley *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2003). La biomasa liofilizada no pierde su capacidad de unión a la AFB₁, mientras que la deshidratada por aspersion, sí (Bovo *et al.*, 2014). Estos resultados concuerdan con la evidencia de que la unión se lleva a cabo con la pared celular ya que el secado por aspersion puede dañar la estructura y funcionalidad de la pared celular (Bovo *et al.*, 2014).

Para conocer la naturaleza de las moléculas involucradas en la asociación probiótico-aflatoxina, Haskard *et al.* (2000, 2001) sometieron a *L. rhamnosus* GG y *L. rhamnosus* LC705 a la acción de diferentes agentes. Dado que la adición de pronasa y periodato ocasionó una disminución de la interacción, se concluyó que están involucradas proteínas del tipo glicoconjugados (peptidoglicanos) y carbohidratos (polisacáridos) de la pared celular. Por otra parte, micrografías electrónicas muestran una posible interacción con polisacáridos, mientras que los estudios realizados por Lahtinen *et al.* (2004) probaron que los sitios de unión de la AFB₁ en *L. rhamnosus* GG involucran preferentemente a los peptidoglicanos. La interacción con lípidos quedó descartada debido a que los tratamientos con lipasas no afectan la estabilidad de la unión (Lim y Anh, 2013; Haskard *et al.*, 2000)

Otros investigadores han documentado la interacción con el ácido teicoico (Hernández-Mendoza *et al.*, 2009). La pared celular de las bacterias ácido lácticas consiste en una matriz de peptidoglicanos que albergan otros componentes tales como ácido teicoico y lipoteicoico, una capa S proteica y polisacáridos neutros. Estos componentes juegan un papel importante en la adhesión y bio-reconocimiento de las bacterias hacia diferentes moléculas (Delcour *et al.*, 1999). Es importante destacar que el ácido teicoico constituye más del 50% (p/p) del peso total de la pared celular y por ello, las posibilidades de que esté involucrado en la unión de aflatoxinas, son importantes.

Hernández-Mendoza *et al.* (2009) encontraron una disminución de la unión de AFB₁ con *L. rhamnosus* en presencia de iones Ca²⁺. Esto se explica por la naturaleza aniónica de los ácidos teicoicos que promueven la captación de cationes, bloqueando posiblemente las interacciones con las AFs. La naturaleza catiónica de la unión propuesta por estos investigadores también correlacionó con la presencia de fosfatos en los ácidos teicoicos, ya que aquellas bacterias que mostraron deficiencia en fosfatos fueron las menos eficientes para unir AFB₁.

En cambio, Haskard *et al.* (2000) descartaron el establecimiento de interacciones electrostáticas con el ácido teicoico, ya que la presencia de cationes mono y divalentes

a diferente fuerza iónica no afectó a la unión de *L. rhamnosus* GG con las AFs. Por el contrario, agentes caotrópicos como la urea si lo hacen, indicando la posibilidad de que las interacciones sean de origen hidrofóbico (Haskard *et al.*, 2000). Por ello, algunos investigadores defienden la idea de que las interacciones hidrofóbicas que puede establecer el ácido teicoico, son más importantes (Delcour *et al.*, 1999). Este hecho puede explicar por qué la interacción de los probióticos con la AFB₁, hidroxilada y más polar, es menor que con la AFB₁ cuya molécula es más hidrofóbica (El-Nezami *et al.*, 1998). En otros estudios se observó que los tratamientos térmicos aumentan la eficiencia de la unión de lactobacilos con AFB₁, apoyando la idea de que las interacciones hidrofóbicas son importantes ya que, se especula que al desnaturalizarse las proteínas de la superficie celular, se exponen sus regiones hidrofóbicas (Haskard *et al.*, 2000). En contraste, los tratamientos con enzimas que oxidan carbohidratos, disminuyen la interacción, apoyando también la idea de que las interacciones pueden ser hidrofílicas (Lim y Anh, 2013; Lahtinen *et al.*, 2004). También se ha observado una concordancia entre la capacidad de unión de lactobacilos y bifidobacterias a diferentes AFs, (AFB₁ > AFB₂ > AFG₁ > AFG₂) que correlaciona con el aumento en su polaridad (Haskard *et al.*, 2000). Sin embargo, se requieren estudios más finos para poder caracterizar la naturaleza de la unión o uniones, recordando además que éstas pueden diferir dependiendo de la especie y cepa de probiótico utilizada.

