



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Unidad Iztapalapa

División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Departamento de Biotecnología

**Modelación molecular para determinar la
interacción de las proteínas de leche con
la aflatoxina M1**

TESIS

Para obtener el grado
Doctor en Biotecnología

Presenta

M. en B. Carlos Jiménez Pérez

Directores

Dra. Alma Elizabeth Cruz Guerrero

Dr. Julián Cruz Borbolla

Asesor

Dr. José Mariano García Garibay

Ciudad de México, marzo 2021



ACTA DE EXAMEN



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00241

Matrícula: 2153804223

Modelación molecular para determinar la interacción de las proteínas de la leche con aflatoxina M1



Con base en la Legislación de la Universidad Autónoma Metropolitana, en la Ciudad de México se presentaron a las 16:00 horas del día 24 del mes de marzo del año 2021 POR VÍA REMOTA ELECTRÓNICA, los suscritos miembros del jurado designado por la Comisión del Posgrado:

DR. JOSE MARIANO GARCIA GARIBAY
DR. IRIS NATZIELLY SERRATOS ALVAREZ
DR. CARLOS ZEPACTONAL GOMEZ CASTRO
DR. SALVADOR RAMON TELLO SOLIS

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTOR EN BIOTECNOLOGIA

DE: CARLOS JIMENEZ PEREZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

aprobar

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

[Signature]
CARLOS JIMENEZ PEREZ
ALUMNO

REVISÓ

[Signature]
MTRA. ROSALÍA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

[Signature]
DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTE

[Signature]
DR. JOSE MARIANO GARCIA GARIBAY

VOCAL

[Signature]
DR. IRIS NATZIELLY SERRATOS ALVAREZ

VOCAL

[Signature]
DR. CARLOS ZEPACTONAL GOMEZ CASTRO

SECRETARIO

[Signature]
DR. SALVADOR RAMON TELLO SOLIS

El presente documento cuenta con la firma –autógrafa, escaneada o digital, según corresponda- del funcionario universitario competente, que certifica que las firmas que aparecen en esta acta – Temporal, digital o dictamen- son auténticas y las mismas que usan los c.c. profesores mencionados en ella



APROBACIÓN DE TESIS POR JURADOS



El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud
de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis de doctorado:

Modelación molecular para determinar la interacción de las proteínas de leche con la aflatoxina M1

Presentada por:

M. en B. Carlos Jiménez Pérez

Comité tutorial:

Directora: Dra. Alma Elizabeth Cruz Guerrero

Director: Dr. Julián Cruz Borbolla

Asesor: Dr. José Mariano García Garibay

Jurado de evaluación:

Dr. José Mariano García Garibay

Presidente

Dr. Salvador Ramón Tello Solís

Secretario

Dra. Iris Natzielly Serratos Álvarez

Vocal

Dr. Carlos Zepactonal Gómez Castro

Vocal

Handwritten signatures of the evaluation jury members over horizontal lines.

Ciudad de México a 24 de marzo de 2021



Doctorado en Biotecnología
de la
Universidad Autónoma Metropolitana
está incluido en el
Programa Nacional de Posgrados de Calidad
del
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología
(CONACyT)
con la referencia 001466

Este trabajo se realizó con el apoyo del CONACyT

No. de CVU 518291 / No. de Becario 592514.



Agradecimiento especial

Al Laboratorio de Química Computacional del Área Académica de Química de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (UAEH).

y

Al Laboratorio de Supercómputo y Visualización en Paralelo (LSVP) de la UAM–Unidad Iztapalapa.

Donde pude realizar los análisis computaciones presentados en esta tesis.



RESUMEN

En el presente trabajo se realizó la evaluación de la interacción de la aflatoxina M1 (AFM1) con la proteína de la leche α -lactoalbúmina (α -LA) por métodos espectroscópicos para determinar los parámetros termodinámicos: constante de unión (K_u) y energía libre de unión (ΔG_u) así como describir la naturaleza de la interacción al calcular los cambios en la entalpía (ΔH) y entropía (ΔS), asimismo con la herramienta de acoplamiento molecular se modeló el sitio de unión de la AFM1 con la estructura cristalográfica de la α -LA obtenida a un pH de 6.5. Además, con diferentes modelos estructurales de la β -lactoglobulina (β -LG) a diferentes pH: 2.0, 6.5, 7.4 y 8.2 se modeló la forma de unión de la AFM1 en los tres sitios de unión reportados: el Cáliz, Sitio C y la interfaz del dímero, este último solo se estudió a pH 6.5 y 7.4. Estas evaluaciones se llevaron a cabo con la finalidad de describir la afinidad que presentan las proteínas de la leche por la AFM1 por medio de los parámetros termodinámicos, así como predecir los posibles sitios de unión.

Con los resultados de espectroscopía de fluorescencia se determinó que la AFM1 presenta interacciones hidrofóbicas con la α -LA obteniendo una K_u de $(2.12 \pm 0.59) \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ y una ΔG_u de $-19.17 \pm 0.96 \text{ kJ mol}^{-1}$, además, los espectros de dicroísmo circular mostraron que hay cambios en el ordenamiento de las estructuras secundarias α -hélices y hojas β al adicionar la micotoxina, con lo que se puede asumir que conforme se aumenta la concentración de la AFM1 el complejo α -LA-AFM1 se estabiliza.

Con la herramienta de acoplamiento molecular se observó que la micotoxina se une en las regiones hidrofóbicas de la α -LA: caja hidrofóbica y grupo aromático I con una ΔG_u de -26.07 y $-26.28 \text{ kJ mol}^{-1}$, respectivamente. Para el caso de la β -LG al realizar la comparación de las estructuras a los cuatro pH, se observó que en el Cáliz a pH de 2.0 y 6.5 el loop EF se encuentra en conformación cerrada y el área de la cavidad del Cáliz está más reducida en comparación a los pH 7.4 y 8.2 en los cuales el loop EF está abierto. En la región del Sitio C, se observó que a un pH 2.0 se forma una cavidad hidrofóbica, la cual va disminuyendo conforme se aumenta el pH obteniendo una naturaleza hidrofílica. A pesar de estos cambios estructurales la AFM1 formó complejo con los cuatro modelos estructurales de la β -LG a los diferentes pH.



Finalmente, se determinó que los complejos formados de β -LG-AFM1 a pH de 6.5 no presentaron diferencias en los parámetros de unión con una ΔG_u de -29.71, -28.70 y -28.03 kJ mol⁻¹ en el Cáliz, Sitio C e interfaz del dímero, respectivamente.

Como se puede observar las ΔG_u de los complejos formados con las dos proteínas a un pH de 6.5 son similares, por lo que se puede asumir que la afinidad de la α -LA y β -LG por la AFM1 es similar. Además, debido a que el pH de la leche es 6.8, se puede concluir que las proteínas de la leche son capaces de transportar la AFM1. Asimismo, la variación de la concentración de la micotoxina en la cuajada y el suero de leche durante la elaboración de queso puede ser explicada en parte por la variación de la afinidad que presentó la β -LG a diferentes valores de pH.



ABSTRACT

In the present work, the evaluation of the interaction of aflatoxin M1 (AFM1) with milk protein α -lactalbumin (α -LA) by spectroscopic methods was performed to determine the thermodynamic parameters: binding constant (K_b) and binding free energy (ΔG_b), as well as describe the nature of the interaction by calculating the changes in enthalpy (ΔH) and entropy (ΔS) also with the molecular docking was modeled the binding site of AFM1 with the crystallographic structure of α -LA obtained at pH 6.5. Besides, with β -lactoglobulin (β -LG) structural models at pH 2.0, 6.5, 7.4 and 8.2 was modeled the binding form of AFM1 at the three reported binding sites: the Calyx, Site C and the dimer interface, the latter was only studied at pH 6.5 and 7.4. These evaluations were carried out in order to describe the affinity of milk proteins for AFM1 by means thermodynamic parameters, as well as to predict the possible binding sites.

With the fluorescence spectroscopy results, it was determined that AFM1 presents hydrophobic interactions with α -LA obtaining a K_b of $(2.12 \pm 0.59) \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ and a ΔG_b of $-19.17 \pm 0.96 \text{ kJ mol}^{-1}$, furthermore, circular dichroism spectra showed that there are changes in the ordering of the secondary structures α -helices and β -sheet upon addition of the mycotoxin, whereby it can be assumed that as the concentration of AFM1 is increased the α -LA-AFM1 complex stabilizes.

According to the molecular docking, it was observed that the mycotoxin binds in the hydrophobic regions of the α -LA: hydrophobic box and the aromatic group I with a ΔG_b of -26.07 and $-26.28 \text{ kJ mol}^{-1}$, respectively. For the case of the β -LG when performing the comparison of the structures at the four pH, it was observed that in the Calyx at pH 2.0 and 6.5 the EF loop was found in the closed conformation and the area of the Calyx cavity is more reduced compared to pH 7.4 and 8.2 in which the EF loop is open. In the Site C region, it was observed that at pH 2.0 a hydrophobic cavity is formed which decreases as the pH increases obtaining a hydrophilic nature. Despite these structural changes, AFM1 formed a complex with all four structures of the β -LG at different pH.

Finally, it was determined that the complexes formed of β -LG-AFM1 at pH 6.5 showed no differences in binding parameters with a ΔG_b of -29.71 , -28.70 and $-28.03 \text{ kJ mol}^{-1}$ at the Calyx, Site C, and dimer interface, respectively.



As can be seen, the ΔG_b of the complexes formed with the two proteins at pH 6.5 is similar, so it can be assumed that the affinity of α -LA and β -LG for AFM1 is similar. Furthermore, because the pH of milk is 6.8, it can be concluded that milk proteins are capable of transporting AFM1. Also, the variation of mycotoxin concentration in curd and whey during cheese making can be partly explained by the variation of the affinity of β -LG at different pH.



ÍNDICE GENERAL

Acta de examen.....	b
Aprobación de tesis por jurados.....	c
Resumen	i
Abstract	iii
Índice de figuras	ix
Índice de cuadros	xiii
1 Introducción.....	1
2 Antecedentes.....	2
2.1 Micotoxinas.....	2
2.1.1 Aflatoxinas.....	3
2.1.2 Toxicidad de las aflatoxinas.....	4
2.1.3 Derivados menos tóxicos de las aflatoxinas	6
2.1.4 Presencia de aflatoxinas en los alimentos	7
2.2 Leche de vaca	8
2.2.1 β -lactoglobulina	9
2.2.2 α -lactoalbúmina	10
2.3 Presencia de aflatoxina M1 en la leche y sus derivados	12
2.3.1 Distribución de la AFM1 en los derivados de la leche	12
2.4 Legislación del contenido de AFM1 en la leche y sus derivados.....	13
2.4.1 Métodos de cuantificación de AFM1 en la leche y sus derivados.....	14
2.4.1.1 Muestreo aleatorio.....	15
2.4.1.2 Extracción de la AFM1 de la muestra	15
2.4.1.3 Análisis de la muestra.....	16
2.4.1.4 Parámetros de validación del método.....	17
2.5 Métodos para reducir el contenido de AFM1 en la leche y sus derivados.....	18
2.6 Interacción de la AFM1 con las proteínas de leche.....	19
2.7 Métodos espectroscópicos para evaluar la formación de complejos proteína-ligando	23
2.7.1 Espectroscopía de UV-VIS	23
2.7.2 Espectroscopía de fluorescencia	24



2.7.3	Dicroísmo circular	27
2.8	Modelación molecular en sistemas biológicos	28
2.8.1	Acoplamiento molecular	29
2.8.1.1	Algoritmos de búsqueda	30
2.8.1.2	Funciones de puntuación.....	33
2.8.2	Programas para el acoplamiento molecular	35
2.8.2.1	AutoDock.....	35
2.8.3	Antecedentes de acoplamiento molecular con aflatoxinas	36
2.9	Bibliografía	40
3	Justificación	48
4	Hipótesis.....	49
5	Objetivo general.....	49
6	Objetivos particulares	49
7	Análisis de la contaminación de AFM1 en leche y quesos producidos en México.....	50
7.1	Resumen	50
7.2	Introducción.....	51
7.3	Método de búsqueda de los artículos	55
7.3.1	Selección de artículos.....	55
7.4	Resultados	55
7.4.1	Métodos de detección y cuantificación.....	56
7.4.2	Presencia de AFM1 en leche producida en México	58
7.4.2.1	Presencia de AFM1 en leche cruda	59
7.4.2.2	Presencia de AFM1 en la leche industrializada.....	62
7.4.3	Presencia de AFM1 en quesos.....	64
7.4.4	Presencia de otros derivados hidroxilados de la AFB1 en Leche.....	68
7.4.5	Presencia de otros derivados hidroxilados de AFB1 en queso	70
7.4.6	Presencia de aflatoxinas en el alimento del ganado	71
7.5	Conclusiones y perspectivas	73
7.6	Bibliografía	74
8	Estudios espectroscópicos y modelamiento molecular de la formación del complejo aflatoxina M1- α -lactoalbúmina bovina.....	82
8.1	Resumen	82
8.2	Introducción.....	83



8.3	Materiales y Métodos.....	84
8.3.1	Materiales.....	84
8.3.2	Espectrofotometría de UV-VIS.....	85
8.3.3	Espectroscopía de fluorescencia.....	85
8.3.4	Dicroísmo circular.....	86
8.3.5	Acoplamiento molecular.....	86
8.4	Resultados.....	87
8.4.1	Espectrofotometría de UV-VIS.....	87
8.4.2	Espectroscopía de fluorescencia.....	88
8.4.2.1	Mediciones de la fluorescencia intrínseca.....	88
8.4.2.2	Mecanismo de disminución de fluorescencia.....	90
8.4.2.3	Determinación de los parámetros de unión.....	90
8.4.3	Naturaleza de la interacción.....	92
8.5	Dicroísmo circular.....	93
8.6	Acoplamiento molecular.....	94
8.6.1	Complejo formado en la región de la caja hidrofóbica.....	95
8.6.2	Complejo formado en la región del grupo aromático I.....	97
8.7	Conclusiones.....	98
8.8	Bibliografía.....	99
9	Evaluación de la interacción de la aflatoxina M1 con la β -lactoglobulina bovina a diferentes pH por acoplamiento molecular.....	105
9.1	Resumen.....	105
9.2	Introducción.....	106
9.3	Metodología.....	108
9.3.1	Obtención de estructuras cristalográficas.....	108
9.3.1.1	Comparación de las estructuras cristalográficas.....	108
9.3.2	Acoplamiento molecular.....	108
9.4	Resultados.....	109
9.4.1	Modelos estructurales de la β -LG.....	109
9.4.1.1	Comparación de los modelos estructurales.....	110
9.4.2	Acoplamiento molecular.....	113
9.4.2.1	Interacciones de la AFM1 en la región del Cáliz.....	113
9.4.2.2	Efecto del pH en la formación del complejo β -LG-AFM1 en la región del Sitio C.....	117



9.4.2.3	Interacciones de la AFM1 en la interfaz del dímero	120
9.5	Conclusiones	123
9.6	Bibliografía	124
10	Conclusiones generales	127
11	Perspectivas	129
12	Anexo I.....	130
12.1	Optimización geométrica de la AFM1	130
12.2	Mapas del potencial electrostático de AFM1.....	130
12.3	Selección y preparación de la estructura cristalográfica de la proteína.....	130
12.4	Comparación de cristales de α -lactoalbúmina.....	131
12.5	Bibliografía	134
13	Artículo publicado en revista científica	136



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2-1. Estructuras químicas de las principales aflatoxinas producidas naturalmente por los hongos micotoxigénicos del género <i>Aspergillus</i> . Las estructuras se obtuvieron de la base de datos PubChem.	4
Figura 2-2. Oxidación de la AFB1 por la enzima citocromo P450 (CYP). Las estructuras se obtuvieron de la base de datos del PubChem.....	5
Figura 2-3. Metabolitos menos tóxicos derivados de la AFB1. Las AFM1, AFQ1 y AFP1 son hidroxilados por la enzima citocromo P450 (CYP). El aflatoxicol (AFL) es producto de la reducción de la AFB1 por la NADPH reductasa.....	6
Figura 2-4. Estructuras secundarias de la β -LG: α -hélices (morado); hojas β plegadas (amarillo); hélices 3_{10} (azul); <i>random coil</i> o estructura irregular (blanco); asas (cyan). Principales sitios de unión para compuestos bioactivos: Cáliz y Sitio C.....	10
Figura 2-5. Representación del ensamble biológico de dímero de β -LG. Línea punteada roja indica la región de la interfaz del dímero.....	10
Figura 2-6. Estructuras secundarias de la α -LA: α -hélices (morado); hojas β plegadas (amarillo); Hélices 3_{10} (azul); <i>random coil</i> o estructura irregular (blanco); asas (cyan). (A) Codo de unión del ion calcio y puentes disulfuro. (B) Sitios de unión: Caja hidrofóbica y Grupo Aromático I.....	11
Figura 2-7. Esquema de la determinación de la afinidad de la AFM1 por la caseína por medio de una diálisis. Solución A: Sales, lactosa y caseínas. Solución B: Sales, lactosa y AFM1 (10 o 20 ng mL ⁻¹).	19
Figura 2-8. Concentración de AFM1 en el suero de leche. ● Distribución a partir de las proteínas de la leche. ○ Distribución a partir de las proteínas del suero de leche (Chavarría <i>et al.</i> , 2017).....	22
Figura 2-9. Esquema del proceso de emisión de fluorescencia: la proteína se representa con un círculo (azul en su estado basal y amarillo en el estado excitado), el ligando con un medio círculo verde. (A) Proceso de emisión de fluorescencia sin la presencia de un ligando; (B) disminución de la emisión de fluorescencia por la presencia de un ligando.	25
Figura 2-10. Espectros de dicroísmo circular de diferentes proteínas. (A) Mioglobina. (B) Lisozima de gallina. (C) Triofosfato isomerasa. (D) Quimotrisina (Berndt, 1996)	28
Figura 2-11. Esquema del fundamento del acoplamiento molecular que es predecir la forma de unión de un receptor y un ligando.....	30
Figura 2-12. Grados de libertad rotacional y traslacional que tiene el ligando sobre el receptor.	31
Figura 2-13. Ejemplo de delimitación del espacio de búsqueda de la mejor conformación ligando-receptor por medio de una <i>grid</i> tridimensional (rojo).....	31
Figura 2-14. Enfoque de búsqueda del complejo ligando-receptor por el método de complementariedad.....	32



Figura 2-15. Estructuras del complejo CYP3A4-AFB1, la enzima CYP3A4 y los residuos Leu210, Leu211 y Phe304 están representados acorde de los colores de los átomos (carbón en cian, oxígeno en rojo, nitrógeno en azul, hidrógeno en blanco y hierro en café), la AFB1 orientada de la forma epóxica (violeta) y la orientada en su forma hidroxilada (azul) (Bren *et al.*, 2014)..... 37

Figura 2-16. Diagramas en 2D de la interacción de la AFB1 con diferentes proteínas. (A) Proteína 1G0O. (B) Proteína 3JYA. (C) Proteína 3F88 (Wang *et al.*, 2017). 38

Figura 2-17. Representación del acoplamiento de la HSA (gris) con las conformaciones de la AFB1. (A) Búsqueda en toda la proteína Rank 1 (esferas amarillas) y en el sitio I y el Rank 2 (esferas cian). (B) interacción de los aminoácidos con la AFB1 en el Sitio I (Poór *et al.*, 2017)..... 39

Figura 7-1. Estructuras químicas de las principales aflatoxinas producidas por hongos. Las cuales fueron obtenidas de la base de datos de PubChem..... 51

Figura 7-2. Representación de la metabolización de la AFB1 por acción de la enzima citocromo P450 (CYP) a su derivado hidroxilado AFM1 en el hígado de la vaca. Las estructuras fueron obtenidas de la base de datos de PubChem. 52

Figura 7-3. Concentraciones de AFM1 en muestras de queso tipo oaxaca de producción artesanal distribuidos en la Ciudad de Veracruz. Línea roja indica el límite máximo establecido en la norma NOM-243-SSA1-2010. Datos de Hernández-Camarillo *et al.* (2016a). 65

Figura 7-4. Concentraciones de AFM1 en muestras de queso tipo oaxaca de producción industrial distribuidos en la Ciudad de México. Línea roja indica el límite máximo establecido en la norma NOM-243-SSA1-2010. Datos de Carvajal-Moreno *et al.* (2019). 66

Figura 7-5. Concentraciones de AFM1 en muestras de queso tipo panela de industrias queseras de diferentes regiones de México. Línea roja indica el límite máximo establecido en la norma NOM-243-SSA1-2010. Datos de Urbán *et al.* (2009)..... 67

Figura 7-6. Derivados de la AFB1 producidos en el hígado de las vacas. Estructuras obtenidas de la base de datos PubChem..... 68

Figura 7-7. Contenido de aflatoxinas y sus derivados hidroxilados en queso tipo oaxaca de producción industrial (Carvajal-Moreno *et al.*, 2019) y artesanal (Vargas-Ortiz *et al.*, 2017) distribuidos en la Ciudad de México y Veracruz, respectivamente. Línea roja indica el límite máximo de AFM1 establecido en la norma NOM-243-SSA1-2010 para leche. 71

Figura 8-1. Estructura química de la aflatoxina M1 obtenida de PubChem (CID 1558498). 84

Figura 8-2. (A) Espectros de absorción UV-VIS de α -LA libre a 1.40 μ M (línea negra); AFM1 libre (17.92 μ M) en BP (línea azul); punto de la titulación de α -LA (1.40 μ M) con AFM1 (17.92 μ M) (línea violeta) a 298 K. (B) Espectros de absorción UV-VIS de α -LA en 1.40 μ M (línea negra) titulada con diferentes concentraciones de AFM1 en el intervalo de 4.48 a 17.92 μ M (líneas de color) a 298 K. 88



Figura 8-3. (A) Espectros de fluorescencia de la α -LA 10 μ M (línea negra) titulada con diferentes concentraciones de AFM1 (35 a 100 μ M) a 298 K. (B) Espectros de fluorescencia de la α -LA 10 μ M (línea negra) titulada con diferentes concentraciones de AFM1 (35 a 100 μ M) a 298 K.	89
Figura 8-4. (A) Gráfico de Stern-Volmer: describe la disminución de la fluorescencia de la α -LA por la adición de AFM1 a 298 K. (B) Gráfico de la ecuación modificada de Stern-Volmer de la formación del complejo α -LA-AFM1 a 298 K.	91
Figura 8-5. Gráfico de van't Hoff para las constantes de unión (K_u) a 298, 303 y 308 K calculadas por extinción de fluorescencia de α -La por AFM1.....	93
Figura 8-6. Espectros de DC de la titulación de α -LA (línea negra) con diferentes concentraciones de AFM1 (líneas de colores) a 298 K.	94
Figura 8-7. Estructura terciaria de la α -LA. Estructuras secundarias: α -hélices (magenta): hélices 3_{10} (azul); hojas β (amarillo); asas (cyan) y <i>random coil</i> (café). Regiones hidrofóbicas: caja hidrofóbica (línea punteada verde) y grupo aromático I (línea punteada naranja).	95
Figura 8-8. Representaciones gráficas de las interacciones de la AFM1 con la α -LA en la región de la caja hidrofóbica. (A) Diagrama de Lig Plot de las interacciones hidrofóbicas (líneas de puntos blancas) de AFM1 con los aminoácidos de la caja hidrofóbica. (B) Imagen estereoscópica de los puentes de hidrógeno (líneas de puntos negros) formados con la AFM1 y los aminoácidos de la caja hidrofóbica.....	96
Figura 8-9. Representaciones gráficas de las interacciones de la AFM1 con la α -LA en la región del grupo aromático I. (A) Diagrama de Lig Plot de interacciones hidrofóbicas (líneas de puntos blancas) de AFM1 con los aminoácidos del grupo aromático I. (B) Imagen estereoscópica de los puentes de hidrógeno (líneas de puntos negros) formados con la AFM1 y los aminoácidos del grupo aromático I.....	98
Figura 9-1. Procesos del acoplamiento molecular. (A) Basado en la complementariedad de las moléculas. (B) Permitiendo la flexibilidad del ligando (Fan <i>et al.</i> , 2019).	106
Figura 9-2. Regiones de interacción de compuestos en la β -LG (A) Estructura cristalográfica de la β -LG a pH 6.5 (amarillo) donde se observa en la región del Cáliz el loop EF cerrado (circulo línea punteada roja) y el ácido glutámico protonado (Glu89); el cristal a pH 7.4 (cyan) con el loop EF abierto y con el Glu89 desprotonado. (B) Representación del dímero de la β -LG. Estructuras secundarias: α -hélices (morado); hojas β plegadas (amarillo); hélices 3_{10} (azul); <i>random coil</i> (blanco); asas (cyan).	107
Figura 9-3. Efecto del pH en la conformación del loop EF (ovalito línea roja) de la región del Cáliz de la β -LG. (A) Conformación cerrada con estructuras a pH 2.0 (gris) y 6.5 (amarillo). (B) Conformación abierta con estructuras a pH 7.4 (azul) y 8.2 (verde). Región del Sitio C delimitado por ovalito con línea punteada violeta.....	111
Figura 9-4. Modelos estructurales de la β -LG obtenidas a diferentes pH. Región del Cáliz indicado por línea punteada roja; Sitio C por línea punteada violeta. Distancia entre la	