En este contexto, se ha estudiado el efecto de diferentes valores de pH en la unión y estabilidad del complejo bacteria-aflatoxina, con el fin de conocer si están involucradas interacciones electrostáticas. Los resultados encontrados son contradictorios. Lim y Ahn (2013) probaron que la unión de AFB₁ a *L. rhamnosus* DJ42 (53.4 ± 2.1%) y *L. fermentum* DJ45 (30.6 ± 2.7%) no se vio afectada en un rango de pH de 3.0 a 7.0. Bovo *et al.* (2014) no encontraron diferencia significativa ($p < 0.05$) entre la unión de AFB₁ a *L. rhamnosus* a pH de 3.0 (45.9 ± 8.8%) y 6.0 (35.8 ± 7.7%). Por otro lado, Bolognani *et al.* (1997) demostraron que la unión de *B. longum* a AFB₁ ocurre a pH 5.0. En concordancia con ellos, Hernández-Mendoza *et al.* (2009), probaron que la mayor interacción de AFB₁ con diferentes cepas de *L. casei* Shirota se presentó a pH de 6.0 y disminuyó entre 7.2 y 8.0.

Los diferentes resultados encontrados dan soporte a la hipótesis de que existan diferencias moleculares en los sitios de unión de la pared celular de las bacterias (Kabak y Ozbey, 2012; Hernández-Mendoza *et al.*, 2009). Es decir, que pequeños cambios moleculares en los receptores promuevan el establecimiento de mayores interacciones entre la bacteria y las AFs, aumentando la afinidad y estabilidad de la unión, o viceversa. Lo anterior es indicativo de la importancia y la necesidad de conocer mejor la naturaleza de todas las interacciones involucradas.

Serrano-Niño *et al.* (2015) aislaron el ácido teicoico (AT) de 14 cepas de *Lactobacillus* para correlacionar sus diferencias moleculares con la efectividad de estos probióticos para unir AFB₁. En base al análisis composicional y a la información existente propusieron 4 estructuras para AT conformadas por

un polímero de ribitol-fosfato con variaciones en el contenido de D-alanina y presentando residuos de glucosa y/o glicerol. Sus correlaciones entre la composición de los AT y la eficiencia para unir AFB₁ indicaron que la D-alanina y la glucosa son importantes para la interacción. El estudio es exploratorio y debe complementarse con otros más específicos. Por ejemplo, la obtención de espectros de H1 y C13 mediante la resonancia magnética nuclear aportaría información importante para corroborar las estructuras propuestas. Sin embargo, los resultados obtenidos son una contribución importante para la elucidación de las interacciones de las aflatoxinas con la pared celular de los probióticos. Sintetizando los resultados de los estudios mencionados, hasta el momento se conoce que: a) la unión y liberación de aflatoxinas a la pared celular de lactobacilos y bifidobacterias es un proceso rápido y reversible que se establece mediante interacciones no covalentes; b) no involucra la modificación química de las AFs y puede clasificarse como una bioadsorción; c) la cantidad de aflatoxina removida depende del tipo y concentración inicial de aflatoxina y de la cepa bacteriana utilizada; d) para que la unión se lleve a cabo es necesario que la pared celular no pierda su integridad; e) el tratamiento de la pared celular con diferentes enzimas descarta la participación de los lípidos en la unión AF-probiótico y aporta evidencia de que ésta se lleva a cabo entre las aflatoxinas y proteínas, carbohidratos o su combinación (proteoglicanos); f) Las contradicciones entre resultados que indican que la unión AF-probiótico se establece mediante interacciones hidrofóbicas y otros que prueban el establecimiento de interacciones mediante cargas eléctricas con el ácido teicoico, han llevado a la hipótesis de que existen pequeñas diferencias moleculares en los sitios de unión; y g) las diferencias en composición de los ácidos teicoicos de 14 especies de lactobacilos y su correlación con la efectividad de la unión AF-probiótico dan soporte a la hipótesis mencionada.