Leu87-Leu39 (línea punteada amarilla); Ile71-Ser116 (línea punteada azul). (A) pH de 2.0. (B) pH de 6.5. (C) pH de 7.4. (D) de 8.2.....	112
Figura 9-5. Modelos estructurales de la β -LG a diferente pH. (A) Complejo formado fuera de la región del Cáliz con el modelo a pH 2.0. (B) Tipo de interacciones que contribuyen a la formación del complejo a pH 2.0. (C) Complejo formado cerca del LF que forma parte del Cáliz con el modelo a pH 6.5. (D) Tipo de interacciones que contribuyen a la formación del complejo a pH 6.5.....	114
Figura 9-6. Moldeos estructurales de la β -LG a diferente pH. (A) Complejo formado en la región del Cáliz con el cristal a pH 7.4. (B) Representación con superficie que muestra cómo se encuentra abierta la cavidad del Cáliz. (C) Complejo formado en la cavidad de la región del Cáliz del cristal a pH 8.2. (B) Representación con superficie que muestra cómo se une la AFM1 en la cavidad del Cáliz.....	116
Figura 9-7. Modelos estructurales de la β -LG a pH de 2.0 y 6.5. (A) Complejo formado en la cavidad hidrofóbica del Sitio C con el modelo a pH 2.0. (B) Tipo de interacciones que contribuyen a la formación del complejo a pH 2.0. (C) Complejo formado en la superficie del Sitio C con el modelo a pH 6.5. (D) Tipo de interacciones que contribuyen a la formación del complejo a pH 6.5.....	118
Figura 9-8. Modelos estructurales de la β -LG a pH de 7.4 y 8.2. (A) Complejo formado en la superficie del Sitio C con el modelo a pH 7.4. (B) Tipo de interacciones que contribuyen a la formación del complejo a pH 7.4. (C) Complejo formado en la superficie del Sitio C con el modelo a pH 8.2. (D) Tipo de interacciones que contribuyen a la formación del complejo a pH 8.2.....	120
Figura 9-9. Modelo estructural del dímero de la β -LG a pH de 6.5. (A) Complejo formado en la interfaz del dímero. (B) Tipo de interacciones que contribuyen a la formación del complejo a pH 6.5.....	121
Figura 9-10. Modelo estructural del dímero de la β -LG a pH de 7.4. (A) Complejo formado en la interfaz del dímero. (B) Tipo de interacciones que contribuyen a la formación del complejo a pH 7.4.....	122
Figura 11-1. Espectros DC UV lejanos de α -LA (línea negra); BP solución 5 mM a pH 6.5 (línea gris) y AFM1 (17.92 μ M) en BP (línea púrpura) a 298 K.....	132
Figura 11-2. Mapas de potencial electrostático de AFM1. Superficie de mayor densidad de electrones (rojo) (Isovalor = 0.001).	132
Figura 11-3. Comparación de las estructuras terciarias de los cristales de α -LA; cristal nativo (1F6R: naranja) y cristal recombinante (1HFZ: azul).....	133
Figura 11-4. Espectros de fluorescencia de α -La titulada con diferentes concentraciones de AFM1 (0-100 μ M) a dos temperaturas (A) 303 K y (B) 308 K. La longitud de onda de excitación fue de 280 nm.	133
Figura 11-5. (A) Gráfico de Stern-Volmer para la extinción de la fluorescencia de α -La por AFM1 a 303 y 308 K. (B) Gráfico de Stern-Volmer modificado para el complejo α -La-AFM1 a 303 y 308 K.....	134



ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 2-1. Hongos productores de micotoxinas y los productos alimenticios asociados. 2	2
Cuadro 2-2. Concentración de las proteínas presentes en la leche y el suero de leche (Chavarría <i>et al.</i> 2017).	8
Cuadro 2-3. Factores que influyen en la capacidad de metabolización de AFB1 en el hígado de las vacas.....	12
Cuadro 2-4. Límites permitidos de AFM1 en la leche y sus derivados en diferentes países.	14
Cuadro 2-5. Afinidad de la micotoxina por las proteínas de la leche (Chavarría <i>et al.</i> , 2017).	22
Cuadro 2-6. Afinidad de la micotoxina con las fracciones de la caseína y la mezcla de estas (Chavarría <i>et al.</i> , 2017).	23
Cuadro 2-7. Longitud de onda de excitación y emisión de fluorescencia, así como la eficiencia en la emisión de los aminoácidos aromáticos presentes en las proteínas.	25
Cuadro 7-1. Concentración máxima permitida de AFM1 en leche y queso en diferentes países.	53
Cuadro 7-2. Métodos analíticos y sus parámetros de validación empleados para detectar y cuantificar los niveles de AFM1 en leche y quesos producidos en México.	57
Cuadro 7-3. Contenido de AFM1 en leche cruda producida en diferentes regiones de México.	60
Cuadro 7-4. Contenido de AFM1 en las principales marcas de leche consumidas en México.	63
Cuadro 7-5. Contenido de AFB1 y AFL en leche industrializada producida en diferentes regiones de México. Datos de Carvajal <i>et al.</i> (2003b).	69
Cuadro 8-1. K_u , n y ΔG_u obtenidos de la interacción de la α -LA con diferentes compuestos obtenidos por espectroscopía de fluorescencia.	92
Cuadro 8-2. Cambios de las estructuras secundarias cuando se adicionan diferentes concentraciones de AFM1 a una solución de α -LA.	94
Cuadro 8-3. Valores de la ΔG_u obtenidos por acoplamiento molecular de la interacción de la α -La con diferentes compuestos.	97
Cuadro 9-1. Estructuras cristalográficas de la β -LG obtenidos a diferentes pH de cristalización mediante DRX.	109
Cuadro 9-2. Diferencias entre las estructuras cristalografías de la β -LG obtenidas a diferentes pH con base al RMSD-ca.	110



Cuadro 9-3. Longitud de la cavidad del Cáliz delimitada entre los residuos Leu87-Leu39 e Ile71-Ser116, así como el área superficial de la β -LG a los diferentes pH.	111
Cuadro 9-4. Parámetros de unión obtenidos de la interacción de la AFM1 con los modelos de la β -LG a un pH de 2.0 y 6.5 en la región del Cáliz.	115
Cuadro 9-5. Parámetros de unión obtenidos de la interacción de la AFM1 con los modelos de la β -LG a un pH de 7.4 y 8.2 en la región del Cáliz.	115
Cuadro 9-6. Parámetros de unión de diferentes compuestos con la β -LG a un pH de 7.4 en la región del Cáliz.	117
Cuadro 9-7. Parámetros de unión obtenidos de la interacción de la AFM1 con los cristales de la β -LG a un pH de 2.0 y 6.5 en la región del Sitio C.....	118
Cuadro 9-8. Parámetros de unión obtenidos de la interacción de la AFM1 con los modelos de la β -LG a un pH de 7.4 y 8.2 en la región del Sitio C.....	119
Cuadro 9-8. Parámetros de unión obtenidos de la interacción de la AFM1 con los dímeros de la β -LG a un pH de 6.5 y 7.4 en la región del Sitio C.....	123
Cuadro 11-1. Constante de extinción (K_{sv}), cantidad de la constante de velocidad de extinción (k_q), energía libre de unión (ΔG_b), constante de unión (K_b) y sitios de unión (n) obtenidos de la interacción de α -La con AFM1 a diferentes temperaturas por fluorescencia espectroscopía.	131



1 INTRODUCCIÓN

Las aflatoxinas (AF) son micotoxinas producidas por hongos filamentosos principalmente del género de *Aspergillus*. El consumo de alimentos contaminados con AF son un riesgo para la salud de las personas en todo el mundo, ya que han sido reconocidas como carcinógenos. Estas micotoxinas se encuentran en una gran variedad de alimentos como cereales y semillas, así como en productos de origen animal como la leche y sus derivados (Bryden, 2019; IARC, 2012; Iqbal *et al*, 2013).

La leche de vaca se encuentra dentro de los principales alimentos de la nutrición humana, debido a que aporta varios nutrientes como las proteínas (Figuroa Hernández *et al.*, 2013). Diversos estudios han evaluado la presencia de la aflatoxina M1 (AFM1) en la leche y sus derivados reportando que hay una alta incidencia de la micotoxina en estos productos en la leche y sus derivados (Iqbal *et al.*, 2015; Salari *et al.*, 2020). Asimismo, se han realizado investigaciones para la detoxificación de la leche reportando que los tratamientos térmicos como la pasteurización no causan una disminución significativa en la concentración de la AFM1 (Bakirci, 2001b; Deveci, 2007). Por otro lado, se ha observado que la fermentación de la leche con bacterias ácido lácticas disminuye el contenido de la micotoxina (Elsanhoty *et al.*, 2014; Ismail *et al.*, 2016).

Además, durante la elaboración de quesos se ha reportado que la AFM1 presenta una distribución variable entre la cuajada y el suero de leche, debido a que las proteínas de la leche tienen diferente afinidad por la micotoxina (Brackett & Marth, 1982; Chavarría *et al.*, 2017; López *et al.*, 2001; Manetta *et al.*, 2009; Motawee & McMahon, 2009). Sin embargo, no hay estudios hasta el momento que describan la forma en que interacciona la AFM1 con las proteínas de la leche.

Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar la forma de interacción de la AFM1 con las proteínas del suero de leche α -lactoalbúmina y β -lactoglobulina utilizando herramientas experimentales (métodos espectroscópicos) y computacionales (acoplamiento molecular). Con la finalidad de poder explicar la variabilidad en la concentración de la AFM1 en la cuajada y el suero de leche durante la elaboración de los quesos.

2 ANTECEDENTES

2.1 MICOTOXINAS

Los hongos son microorganismos ubicuos en la naturaleza y tienen la capacidad de crecer en cualquier materia orgánica. Se ha observado que ciertos hongos son capaces de producir metabolitos secundarios que aportan un beneficio a la salud humana, como los antibióticos. Además, algunos hongos son usados en la elaboración de alimentos, como queso, pan, vino entre otros. Sin embargo, ciertos hongos son micotoxigénicos, es decir, capaces de producir compuestos con efectos tóxicos en la salud humana, estos metabolitos se conocen con el nombre de micotoxinas (Bryden, 2019). Asimismo, se ha reportado que en las condiciones favorables de humedad y temperatura los hongos micotoxigénicos son capaces de crecer en diversos alimentos como cereales y semillas, así como en ciertos alimentos procesados. En el Cuadro 2-1 se presentan algunos ejemplos de hongos micotoxigénicos con sus micotoxinas asociadas y los alimentos en donde pueden ser encontrados. (Bhat, *et al.*, 2010; Bryden, 2019).

Cuadro 2-1. Hongos productores de micotoxinas y los productos alimenticios asociados.