¿Qué falta por hacer?

A lo largo de los años se ha avanzado en el conocimiento sobre las cepas con potencial de ser utilizadas, el efecto de diversos factores en la unión bacteria-aflatoxina y las bases de la naturaleza química de dicha unión. Sin embargo, las diferencias en los resultados obtenidos indican que es necesario realizar estudios más finos que nos permitan conocer mejor la cinética de unión y liberación y la naturaleza química de los receptores involucrados. Un aspecto interesante de resaltar es la necesidad de realizar estudios de la eficiencia de la unión AF-probiótico de una misma cepa a diferentes fases de crecimiento del microorganismo, ya que los componentes de la pared celular pueden cambiar (Laakso *et al.*, 2011).

También existe la necesidad de obtener datos más precisos sobre las diferencias estructurales de los posibles ligandos involucrados en la unión AF-probiótico. Entre las técnicas que pueden ayudar se encuentra la resonancia magnética nuclear, que puede aportar datos sobre las diferencias estructurales de las paredes celulares de los probióticos.

Vinogradov *et al.* (2013) la usaron con éxito para detectar diferencias estructurales muy específicas entre cepas de *L. helveticus*, relacionadas con su eficiencia para madurar el queso. La resonancia de plasmones de superficie puede ser útil para estudiar la cinética y las constantes de afinidad de la unión AF-probiótico (Kinouchi *et al.*, 2014). Sin embargo, se requiere contar con técnicas de purificación adecuadas para obtener ligandos puros, lo cual representa un inconveniente. Por ejemplo, la técnica disponible para los ácidos teicoicos permite su aislamiento eliminando otras moléculas, provenientes de la pared celular (Serrano-Niño *et al.*, 2015).

Se requieren también estudios para investigar los mecanismos involucrados en la formación *in vitro* del complejo AF-probiótico. Entre las técnicas que pueden ayudar a este propósito se encuentran la espectroscopia de infrarrojo (IR) y la modelación computacional que ya se han utilizado para modelar la interacción entre la AFB₁ y la arcilla de esmectita. Con base en estas técnicas se encontró que los oxígenos del grupo carbonilo de la AFB₁ juegan un papel muy importante en la unión de la aflatoxina con la arcilla a través de interacciones ion dipolo/enlaces coordinados y puentes de hidrógeno. También involucran a los oxígenos del anillo dehidrofurano en la interacción (Deng *et al.*, 2014; Deng y Szczerba, 2011). En general, entre más conozcamos de la unión aflatoxina-probiótico, mayor posibilidad habrá de escalarla y utilizarla con éxito para la detoxificación de aflatoxinas.

CONCLUSIONES

La bioadsorción de aflatoxinas usando probióticos es un método promisorio que puede contribuir a disminuir los problemas agropecuarios y de salud pública causados por estas toxinas. La evidencia científica muestra que los probióticos unen aflatoxinas estableciendo interacciones reversibles con estas moléculas a través de diversos componentes de su pared celular. Debido a que la interacción es especie y cepa específica y a que existe controversia entre los resultados sobre los tipos de interacción química involucrados, se presume que existen diferencias entre las paredes celulares que son fundamentales para la efectividad de la unión y por tanto de remoción. Sin embargo, hasta el momento, se conoce poco sobre estas diferencias. Por esta razón se requiere de estudios más finos para poder complementar la caracterización de la unión a fin de encontrar la cepa y las condiciones más adecuadas para escalar exitosamente el proceso de detoxificación en productos específicos.