Hongos micotoxigénicos	Micotoxinas	Alimentos
<i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus parasiticus</i>	Aflatoxinas	Nueces, maíz, frutos secos
<i>Aspergillus ochraceus</i> <i>Aspergillus carbonarius</i>	Ocratoxina A	Granos de cereal, café, uvas
<i>Penicillium citrinum</i> <i>Penicillium expansum</i>	Citrinina	Granos de cereal
<i>Penicillium verrucosum</i>	Ocratoxina A	Granos de cereal, café, uvas
<i>Fusarium culmorum</i> <i>Fusarium graminearum</i>	Zearalenona	Granos de cereal
<i>Fusarium verticillioides</i> <i>Fusarium proliferatum</i>	Fumonisina	Maíz

Fuente: Bryden, 2019

Las micotoxinas son compuestos químicos de baja masa molecular y son dañinos tanto para animales como para el humano aun a bajas concentraciones. La capacidad de producción por parte de los hongos micotoxigénicos es variable, y depende de diversos factores, algunos de ellos pueden ser la humedad, temperatura, daños físicos en el



alimento, concentración de dióxido de carbono y/u oxígeno, composición del sustrato, variedad de la planta, presencia de plagas y carga de esporas (Bryden, 2019).

Los hongos micotoxigénicos son de ocurrencia natural en una gran parte de los cultivos durante todo el ciclo de la cosecha y postcosecha, siendo una amenaza potencial para la seguridad de los alimentos. Asimismo, durante el almacenamiento y transporte de alimentos en condiciones de baja humedad, se ha reportado la presencia de esporas en forma inactiva, sin embargo, estas se pueden activar con pequeños cambios de humedad y temperatura en el sistema, existiendo un alto riesgo de que los hongos se desarrollen y sean capaces de producir micotoxinas (Iqbal *et al.*, 2013).

Durante la última década se han realizado diversas investigaciones sobre la presencia de micotoxinas en los alimentos, encontrando que en el 75% de las muestras analizadas se presentó alguna de las siguientes micotoxinas: aflatoxinas, ocratoxina A, zearalenona, deoxinivalenol y fumonisina. Estas micotoxinas han sido asociadas a un gran número de enfermedades, tanto agudas como crónicas, en el ser humano (Bennett & Moore, 2019; Bryden, 2019).

La exposición de las micotoxinas al ser humano puede ser al consumir alimentos elaborados a partir de cereales y plantas contaminadas con hongos micotoxigénicos, así como en el consumo de alimentos de origen animal como el huevo, la leche y carne derivados de animales que fueron alimentados con forrajes y cereales contaminados con micotoxinas. Además, puede ser mediante la inhalación de aire y polvo que contiene partículas de estas toxinas (Bryden 2019; IARC 2012; Vaz *et al.* 2020).

Por lo tanto, hay una necesidad de tener un control de la contaminación con micotoxinas en los alimentos, lo cual ha llevado a diversas investigaciones sobre la introducción de buenas prácticas en la cadena de producción, almacenamiento y distribución de los alimentos, sin embargo, estos compuestos tóxicos siguen siendo un problema para la salud humana. (Bennett & Moore, 2019). De las diferentes micotoxinas producidas por los hongos, las aflatoxinas se encuentran entre las más estudiadas y de mayor importancia, ya que se ha reportado que son carcinogénicas (IARC, 2012).

2.1.1 Aflatoxinas

Las aflatoxinas (AF) son un grupo de micotoxinas producidas por hongos del género *Aspergillus*, principalmente por las especies *A. flavus* y *A. parasiticus*. Se han identificado

hasta 18 diferentes tipos de AF. En la Figura 2-1 se presentan las estructuras químicas de las cuatro principales: B1 (AFB1) y B2 (AFB2) producidas por los hongos *A. flavus* y *A. parasiticus*; G1 (AFG1) y G2 (AFG2) producidas por *A. parasiticus* (Benkerroum, 2020; Iqbal *et al.*, 2013). La estructura básica de las AF es un anillo difurano unido a una cumarina. Además, se clasifican en dos grupos de acuerdo con su estructura química y color de emisión de fluorescencia; en el grupo 1 están las AF de la serie B debido al color de emisión de fluorescencia azul (*Blue* en inglés) con una estructura formada por difuro-cumaro-pentanona; mientras que el grupo 2 está formado por las AF de la serie G ya que su emisión de fluorescencia es color verde (*Green* en inglés) y la diferencia en su estructura con el grupo 1 es que tienen una lactona en lugar del anillo pentanona (Benkerroum, 2020; Iqbal *et al.*, 2013).

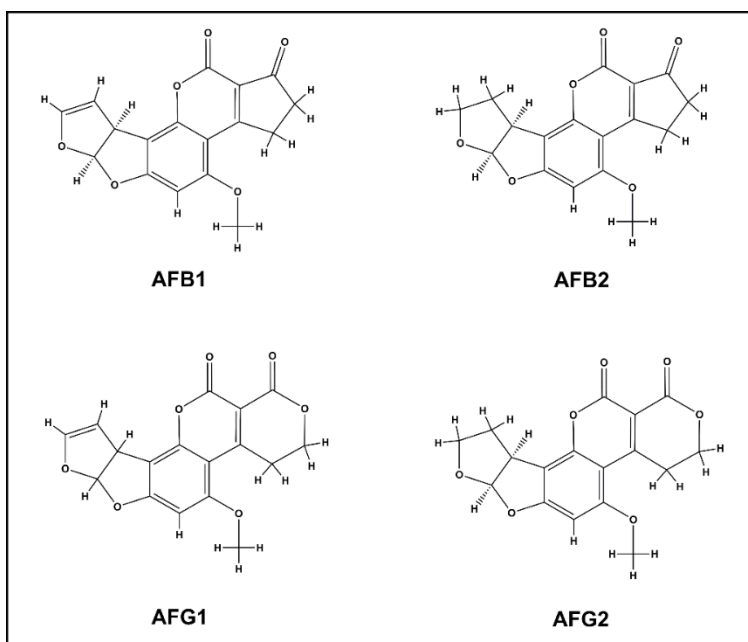


Figura 2-1. Estructuras químicas de las principales aflatoxinas producidas naturalmente por los hongos micotoxigénicos del género *Aspergillus*. Las estructuras se obtuvieron de la base de datos PubChem.

2.1.2 Toxicidad de las aflatoxinas

La principal forma de exposición de las AF para los seres humanos es mediante el consumo de cereales y semillas contaminados con las cuatro principales AF. Mediante una ingesta acumulada de AF se puede producir la aflatoxicosis, la cual puede ser aguda o crónica. Dentro de los efectos agudos se han descrito los síndromes de Kwashiorkor y de Reye, ambos afectan a niños y adolescentes, y se relacionan con una severa malnutrición,

encefalopatía y la degeneración de las vísceras. En aflatoxicosis crónica, las AF pueden reaccionar y modificar las cadenas de ADN, dando lugar a la formación de lesiones promutagénicas que provocan la activación de protooncogenes (genes que promueven el crecimiento y división celular) por lo que se pueden desarrollar células cancerígenas y la inactivación de genes supresores de tumores (Bennett & Moore, 2019; Iqbal *et al.*, 2013; Williams *et al.*, 2004).

Además, las AF son procarcinógenos, es decir, no son carcinogénicas *per se*, sino que primero deben transformarse en su derivado carcinogénico. Por ejemplo, una vez que la AFB1 es absorbida por el organismo y llega al hígado, por acción de alguna de las enzimas del grupo citocromo P450 (CYP) es oxidada en el doble enlace entre los carbonos 8 y 9 del anillo difurano para producir el metabolito carcinogénico AFB1-exo-8,9-epóxido, como se observa en la Figura 2-2. Este derivado es capaz de interactuar con las cadenas de ADN mediante un ataque electrofílico sobre los residuos de guanina, lo que conduce a la mutagénesis (Smith & Groopman, 2018).

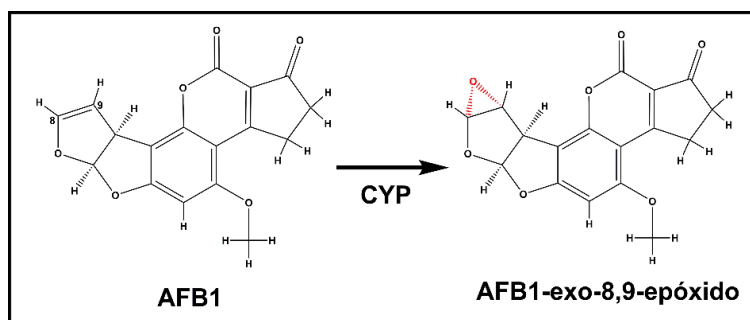


Figura 2-2. Oxidación de la AFB1 por la enzima citocromo P450 (CYP). Las estructuras se obtuvieron de la base de datos del PubChem.

Se ha reportado que las cuatro AF tiene diferentes niveles de toxicidad. Como se puede observar el Figura 2-1, las AFB2 y AFG2 presentan una saturación del anillo difurano por lo que es menos probable que sufran una oxidación, por lo cual son menos tóxicas en comparación de las AFB1 y AFG1. Asimismo, el potencial carcinogénico de las AF se determina por la capacidad de interactuar con las cadenas de ADN. Las AF de la serie G tienen una menor reactividad con el ADN debido a la presencia del anillo de lactona que les confiere una conformación plana (Smith & Groopman, 2018). Por lo tanto, la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (IARC por sus siglas en inglés) ha identificado a todas las AF como carcinogénicos del grupo 1, es decir que está comprobado que pueden producir cáncer al humano (IARC, 2012).

2.1.3 Derivados menos tóxicos de las aflatoxinas

La enzima CYP además de oxidar a las AF también puede catalizar una hidroxilación generando metabolitos menos tóxicos. Como se observa en la Figura 2-3, los metabolitos hidroxilados de la AFB1 son las AFQ1, AFM1, AFP1 y el aflatoxicol (AFL). La CYP presenta un mayor rendimiento de producción de los metabolitos hidroxilados en comparación con el derivado carcinogénico. La formación de los metabolitos AFQ1 y AFM1 es 8 y 5 veces mayor en relación con la formación del epóxido, respectivamente. Asimismo, la AFB1 puede ser sustrato de la NADPH reductasa formando al AFL.

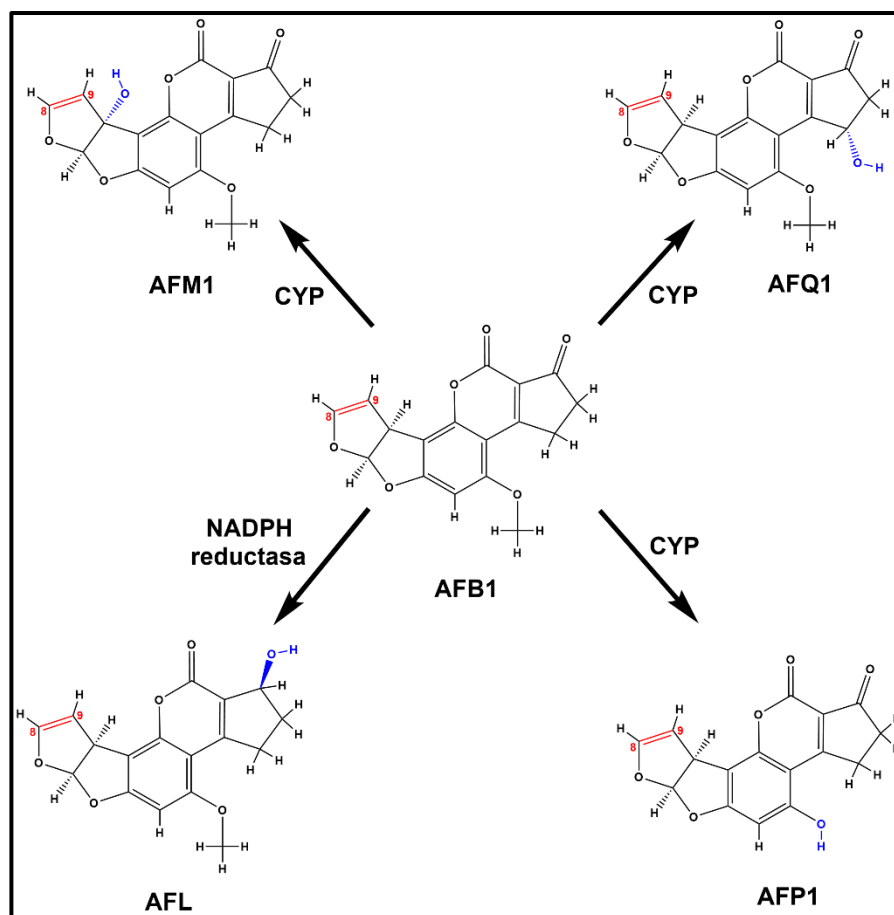


Figura 2-3. Metabolitos menos tóxicos derivados de la AFB1. Las AFM1, AFQ1 y AFP1 son hidroxilados por la enzima citocromo P450 (CYP). El aflatoxicol (AFL) es producto de la reducción de la AFB1 por la NADPH reductasa.

Además, como puede verse en la Figura 2-3 todos los metabolitos hidroxilados mantienen el doble enlace en los carbonos 8 y 9 del anillo difurano, por lo que aún conservan el potencial de ser oxidados por la CYP para convertirse en su forma



carcinogénica (Karabulut *et al.*, 2014; Murcia & Diaz, 2020; Smith & Groopman, 2018). No obstante, se ha reportado que hay una menor probabilidad de que ocurra la oxidación para estos metabolitos, de hecho la IARC reportó que la AFM1, AFQ1 y AFP1 son 10 veces menos potentes que la AFB1 (IARC, 2002; Smith & Groopman, 2018). Con la excepción del AFL que mantiene entre el 20 y 50% del potencial para ser oxidado como la AFB1 (Smith & Groopman, 2018).

2.1.4 Presencia de aflatoxinas en los alimentos

Desde la perspectiva global de la inocuidad de los alimentos y la seguridad alimentaria, la contaminación de los alimentos por AF ha ganado mucha atención como uno de los principales factores de riesgos para la salud de los seres humanos y los animales. Además, como ya se ha mencionado hay diferentes formas de exponerse a las micotoxinas, siendo la ingesta una de las principales, la cual puede ser de forma directa e indirecta.

La exposición directa a las AF es debido a que los hongos micotoxigénicos son capaces de crecer en una amplia gama de productos agrícolas importantes para el consumo humano, como los cereales (maíz, sorgo, arroz, trigo etc.), especias (chiles, pimienta negra, cilantro, cúrcuma, jengibre, etc.), semillas oleaginosas (maní, soya, semillas de girasol y algodón, etc.), nueces de árbol (almendra, pistacho, nuez, coco, etc.) por lo que hay una gran probabilidad de que produzcan las micotoxinas en la superficie de estos alimentos. Además, hay ciertos alimentos procesados en los que se tienen las condiciones idóneas para el crecimiento de los hongos, como en los quesos madurados con microorganismos, en donde hay una probabilidad que haya alguna contaminación cruzada con algún hongo micotoxigénico con una alta probabilidad de producir las micotoxinas (Prandini *et al.*, 2009).

Por otro lado, los hongos micotoxigénicos también se encuentran en los forrajes y alimentos balanceados utilizados para alimentar a los animales, por lo que la exposición al ser humano puede ser de forma indirecta, es decir, al consumir carne o productos derivados de animales que consumieron alimento contaminado con AF (Bhat *et al.*, 2010; Bryden, 2019). Por ejemplo, las vacas al consumir forraje contaminado con AFB1, la micotoxina es metabolizada en el hígado por acción de la enzima CYP transformándola en su derivado hidroxilado AFM1 (Figura 2-3), la cual puede ser excretada en la leche o la orina (Benkerroum, 2020; Gonçalves *et al.*, 2018; Shuib *et al.*, 2017).



2.2 LECHE DE VACA

La leche de vaca es un alimento básico en la dieta humana, ya que es rica en una variedad de nutrientes esenciales. Contiene aproximadamente 5% de lactosa, 3.2% de proteínas, 4% de lípidos y 0.7% de sales minerales. En México es un alimento altamente consumido, de acuerdo con el reporte del panorama agroalimentario: el consumo nacional aparente de leche de vaca fue de 15,288 millones de litros en el 2018. Además, su consumo no solo es en su forma líquida, sino que hay una gran variedad de productos derivados de la leche como quesos, mantequilla, crema, yogurt entre otros (FIRA, 2019).

De acuerdo con la Cámara Nacional de Industriales de la Leche (CANILEC) en el 2018 hubo una producción de 12,008 millones de litros de leche de vaca en México. Asimismo, se reportaron 733, 201, 418 y 31 millones de toneladas de yogurt, crema, queso y mantequilla, respectivamente, producidos en el 2018. Cabe señalar que en esta estadística se incluyen todas las variedades de yogures, quesos y cremas que hay en el mercado (CANILEC, 2019).

Por otro lado, las proteínas de la leche tienen una importancia tecnológica debido a que son probablemente el sistema mejor caracterizado de proteína alimentaria. En el Cuadro 2-2 se presenta la concentración de las proteínas en la leche y en el suero de leche (Chavarría *et al.*, 2017; Fox, 2009). Además, son una fuente de diversos péptidos bioactivos que presentan diferentes actividades biológicas como inmunoestimulantes, antibacterianas, antihipertensivas entre otras (Figuroa Hernández *et al.*, 2013; O’Riordan *et al.*, 2014; Steijns, 2001).

Cuadro 2-2. Concentración de las proteínas presentes en la leche y el suero de leche (Chavarría *et al.* 2017).

Proteínas	Leche entera (%)	Suero de leche (%)
Caseínas	80	4
β -lactoglobulina	13	65
α -lactoalbúmina	4.6	23
Seroalbúmina	1.2	6
Lactoferrina	0.4	2



Adicionalmente, son consideradas como vehículos naturales de compuestos bioactivos. Estos compuestos pueden unirse a las proteínas por diferentes mecanismos como las interacciones hidrofóbicas, atracciones de van der Waals, formaciones de puentes de hidrógeno entre otras. Asimismo, las proteínas globulares del suero de leche son las más estudiadas en la interacción con micronutrientes debido a que presentan cavidades hidrofóbicas (Chavarría *et al.*, 2017; Considine & Flanagan, 2009; Livney, 2010).

2.2.1 β -lactoglobulina

Es la segunda proteína de mayor concentración en la leche (13%) y la principal en el suero de leche (65%) (Cuadro 2-2). La estructura primaria de la β -lactoglobulina (β -LG) está compuesta por 162 aminoácidos (aa) y tiene una masa molecular de 18.4 kDa. Su composición principal de estructuras secundarias es de nueve hojas β plegadas antiparalelas y una α -hélice (Figura 2-4). Su conformación tridimensional es de forma globular estabilizada por dos puentes disulfuro. En la leche de vaca se tienen dos variantes la A y B debido a dos mutaciones presentes en la secuencia de aa. En la variante A el ácido aspártico de la posición 64 cambia a glicina, mientras que en la variante B en el sitio 118 se tiene una valina en lugar de una alanina. Su ensamble biológico es en forma de dímero entre los pH de 2.5 a 7.5 (Xiang & Melton, 2018).

En la Figura 2-4 se pueden ver los dos sitios unión más reportados para ácidos grasos y compuestos polifenólicos, el cáliz y sitio C. La región del cáliz presenta una forma de cavidad constituida por ocho hojas β plegadas antiparalelas. Además, el sitio C está localizado cerca del extremo carbonilo terminal (C-Terminal). Asimismo, se ha reportado la interacción de compuestos como el resveratrol, colecalciferol (vitamina D₃) y la lactosa en el sitio C (Domínguez-Ramírez *et al.*, 2013; Oancea *et al.*, 2018; Rovoli *et al.*, 2018; Xiang & Melton, 2018).

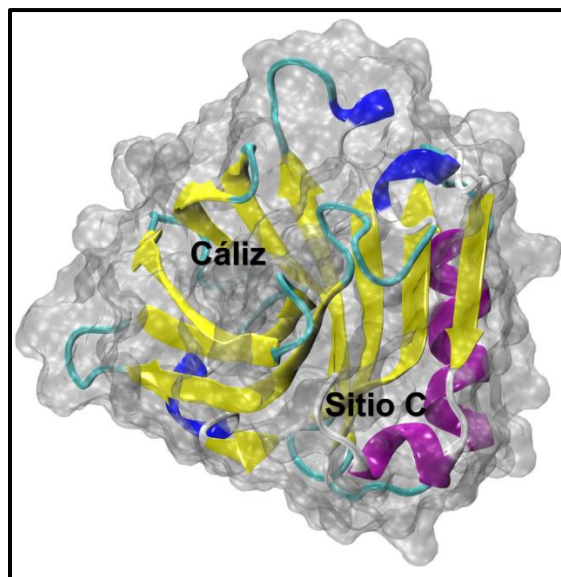


Figura 2-4. Estructuras secundarias de la β -LG: α -hélices (morado); hojas β plegadas (amarillo); hélices 3_{10} (azul); *random coil* o estructura irregular (blanco); asas (cyan). Principales sitios de unión para compuestos bioactivos: Cáliz y Sitio C.

Además, como el ensamblaje biológico de la β -LG es en forma de dímero, se ha reportado que hay interacción en la interfaz del dímero (Figura 2-5) de compuestos como la vitamina D_3 y la lactosa (Domínguez-Ramírez *et al.*, 2013).

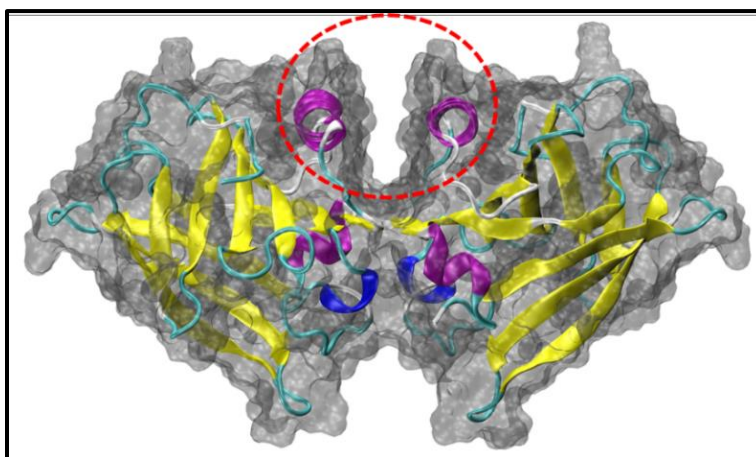


Figura 2-5. Representación del ensamblaje biológico de dímero de β -LG. Línea punteada roja indica la región de la interfaz del dímero.

2.2.2 α -lactoalbúmina

La α -lactoalbúmina (α -LA) representa el 23% de las proteínas presentes en suero de leche, se expresa exclusivamente en la glándula mamaria durante la lactancia, y está asociada en la regulación de la síntesis de lactosa. Es una metaloproteína globular con una

masa molecular de 14.2 kDa. Su estructura primaria está constituida por 123 aa siendo homóloga con la lisozima tipo-C. En su estructura secundaria presenta un 34% de α -hélice y 16% de hojas β plegadas lo que le confiere una gran flexibilidad (Chrysina *et al.*, 2000; Pike *et al.*, 1996).

En la Figura 2-6A se puede ver que tiene un forma compactada de estructura helicoidal con una zona interior hidrófoba la cual está estabilizada por la presencia de un ión de calcio unido a su estructura en el llamado codo de unión formado por los aa del 79 al 88 y con cuatro puentes de disulfuro (Chrysina *et al.*, 2000; Patrick *et al.*, 2009; Pike *et al.*, 1996). Además, como se observa en la Figura 2-6B tiene dos regiones hidrofóbicas conocidas como caja hidrofóbica y grupo aromático I.