REFERENCIAS

- Adegoke, G. O., Letuma, P. 2013. Strategies for the prevention and reduction of mycotoxins in developing countries. En *Mycotoxin and Food Safety in Developing Countries*. H.A. Makun (ed.), pp. 123-136. InTech. Rijeka, Croatia.
- Ahlberg, S. H., Joutsjoki, V., Korhonen, H. J. 2015. Potential of lactic acid bacteria in aflatoxin risk mitigation. *Int J Food Microbiol.* 207: 87-102.
- Alegakis A.K., Tsatsakis, A.M., Shtilman, M.I., Lysovenko, D.L., Vlachonikolis, I.G. 1999. Deactivation of mycotoxins. I. An *in vitro* study of zearalenone adsorption on new polymeric adsorbents. *J Environ Sci Health B.* 34: 633-644.
- Bhatnagar, D., Yu, J., Ehrlich, K. C. 2002. Toxins of filamentous fungi. *Chem Immunol.* 81: 167-206.
- Bolognani, F., Rumney, C. J., Rowland I. R. 1997. Influence of carcinogen binding by lactic acid producing bacteria on tissue distribution and *in vivo* mutagenicity of dietary carcinogens. *Food Chem Toxicol.* 35: 535-545.
- Bonna, R.J., Aulerich, R.J., Bursian, S.J., Poppenga, R.H., Braselton, W.E., Watson, G.L. 1991. Efficacy of hydrated sodium calcium aluminosilicate and activated charcoal in reducing the toxicity of dietary aflatoxin to mink. *Arch Environ Contam Toxicol.* 20: 441-447.
- Bovo, F., Franco, L. T., Rosim, R. E., Fávoro-Trindade, C. S., Fernandes-de-Oliveira, C. A. 2014. The ability of *Lactobacillus rhamnosus* in solution, spray-dried or lyophilized to bind aflatoxin B₁. *J Food Res.* 3(2): 35-42.
- Bryden, W. L. 2007. Mycotoxins in the food chain: human health implications. *Asia Pac J Clin Nutr.* 16(1): 95-101.
- Bryden, W. L. 2012. Mycotoxin contamination of the feed supply chain: Implications for animal productivity and feed security. *Anim Feed Sci Tech.* 173(1-2): 134-158.
- Campagnollo, F. B., Franco, L. T., Rottinghaus, G. E., Kobashigawa, E., Ledoux, D. R., Daković, A., Oliveira, C. A. F. 2015. *In vitro* evaluation of the ability of beer fermentation residue containing *Saccharomyces cerevisiae* to bind mycotoxins. *Food Res Int.*
- CAST. 2003. Mycotoxins: Risks in Plant, Animal and Human Systems. Task Force Report, no. 139. Council for Agricultural Science and Technology. Iowa, United States.
- Codex Alimentarius. CODEX STAN 232-2001. Aflatoxina M₁ en la leche: Nivel máximo. Normas internacionales de los alimentos. Organización Mundial de la Salud.
- Corassin, C. H., Bovo, F., Rosim, R. E., Oliveira, C. A. F. 2013. Efficiency of *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria strains to bind aflatoxin M₁ in UHT skim milk. *Food Control.* 31: 80-83.
- Delcour, J., Ferain, T., Deghorain, M., Palumbo, E., Hols, P. 1999. The biosynthesis and functionality of the cell-wall of lactic acid bacteria. *Anton van Leeuw.* 76: 159-184.
- Deng, Y., Liu, L., Velázquez-Barrientos, A. L., Szczerba, M., Dixon, J. B. 2014. Aflatoxin control: safeguarding animal feed with calcium smectite. B. Dixon, A.L. Velázquez-Barrientos, Y. Deng (ed.), pp. 27-43. American Society of Agronomy and Soil Science Society of America, Guilford Road, Madison, WI, USA.
- Deng, Y., Szczerba, M. 2011. Computational evaluation of bonding between aflatoxin B₁ and smectite. *Appl Clay Sci.* 54(1): 26-33.
- Denli, M., Pérez, J. F. 2006. Contaminación por micotoxinas en los piensos: efectos, tratamiento y prevención. XXII Curso de Especialización FEDNA. Universidad Autónoma de Barcelona. Barcelona, España.
- Diario Oficial de la Unión Europea. 2010. Reglamento (EU) n° 165/2010 de la comisión. Web Oficial de la Unión Europea.
- Díaz, D.E., Hagler, W.M. Jr., Blackwelder, J.T., Eve, J.A., Hopkins, B.A., Anderson, K.L., Jones, F.T., Whitlow, L.W. 2004. Aflatoxin binders II: Reduction of aflatoxin M₁ in milk by sequestering agents of cows consuming aflatoxin in feed. *Mycopathologia.* 157: 233-241.