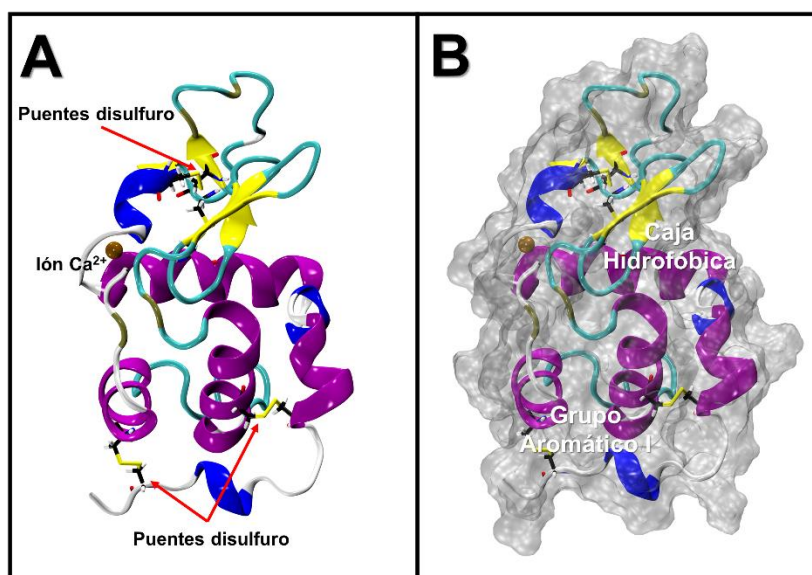


Figura 2-6. Estructuras secundarias de la α -LA: α -hélices (morado); hojas β plegadas (amarillo); Hélices 3_{10} (azul); *random coil* o estructura irregular (blanco); asas (cyan). **(A)** Codo de unión del ion calcio y puentes disulfuro. **(B)** Sitios de unión: Caja hidrofóbica y Grupo Aromático I.

También, se ha reportado que debido a sus dos regiones hidrofóbicas la α -LA tiene la capacidad de transportar compuestos bioactivos. Algunos de los compuestos que presentan afinidad por la proteína son el retinol (vitamina A), kaempferol, genisteína, vitamina D₃, curcumina, trans-resveratrol. (Considine & Flanagan, 2009; Delavari *et al.*, 2015; Mohammadi & Moeeni, 2015b, 2015a).



2.3 PRESENCIA DE AFLATOXINA M1 EN LA LECHE Y SUS DERIVADOS

Se ha reportado que aproximadamente entre el 0.3 y 6.2% del total de la AFB1 ingerida por las vacas es metabolizada en AFM1, sin embargo, esto puede variar entre los animales dependiendo de varios factores que se presentan en el Cuadro 2-3 (EFSA, 2004; Shuib *et al.*, 2017; Van Eijkeren *et al.*, 2006). Asimismo, Van Eijkeren *et al.* (2006) reportaron que en las vacas de alta producción de leche (mayor a 40 litros por día) se metaboliza el 6.2%. Además, observaron que existe una relación lineal entre la concentración de AFB1 en el alimento de la vaca y la cantidad de AFM1 presente en la leche.

Cuadro 2-3. Factores que influyen en la capacidad de metabolización de AFB1 en el hígado de las vacas.

Las especies animales	La salud de los animales y las ubres
La variabilidad de la lactancia	El nivel de contaminación del alimento ingerido
El proceso de ordeño	La ubicación geográfica y la estación del año
La capacidad de producción de leche	Capacidad individual de biotransformación

En las últimas décadas se han realizado diversos estudios para determinar la presencia de AFM1 en la leche, observando que hay una alta incidencia de esta micotoxina. En la revisión bibliográfica realizada por Salari *et al.* (2020) analizaron 122 artículos publicados entre enero de 1988 y febrero de 2020, observando que de 18921 muestras analizadas que incluían leche cruda, pasteurizada y ultra pasteurizada en el 79.1% se determinó la presencia de AFM1. Con un resultado similar está el trabajo de Womack *et al.* (2016) entre los años 2010 al 2015, donde reportan que el 75% de un total de 7841 muestras analizadas resultaron positivas, donde el 26% están por encima de los 0.05 $\mu\text{g AFM1 kg}^{-1}$.

2.3.1 Distribución de la AFM1 en los derivados de la leche

Se han realizado diversas investigaciones sobre la distribución de la AFM1 en los derivados de la leche. A pesar de que la AFM1 es soluble en la fase acuosa de leche se ha reportado su presencia en productos elaborados a partir de la fase lipídica de la leche como la mantequilla, crema y helado (Ismail *et al.*, 2016; Monti). Asimismo, se ha observado que la distribución de la AFM1 es mayor en la crema, seguido de la mantequilla (Monti *et al.*,



2009). Finalmente, en el trabajo realizado por Tadesse *et al.* (2020) evaluaron la distribución de la AFM1 en yogurt, queso y mantequilla elaborados a partir de leche contaminada. Reportando que la distribución de AFM1 se encontraba en mayor concentración en el queso, seguido del yogurt y la mantequilla.

Además, durante la elaboración de quesos se ha observado que no hay una disminución de la concentración de la AFM1, pero si hay una distribución variable de la micotoxina entre la cuajada y el suero de leche. Dentro de los primeros estudios realizados sobre el destino de la AFM1 durante la elaboración de queso, en el trabajo de Brackett & Marth (1982) reportaron que la micotoxina se unió a las caseínas. Esto coincide con lo reportado por Manetta *et al.* (2009) y Motawee & McMahon (2009) donde observaron que la mayor concentración de AFM1 durante la elaboración de queso es en la cuajada, es donde se concentran las caseínas. Sin embargo, otros autores han sugerido que la mayor concentración de la micotoxina se encuentra en el suero de leche (Chavarría *et al.*, 2017; López *et al.*, 2001).

Campagnollo *et al.* (2016) sugieren que los principales factores que determinan la variabilidad en la distribución de la AFM1 durante la elaboración de quesos son: el origen de la leche, el proceso de producción y el tipo de queso. Asimismo, Chavarría *et al.* (2017) mencionan que dependiendo el tipo de queso a elaborar, los procesos de producción son distintos. Pudiendo ser distinto el tipo de cuajado, el tiempo de prensado para eliminar el suero, la concentración de sal, el pH final y la cantidad de agua eliminada durante el procesamiento entre otros. La combinación de estos factores puede alterar la estabilidad de la unión de las proteínas de la leche con la AFM1.

2.4 LEGISLACIÓN DEL CONTENIDO DE AFM1 EN LA LECHE Y SUS DERIVADOS

En México, la Secretaría de Salud en la norma NOM-243-SSA1-2010 estableció que la concentración máxima permitida en la leche es de $0.5 \mu\text{g AFM1 kg}^{-1}$. Asimismo, como se puede ver en el Cuadro 2-4 en otros países también tienen limitaciones sobre el contenido de la micotoxina en la leche, observando que en algunos de ellos incluyen ciertos derivados de la leche en sus legislaciones. Cabe resaltar que en la norma mexicana no se establece un límite en la concentración de AFM1 en algún derivado de la leche (Bhat *et al.*, 2010; Campagnollo *et al.*, 2016; Iqbal *et al.*, 2015; Norma Oficial Mexicana, 2010).



Cuadro 2-4. Límites permitidos de AFM1 en la leche y sus derivados en diferentes países.

País	Leche ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Derivados de leche ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
México ¹	0.5	Sin limitación
Estados Unidos ²	0.5	0.5
Honduras ²	0.05	0.25 (queso)
Argentina ²	0.05	0.5
Australia ²	0.05 0.01 (leche infantil pasteurizada)	0.02 (mantequilla) 0.25 (queso) 0.4 (leche en polvo)
Egipto ²	0	0
Nigeria ²	1	Sin limitación

Fuentes: ¹.-NOM-243-SSA1-2010; ².-Iqbal *et al.* (2013)

Para el cumplimiento de estas legislaciones y garantizar que los alimentos sean seguros para el consumo humano, es fundamental tener métodos adecuados para la detección y cuantificación de la AFM1 en la leche y sus derivados.

2.4.1 Métodos de cuantificación de AFM1 en la leche y sus derivados

Como se presentó en el Cuadro 2-4 las concentraciones de AFM1 permitidas por las legislaciones de la mayoría de los países están por debajo de $1 \mu\text{g AFM1 kg}^{-1}$. Por lo que uno de los principales retos para los investigadores es contar con métodos analíticos que tengan sensibilidad y exactitud en la medición de concentraciones bajas de la micotoxina. Por lo tanto, la elección del método es uno de los pasos más importantes. Si solo se desea detectar la presencia de AFM1 en la muestra, un método cualitativo puede ser el más adecuado. Sin embargo, si lo que se desea es medir con exactitud la concentración de la micotoxina se debe emplear un método cuantitativo (Molognoni *et al.*, 2019; Vaz *et al.*, 2020).

Usualmente, cualquier método analítico requiere de varios pasos para tener una cuantificación y/o detección adecuada los cuales se enlistan a continuación (Vaz *et al.*, 2020):



1. Muestreo aleatorio.
2. Extracción de la AFM1 de la muestra.
3. Análisis de la muestra.
4. Parámetros de validación del método

2.4.1.1 Muestreo aleatorio

Quizá este es el paso más importante, ya que con un buen muestreo se puede asegurar una adecuada detección y/o cuantificación de la AFM1 en la leche o sus derivados. Al contar con normativas que proporcionen las especificaciones adecuadas de como tomar la muestra, es decir, indicaciones del tamaño (volumen o peso) y número de muestras que se deben recolectar para así tener un muestreo representativo del lote entero. Por ejemplo, en el Reglamento de la Comisión Europea, para la cuantificación de AFM1 en leche, se establece que se deben recolectar muestras aleatorias de 100 mL para obtener una muestra global de un litro (Vaz *et al.*, 2020).

2.4.1.2 Extracción de la AFM1 de la muestra

Es imprescindible realizar una extracción adecuada de la AFM1 de la muestra para así asegurar la cuantificación de concentraciones bajas. En muchos casos es necesario realizar un pretratamiento donde se puedan remover todas las impurezas y agentes que puedan interferir durante la detección y/o cuantificación. Para muestras de leche, un proceso de centrifugación y filtración puede ser suficiente para la detección de la micotoxina. Sin embargo, si se desea cuantificar la concentración es necesario tener un método donde se asegure que la AFM1 no esté asociada a algún componente de la leche como las proteínas. Por otro lado, en el caso de muestras sólidas como el queso, es necesario realizar una molienda y mezcla de la muestra para asegurar una distribución homogénea de la micotoxina (Vaz *et al.*, 2020; Zhang & Banerjee, 2020).

Una vez que se realizó el pretratamiento, se procede a extraer la AFM1 de la matriz del alimento y transferirla a un solvente orgánico para su detección y/o cuantificación. Para este proceso se pueden utilizar alguna de las siguientes columnas: Extracción de Fase Sólida, Extracción Líquido-Líquido y/o de Inmunoafinidad. La elección del solvente y la columna es con base a un conocimiento previo de las propiedades fisicoquímicas de la micotoxina como su polaridad, solubilidad, termoestabilidad entre otros (Vaz *et al.*, 2020).



2.4.1.3 Análisis de la muestra

Los métodos más utilizados para la detección y/o cuantificación de las AF son la cromatografía de capa fina (CCF), la cromatografía líquida de alta eficacia con detector de fluorescencia (HPLC-FD por sus siglas en inglés) y el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA por sus siglas en inglés).

La CCF es un método de análisis estándar empleado para la purificación e identificación de AFM1, ya que es un método rápido, simple y económico. Sin embargo, con este método no se puede determinar la concentración de la micotoxina (Vaz *et al.*, 2020; Zhang & Banerjee, 2020).

El HPLC-FD es un método muy preciso, el cual requiere que la solución que contiene a la AFM1 no contenga compuestos adicionales que puedan interferir en la medición, es decir, se requiere el mayor grado de pureza posible. Esto debido a que la solución con la micotoxina debe pasar a través de una columna de separación antes de entrar al detector del equipo para realizar la cuantificación. Así cuando se tiene una muestra que contenga varias AF al pasar la solución a través de la columna se podrá determinar y cuantificar las diferentes AF. Sin embargo, debido al grado de pureza y el empleo de columnas y detectores especializados, este método es costoso. Además, el tiempo para el análisis de una muestra puede ser muy largo (Kos *et al.*, 2016; Vaz *et al.*, 2020; Womack *et al.*, 2016).

El método de ELISA se basa en la afinidad de la AFM1 hacia un receptor que normalmente es una enzima que está anclada a un soporte. El fundamento de este método es que la AFM1 competirá con un anticuerpo marcado (indicador de color) para unirse a la enzima. Los resultados se determinan con base al color presente en la solución después de un periodo de incubación y algunos lavados para eliminar los residuos que no tuvieron interacción. Por lo tanto, la relación de la concentración de la micotoxina es indirectamente proporcional a la intensidad de color en la solución. Sin embargo, en el caso de que hubiera algún otro compuesto que tenga afinidad hacia la enzima, es muy probable que se obtengan falsos positivos. Asimismo, si hubiera más de una aflatoxina, con este método solo se determinaría la concentración total, pero no se podrá definir cuáles son los tipos de aflatoxinas presentes en la solución. Por lo que algunos autores recomiendan que se realice una confirmación por HPLC-FD (Kos *et al.*, 2016; Vaz *et al.*, 2020; Womack *et al.*, 2016).



2.4.1.4 Parámetros de validación del método

La validación de un método analítico se establece mediante estudios de laboratorio, para asegurar que su desempeño cumpla con los requisitos para aplicaciones analíticas previstas. Es indispensable para garantizar que los resultados sean reproducibles y confiables aun cuando durante el análisis se llegue a cambiar de operador del equipo en el mismo laboratorio o se use equipo de otro laboratorio (Bhardwaj *et al.*, 2015).

El uso de equipos que funcionen correctamente y que estén calibrados es fundamental para el proceso de validación. Los métodos analíticos siempre deben validarse o revalidarse cuando se llegan a cambiar las condiciones del método en el equipo. La especificidad, linealidad, rango, precisión (repetibilidad y reproducibilidad), exactitud (recuperación), el límite de detección (LDD) y el límite de cuantificación (LDC) son algunos de los parámetros usualmente recomendados en las metodologías analíticas de las diferentes organizaciones internacionales como la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA por sus siglas en inglés), la Asociación Oficial de Químicos Agrícolas (AOAC por sus siglas en inglés) entre otros (Bhardwaj *et al.*, 2015; Shrivastava & Gupta, 2011). En particular para la cuantificación de la AFM1 con métodos analíticos, se deben utilizar soluciones estándar con una concentración de la micotoxina bien definida. Estos estándares son empleados para calcular los LDD y el LDC entre otros.

El LDD se define como la cantidad o concentración mínima de AFM1 que puede ser detectada con un alto grado de fiabilidad por un método analítico determinado, es decir, es la señal de la mínima concentración obtenida a partir del análisis de una muestra que contiene la micotoxina que seríamos capaces de discriminar de la señal obtenida a partir de la medida de un blanco (muestra sin AFM1). Por otro lado, el LDC es la concentración más baja de la micotoxina que puede calcularse con exactitud y precisión. Al tener estos límites se puede determinar el coeficiente de correlación (R^2) a partir de diferentes concentraciones obtenidas del estándar dentro de un intervalo delimitado por el LDC y la máxima concentración detectable por el equipo del estándar (Bhardwaj *et al.*, 2015; Molognoni *et al.*, 2019; Shrivastava & Gupta, 2011).



2.5 MÉTODOS PARA REDUCIR EL CONTENIDO DE AFM1 EN LA LECHE Y SUS DERIVADOS

Las técnicas para disminuir la concentración de AF en los alimentos han abordado desde prevenir el crecimiento de los hongos micotoxigénicos en el alimento durante los procesos de cosecha y postcosecha incluidos el almacenamiento y transporte. Sin embargo, esto solo aplica para cultivos como los cereales, semillas, leguminosas entre otros o ciertos alimentos procesados. Otra alternativa es el empleo de tratamientos físicos, químicos y/o biológicos. En una situación ideal, estos tratamientos deberían destruir o inactivar la micotoxina, así como no producir subproductos que sean tóxicos, además de preservar el valor nutritivo del alimento. Además, estos deben ser confiables, económicos y cumplir con criterios determinados por organizaciones internacionales (Iqbal *et al.*, 2013).

Se han realizado estudios sobre la estabilidad de la AFM1 en la leche después de un tratamiento térmico. Deveci (2007) observó que el proceso de pasteurización a 72°C por 2 minutos provocó una disminución del 12.4 y 9.1% del contenido de AFM1 en dos muestras de leche contaminada con concentraciones de 1.5 y 3.5 µg AFM1 L⁻¹, respectivamente. Asimismo, Bakirci (2001) obtuvo una disminución del 7.62% de la AFM1 cuando pasteurizó la leche contaminada. Sin embargo, mencionó que el nivel de reducción no fue significativo, concluyendo que este tratamiento térmico no es efectivo.

También se ha observado que durante la producción de yogurt por medio de una fermentación con bacterias ácido-lácticas (BAL) la concentración de AFM1 disminuye. Se ha descrito que esta reducción es debido al pH bajo y la presencia de ácidos orgánicos. También se ha descrito que la AFM1 se une a la pared celular de las BAL lo que provoca la detoxificación del yogurt (Ismail *et al.*, 2016). En el trabajo realizado por Elsanhoty *et al.* (2014), reportaron una reducción del 87.8% del contenido de AFM1 al fermentar leche contaminada con *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* y *Lactobacillus plantarum* por 24 horas.

Por otro lado, en el trabajo realizado por Deveci (2007) donde producen queso blanco madurado en escabeche a partir de leche contaminada con AFM1, obtuvieron una disminución de 2.9% del contenido de la micotoxina después de 3 meses de maduración del queso en salmuera. Asimismo, Chavarría *et al.* (2017) observaron una correlación inversa en el nivel de AFM1 y la concentración de las BAL durante la maduración de queso blanco con BAL por 28 días.

2.6 INTERACCIÓN DE LA AFM1 CON LAS PROTEÍNAS DE LECHE

De los primeros estudios realizados para evaluar la interacción de las proteínas de la leche con la AFM1 fue el de Brackett & Marth (1982), donde demostraron que la AFM1 se unió a las caseína mediante el uso de una diálisis de equilibrio. En su estudio primero realizaron la separación de las caseínas (CN) de leche libre de AFM1 mediante ultrafiltración. El pellet de CN se resuspendió en una solución que contenía solamente sales y lactosa (Solución A). Adicionalmente a dos soluciones de sales y lactosa se les adicionó dos concentraciones de AFM1 (Soluciones B). Las dos soluciones A y B se colocaron en una cámara para diálisis como se muestra en la Figura 2-7, el proceso de diálisis se llevó a cabo a 7 °C durante 24 horas.

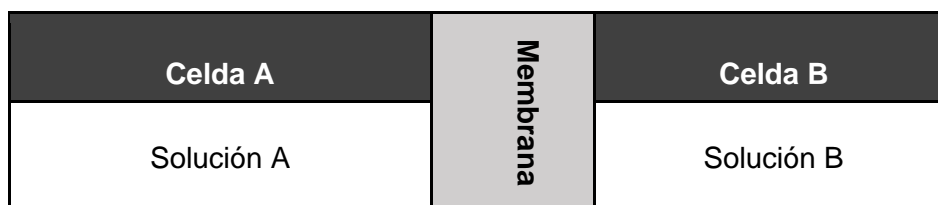


Figura 2-7. Esquema de la determinación de la afinidad de la AFM1 por la caseína por medio de una diálisis. Solución A: Sales, lactosa y caseínas. Solución B: Sales, lactosa y AFM1 (10 o 20 ng mL⁻¹).

Después de la diálisis observaron que la AFM1 había migrado hacia la celda A, ya que en los resultados encontraron 2.5 y 2.9 veces más micotoxina en la celda A en relación de la celda B que contenía las concentraciones iniciales de 10 y 20 ng AFM1 mL⁻¹, respectivamente.

Adicionalmente evaluaron el uso de una proteasa no específica para comprobar si esta provoca la separación de la micotoxina de las proteínas de la leche. Realizaron una digestión enzimática adicionando Pronasa E a leche contaminada con AFM1. La digestión se llevó a cabo por 48 horas a 20 °C. Al final de la digestión, observaron un incremento del 30% de la AFM1 en la leche con el tratamiento enzimático en comparación con leche sin enzima (control).

Por otro lado, López *et al.* (2001), estudiaron la distribución de la AFM1 durante la elaboración de queso con leche pasteurizada contaminada. La producción del queso fue por coagulación ácida empleando yogurt como cultivo iniciador junto con cloruro de sodio y



calcio con una maduración de 25 días. Para evaluar la concentración de AFM1 en el queso primero realizaron una extracción de la micotoxina con diclorometano.

La concentración de la aflatoxina en el queso y el suero fue determinada por medio del método ELISA. Reportando que el queso (cuajada) tenía el 40% y el suero el 60% de la AFM1. Concluyendo que la presencia de la micotoxina en el queso es debido a la unión con las CN. Además, mencionan que la disminución del pH durante la coagulación y el tiempo de maduración del queso pudo provocar la liberación de la AFM1 que estaba unida a las CN debido a que se cuantificó un 20% más de la micotoxina en el suero de leche.

Por otro lado, Barbiroli *et al.* (2007), investigaron la distribución de AFM1 en las fracciones proteicas de dos tipos de leche de oveja y cabra. También, produjeron queso ricotta a partir de suero de leche obtenido de dos procesos de coagulación. La concentración de la micotoxina fue determinada por medio del método de ELISA. A los dos tipos de leche les adicionaron tres concentraciones de AFM1: 50, 100 y 150 ng L⁻¹.

A las leches contaminadas les realizaron dos tratamientos independientes para separar las fracciones proteicas: ultrafiltración empleando una membrana de 10,000 Da y ultracentrifugación para la obtención de las CN. Al analizar la distribución de la micotoxina después de la ultrafiltración de la leche, observaron que el 80% de la AFM1 es retenida en la fase proteica (todas las proteínas de la leche). Sin embargo, al separar las CN de las proteínas del suero de leche por ultracentrifugación, observaron que al aumentar la concentración de AFM1 se obtuvo una mayor interacción de la micotoxina con las proteínas del suero de leche, es decir, los sitios de unión de las CN se saturan, por lo cual la micotoxina queda libre para interactuar con las proteínas del suero.

Por otro lado, realizaron dos tipos de coagulación de la leche contaminada: ácida y enzimática. Una vez que la leche fue coagulada determinaron la concentración de AFM1 en las dos fracciones proteicas obtenidas, cuajada y en el suero de leche. En la leche de oveja, la coagulación enzimática no alteró la afinidad relativa de las CN hacia la AFM1 manteniendo el comportamiento de saturación. Pero en la leche de cabra reportaron que los dos tipos de coagulación afectaron la afinidad de la AFM1 hacia las CN. Concluyendo que los cambios de pH modifican la afinidad de la micotoxina por las proteínas.

A partir del suero de leche obtenido de los dos procesos de coagulación elaboraron el queso ricotta. El suero de leche obtenido del método enzimático fue acidificado hasta un



pH de 5.6 con ácido clorhídrico. La coagulación para producir el queso ricotta se llevó a cabo a 90°C por 15 minutos. Realizaron la determinación de la concentración de AFM1 en el queso ricotta y el suero (scotta). Encontrando concentraciones muy bajas de micotoxina en el queso ricotta. Concluyendo que la combinación del tratamiento térmico y la disminución del pH durante la elaboración del queso provocó la liberación de la micotoxina de las proteínas del suero, quedando principalmente en el scotta.

En otra investigación realizada por Chavarría *et al.* (2017), evaluaron la distribución y estabilidad de la AFM1 durante la elaboración de queso fresco madurado por 28 días. Además, analizaron la interacción de la micotoxina con las diferentes proteínas del suero y de la leche. El queso fresco fue producido a partir de leche contaminada con AFM1 por coagulación enzimática. La concentración de la AFM1 en la cuajada y el suero de leche la determinaron por el método de HPLC, reportaron que el 70% de la micotoxina se encontró en el suero de leche.