- EFSA (European Food Safety Authority). 2007. Opinion of the Scientific Panel on contaminants in the food chain related to the potential increase of consumer health risk by a possible increase of the existing maximum levels for aflatoxins in almonds, hazelnuts and pistachios and derived products. *EFSA J*. 446: 1–127.
- El-Khoury, A., Atoui, A., Yaghi, J. 2011. Analysis of aflatoxin M₁ in milk and yogurt and AFM₁ reduction by lactic acid bacteria used in Lebanese industry. *Food Control*. 22: 1695-1699.
- El-Nezami, H. 2012. Interaction of probiotics and mycotoxins: benefits to human health. The 6th Asian Conference on Food and Nutrition Safety. International Life Sciences Institute (ILSI).
- El-Nezami, H., Kankaanpää, P., Salminen, S., Ahokas, J. 1998. Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind a common food carcinogen, aflatoxin B₁. *Food Chem Toxicol*. 36: 321-326.
- FAO. 2001. Comments submitted on the draft maximum level for aflatoxin M₁ in milk. Joint FAO/WHO Food Standards Programme. Codex Committee on Food Additives and Contaminants. Thirty-third Session. The Hague, Netherlands.
- FAO. 2003. Manual sobre la aplicación del sistema de Análisis de Peligros y de Puntos Críticos de Control (APPCC) en la prevención y control de las micotoxinas. Estudio FAO Alimentación y Nutrición. Vol. 73. Food and Agriculture Organization. Roma, Italia.
- Galvano, F., Pietri, A., Bertuzzi, T., Fusconi, G., Galvano, M., Piva, A., Piva, G. 1996. Reduction of carryover of aflatoxin from cow feed to milk by addition of activated carbons. *J Food Prot*. 59: 551-554.
- Groopman, J. D., Johnson, D., Kensler, T. W. 2005. Aflatoxin and hepatitis B virus biomarkers: a paradigm for complex environmental exposures and cancer risk. *Cancer Biomark*. 1(1): 5-14.
- Haskard, C. A., El-Nezami, H. S., Kankaanpää, P. E., Salminen, S., Ahokas, J. T. 2001. Surface binding of aflatoxin B₁ by lactic acid bacteria. *Appl Environ Microbiol*. 67: 3086-3091.
- Haskard, C., Binnion, C., Ahokas, J. 2000. Factors affecting the sequestration of aflatoxin by *Lactobacillus rhamnosus* strain GG. *Chem Biol Interact*. 128: 394-9.
- Hassanain, N. A., Hassanain, M. A., Ahmed, W. M., Shapaan, R. M., Barakat, A. M., El Fadaly, H. A. M. 2013. Public health importance of foodborne pathogens. *World J Med Sci*. 9(4): 208-222.
- Hernández-Mendoza, A., Guzmán-de-Peña, D., García, H. S. 2009. Key role of teichoic acids on aflatoxin B₁ binding by probiotic bacteria. *J Appl Microbiol*. 107: 395-403.
- IARC (International Agency for Research on Cancer). 2002. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Vol. 82. International Agency for Research on Cancer. Lyon, France.
- IARC. 2012. Economics of mycotoxins: evaluating costs to society and cost-effectiveness of interventions. *IARC Sci Publ*. 158: 119-129.
- Kabak, B., Ozbey, F. 2012. Assessment of the bioaccessibility of aflatoxins from various food matrices using an *in vitro* digestion model, and the efficacy of probiotic bacteria in reducing bioaccessibility. *J Food Comp Anal*. 27(1): 21–31.
- Kabak, B., Var, I. 2008. Factors affecting the removal of aflatoxin M₁ from food model by *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. *J Environ Sci Health B*. 43(7): 617-624.
- Kinouchi, H., Arimoto, H., Nishiguchi, K., Oka, M., Maki, H., Kitagawa, H., Kamimori, H. 2014. Binding properties of antimicrobial agents to dipeptide terminal of lipid II using surface plasmon resonance. *Anal Biochem*. 452: 67-75.
- Kubo, M. 2012. Mycotoxins Legislation Worldwide. European Mycotoxins Awareness Network. Leatherhead Food Research.
- Kussaga, J. B., Jacxsens, L., Tiisekwa, B. P. M., Luning, P. A. 2014. Food safety management systems performance in African food processing companies: a review of deficiencies and possible improvement strategies. *J Sci Food Agr*. 94(11): 2154-2169.
- Laakso, K., Koskenniemi, K., Koponen, J., Kankainen, M., Surakka, A., Salusjärvi, T., Varmanen, P. 2011. Growth phase-associated changes in the proteome and transcriptome of *Lactobacillus rhamnosus* GG in industrial-type whey medium. *Microbial Biotech*. 4(6): 746-766.
- Lahtinen, S. J., Haskard, C. A., Ouwehand, A. C., Salminen, S. J., Ahokas, J. T. 2004. Binding of aflatoxin B₁ to cell wall components of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG. *Food Addit Contam*. 21(2): 158-164.
- Lee, Y. K., El-Nezami, H., Haskard, C. A., Gratz, S., Puong, K. Y., Salminen, S., Mykkanen, H. 2003. Kinetics of adsorption and desorption of aflatoxin B₁ by viable and nonviable bacteria. *J Food Prot*. 66: 426-430.
- Lewis, L., Onsongo, M., Njapau, H., Schurz-Rogers, H., Lubber, G., Kieszak, S., Rubin, C. 2005. Aflatoxin contamination of commercial maize products during an outbreak of acute aflatoxicosis in eastern and central Kenya. *Environ Health Persp*. 113(12): 1763-1767.
- Lim, S. M., Ahn, D. H. 2013. Incubation conditions and physico-chemical factors affecting aflatoxin B₁ binding of lactic acid bacteria. *Kor J Microbiol*. 49(3): 253-261.
- Marin, S., Ramos, A. J., Cano-Sancho, G., Sanchis, V. 2013. Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food Chem Toxicol*. 60: 218-237.
- Norma Oficial Mexicana. NOM-243-SSA1-2010. Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba. Diario Oficial de la Federación.
- O'Day, P. A., Vlassopoulos, D. 2010. Mineral-based amendments for remediation. *Elements*. 6(6): 375-381.
- Oatley, J. T., Rarick, M. D., Ji, G. E., Linz, J. E. 2000. Binding of aflatoxin B₁ to bifidobacteria *in vitro*. *J Food Prot*. 63: 1133-1136.
- Peltonen, K., El-Nezami, H., Haskard, C., Ahokas, J., Salminen, S. 2001. Aflatoxin B₁ binding by dairy strains of lactic acid bacteria and bifidobacteria. *J Dairy Sci*. 84: 2152-2156.
- Peraica, M., Domijan, A. M., Jurjevic, Z., Cvjetkovic, B. 2002. Prevention of exposure to mycotoxins from food and feed. *Arh Hig Rada Toksikol*. 53(3): 229-237.
- Pierides, M., El-Nezami, H., Peltonen, K., Salminen, S., Ahokas, J. 2000. Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind aflatoxin M₁ in a food model. *J Food Protect*. 63(5): 645-650.
- Pitt, J. I. 2000. Toxicogenic fungi and mycotoxins. *Br Med Bull*. 56: 184-192.
- Pizzolitto, R. P., Salvano, M. A., Dalcero, A. M. 2012. Analysis of fumonisin B₁ removal by microorganisms in co-occurrence with aflatoxin B₁ and the nature of the binding process. *Int J Food Microbiol*. 156(3): 214-221.

- Raiola, A., Tenore, G. C., Manyes, L., Meca, G., Ritieni, A. 2015. Risk analysis of main mycotoxins occurring in food for children: An overview. *Food Chem Toxicol.* 84: 169-180.
- Salim, A. B. 2011. Effect of some plant extracts on fungal and aflatoxin production. *Int J Acad Res.* 3: 116-120.
- Schatzmayr, G., Zehner, F., Täubel, M., Schatzmayr, D., Klimitsch, A., Loibner, A. P., Binder, E. M. 2006. Microbiologicals for deactivating mycotoxins. *Mol Nutr Food Res.* 50(6): 543-551.
- Serrano-Niño, J. C., Cavazos-Garduño, A., Cantú-Cornelio, F., Gonzalez-Cordova, A. F., Vallejo-Cordoba, B., Hernández-Mendoza, A., García, H. S. 2015. *In vitro* reduced availability of aflatoxin B₁ and acrylamide by bonding interactions with teichoic acids from lactobacillus strains. *LWT - Food Sci Technol.* 64(2): 1334-1341.
- Serrano-Niño, J. C., Cavazos-Garduño, A., Hernandez-Mendoza, A., Applegate, B., Ferruzzi, M. G., San Martin-González, M. F., García, H. S. 2013. Assessment of probiotic strains ability to reduce the bioaccessibility of aflatoxin M₁ in artificially contaminated milk using an in vitro digestive model. *Food Control.* 31: 202-207.
- Shetty, P., Jespersen, L. 2006. *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria as potential mycotoxin decontaminating agents. *Trends Food Sci Tech.* 17(2): 48-55.
- Smith, E.E., Phillips, T.D., Ellis, J.A., Harvey, R.B., Kubena, L.F., Thompson, J., Newton, G. 1994. Hydrated sodium calcium aluminosilicate reduction of AFM₁ residues in dairy goat milk. *J Anim Sci.* 72: 677-682.
- Soriano, J. M. 2007. *Micotoxinas en alimentos*. Ed. Díaz de Santos. Madrid, España.
- Stoev, S. D. 2015. Foodborne mycotoxicoses, risk assessment and underestimated hazard of masked mycotoxins and joint mycotoxin effects or interaction. *Environ Toxicol Phar.* 39(2): 794-809.
- Vinogradov, E., Valence, F., Maes, E., Jebava, I., Chuat, V., Lortal, S., Sadovskaya, I. 2013. Structural studies of the cell wall polysaccharides from three strains of *Lactobacillus helveticus* with different autolytic properties: DPC4571, BRO1, and LH1. *Carbohydr Res.* 379: 7-12.
- Wild, C. P., Gong, Y. Y. 2010. Mycotoxins and human disease: a largely ignored global health issue. *Carcinogenesis.* 31(1): 71-82.
- Wild, C. P., Turner, P.C. 2002. The toxicology of aflatoxins as a basis for public health decisions. *Mutagenesis.* 17(6): 471-481.
- Wilson, D., Mubatanhema, W., Jurjevic, Z. 2002. Biology and ecology of mycotoxigenic *Aspergillus* species as related to economic and health concerns. En *Mycotoxins and Food Safety*. J. DeVries, M. Trucksess, L. Jackson (ed.). Vol. 504, pp. 3-17. Ed. Springer. United States.
- Womack, E. D., Brown, A. E., Sparks, D. L. 2014. A recent review of non-biological remediation of aflatoxin-contaminated crops. *J Sci Food Agr.* 94(9): 1706-1714.
- Yiannikouris, A., Jouany, J.P. 2002. Mycotoxins in feeds and their fate in animals: a review. *Anim Res.* 51:81-99.