Adicionalmente, a partir de soluciones que simulan la composición de las proteínas en la leche y el suero de leche con diferentes concentraciones de AFM1, evaluaron la afinidad de la micotoxina hacia las proteínas. Realizaron una precipitación de las proteínas con ácido tricloracético para obtener un pellet proteico. El sobrenadante obtenido de la precipitación ácida fue analizado por HPLC para determinar la concentración de AFM1. Como se puede ver en la Figura 2-8, hay una correlación inversa entre la concentración de las proteínas con la concentración de AFM1 en el sobrenadante. Con lo cual concluyeron que hay una afinidad de la micotoxina hacia las proteínas de la leche.

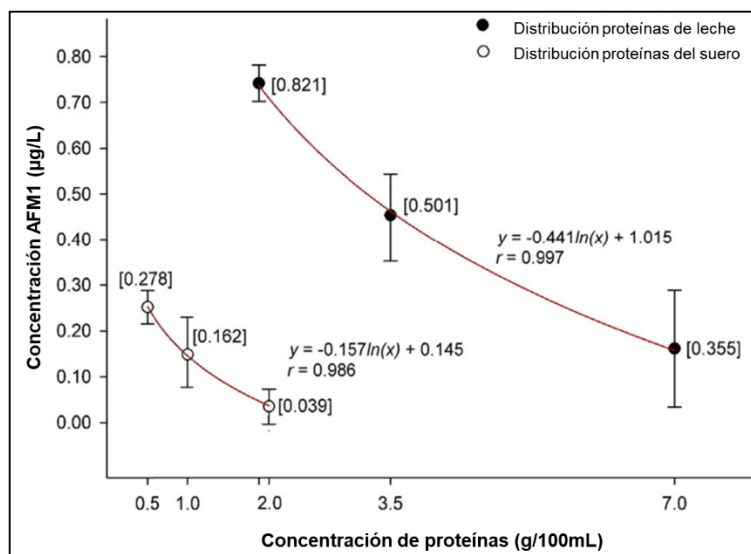


Figura 2-8. Concentración de AFM1 en el suero de leche. ● Distribución a partir de las proteínas de la leche. ○ Distribución a partir de las proteínas del suero de leche (Chavarría *et al.*, 2017).

Con base a los resultados de la Figura 2-9, realizaron otro experimento de afinidad de la AFM1, pero en esta ocasión con las proteínas de forma individual. Como se puede ver en el Cuadro 2-5, la afinidad de la AFM1 hacia las proteínas de la leche es diferente dependiendo el tipo de proteína. Concluyendo que la α -LA y las CN tienen la mayor afinidad hacia la micotoxina.

Cuadro 2-5. Afinidad de la micotoxina por las proteínas de la leche (Chavarría *et al.*, 2017).

Proteína	AFM1 en el sobrenadante ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Afinidad por AFM1 (%)
α -Lactoalbúmina	0.082	87.7
Caseínas	0.129	80.6
β -Lactoglobulina	0.348	49.7
Lactoferrina	0.336	47.9
Seroalbúmina	0.447	7.5

Por último, evaluaron si la afinidad de la AFM1 a las CN está relacionada con una subunidad en particular. Encontrando que hay un efecto antagónico entre las fracciones de las CN como se observa en el Cuadro 2-6. Concluyen que el efecto antagónico de las subunidades de las CN puede ocurrir con las otras proteínas, lo que podría explicar los



reportes de la variabilidad de las diferentes concentraciones de AFM1 en el suero y la cuajada.

Cuadro 2-6. Afinidad de la micotoxina con las fracciones de la caseína y la mezcla de estas (Chavarría *et al.*, 2017).

Proteína	Afinidad por AFM1 (%)
α -Caseína	100
β -Caseína	54.5
κ -Caseína	21.4
(α , β , κ)	26.9

2.7 MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS PARA EVALUAR LA FORMACIÓN DE COMPLEJOS PROTEÍNA-LIGANDO

Los métodos espectroscópicos son usados para determinar la interacción entre una proteína y un ligando como la AFM1 que es el objetivo de estudio en este trabajo. Los métodos más empleados son: la espectroscopía de ultravioleta visible (UV-VIS), la espectroscopía de fluorescencia y el dicroísmo circular.

El fundamento de los dos primeros métodos se basa que durante un equilibrio químico en el que sólo una especie absorbe energía, aplicando la ley de Lambert-Beer, se puede determinar la constante de equilibrio midiendo la absorbancia como una función de la concentración, siempre y cuando, la relación entre la absorbancia o emisión de fluorescencia y la concentración sean lineales en los intervalos utilizados en el ensayo (Harris, 2010).

2.7.1 Espectroscopía de UV-VIS

Es un método empleado para explorar los cambios estructurales de las proteínas en presencia de un ligando, es decir, al formarse un complejo entre la proteína y el ligando. Cuando hay interacción el espectro de absorción del sistema se modifica, debido a los cambios estructurales a nivel electrónico. Estos cambios se pueden observar mediante desplazamientos en la máxima absorción en determinada longitud de onda de la proteína libre. Estos desplazamientos pueden ser a longitudes de onda mayores, es decir corrimiento



hacia el rojo o hacia longitudes de onda menores o corrimiento hacia el azul (Rouessac & Rouessac, 2007).

Se ha reportado que la longitud de onda máxima de absorción en el espectro del UV-vis de las proteínas es cercano a los 280 nm, debido principalmente a los aa aromáticos: triptófano (Trp), tirosina (tyr) y fenilalanina (Phe). Cuando hay la interacción del ligando con la proteína, este produce cambios en las regiones hidrofóbicas, modificando la intensidad de absorción en el espectro del UV-vis de los aa aromáticos produciendo un efecto hipercrómico, es decir un aumento en la absorbancia o un efecto hipocrómico o disminución de la absorbancia (Jing *et al.*, 2016; Rouessac & Rouessac, 2007).

2.7.2 Espectroscopía de fluorescencia

La espectroscopía de fluorescencia permite realizar el análisis en los cambios estructurales de las proteínas, causados por procesos de desnaturalización o por la interacción con otras moléculas. Estos cambios se determinan midiendo los cambios en la intensidad de la emisión de fluorescencia de la proteína o el sistema. La intensidad de la fluorescencia ocurre cuando un fluoróforo es desactivado por la modificación del ambiente de las regiones hidrofóbicas en la proteína. Un fluoróforo es una molécula que tiene la capacidad de emitir fluorescencia, en las proteínas los principales fluoróforos son el Trp, la Tyr y la Phe (Lakowicz, 2006).

Asimismo, la presencia de compuestos que pueden interaccionar con las proteínas como la AFM1 puede producir cambios en la intensidad de la emisión de fluorescencia. Este cambio se representa en el esquema de la Figura 2-9 donde se observa que, al momento de la formación de un complejo entre la proteína con otra molécula presente en el sistema, hay un proceso de transferencia de la energía, lo que se provoca una disminución o apagamiento en la emisión de fluorescencia.

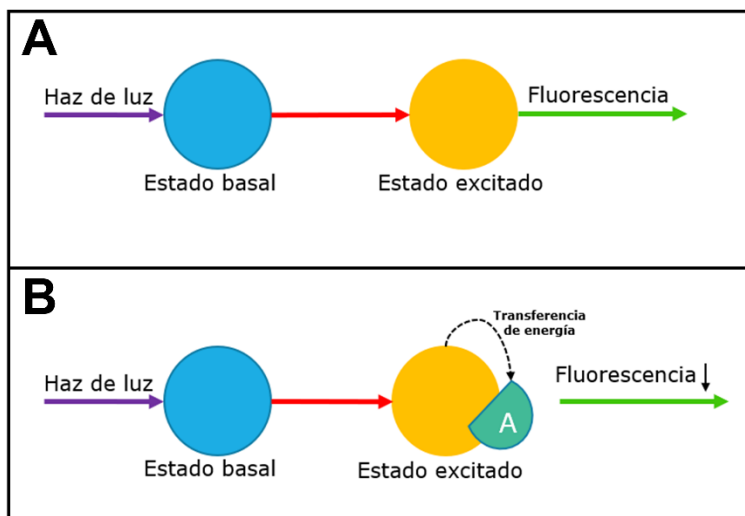


Figura 2-9. Esquema del proceso de emisión de fluorescencia: la proteína se representa con un círculo (azul en su estado basal y amarillo en el estado excitado), el ligando con un medio círculo verde. **(A)** Proceso de emisión de fluorescencia sin la presencia de un ligando; **(B)** disminución de la emisión de fluorescencia por la presencia de un ligando.

En las proteínas la disminución de la fluorescencia se ve reflejada entre el intervalo de longitud de onda de 280 a 350 nm. Como se puede ver en el Cuadro 2-7, este intervalo está definido por la longitud de onda de emisión de fluorescencia de los aa aromáticos. Asimismo, se ha observado que la espectroscopía de fluorescencia es uno de los métodos más empleado para el estudio de la interacción proteína-ligando (Sadeghi-kaji *et al.*, 2019).

Cuadro 2-7. Longitud de onda de excitación y emisión de fluorescencia, así como la eficiencia en la emisión de los aminoácidos aromáticos presentes en las proteínas.

Aminoácido	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)	Eficiencia
Triptófano	295	353	0.2
Tirosina	275	304	0.14
Fenilalanina	260	282	0.02

λ_{ex} =longitud de onda excitación; λ_{em} =longitud de onda emisión

Por otro lado, la disminución de la fluorescencia en la proteína provocado por la interacción con un ligando puede ser por dos mecanismos. Uno de ellos es por un proceso dinámico, es decir cuando hay colisiones del ligando con la proteína. El segundo es una

interacción estática, es cuando se formó el complejo proteína-ligando. Estos procesos pueden ser descritos mediante la ecuación de Stern-Volmer (Ecuación 2-1):

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{sv}[Q] = 1 + k_q\tau_0[Q] \quad (2-1)$$

Donde F_0 y F son la intensidad de la fluorescencia de la proteína en presencia y ausencia del ligando, respectivamente; K_{sv} es la constante de Stern-volmer o de desactivación; τ_0 es la vida media del ligando; $[Q]$ es la concentración del ligando; y k_q es la magnitud de la constante de la velocidad de desactivación (Sadeghi-kaji *et al.*, 2019). Asimismo, cuando los fluoróforos de las proteínas están enterrados, es decir no son accesibles a la parte hidrofílica de la solución que contiene la proteína la magnitud de la k_{sv} es baja. En contraste una magnitud mayor de la K_{sv} indica que hubo una modificación de la región hidrofóbica de la proteína y los fluoróforos están más expuestos (Lakowicz, 2006). Además, se ha reportado que si k_q es mayor a $2 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, el mecanismo de disminución de la fluorescencia es estático, y si es menor, el mecanismo es dinámico (Delavari *et al.*, 2015).

Sin embargo, cuando el ligando y la proteína presentan un mismo valor de absorbancia en el espectro de UV-vis en las longitudes de onda de excitación y emisión se presenta el llamado efecto del filtro interno (EFI). Este efecto es debido a que, en la longitud de onda de excitación, se obtiene el mismo valor de absorbancia en los dos compuestos, esto provocará que haya una disminución en la emisión de fluorescencia. Por lo que se recomienda hacer una corrección del EFI mediante la aplicación de la Ecuación 2-2:

$$F_{cor} = F_{obs} * 10^{(A_{ex} - A_{em})/2} \quad (2-2)$$

Donde F_{cor} es la intensidad de la fluorescencia corregida, F_{obs} es el valor de la intensidad de la fluorescencia obtenida durante el experimento, A_{ex} y A_{em} son los valores de la absorbancia en las longitudes de onda de emisión y excitación del sistema a cada concentración del ligando y la proteína durante todo el experimento (Bakar & Feroz, 2019; Shi *et al.*, 2017).

Una vez realizadas las correcciones del EFI con la Ecuación 2 se puede determinar el tipo de mecanismo que afecta la intensidad de la fluorescencia con la Ecuación 1. Si se obtiene que el mecanismo de interacción estático, es decir hay la formación del complejo proteína-ligando. Se pueden determinar los parámetros de la constante de unión (K_u) y los sitios de unión (n) que describen la afinidad del ligando hacia la proteína. Esto es a partir



de suponer que el posible mecanismo de formación del complejo es el descrito en la Ecuación 2-3:



Asumiendo que la formación del complejo está en equilibrio de acuerdo con la Ecuación 2-3, la K_b se puede describir mediante la Ecuación 2-4:

$$K_u = \frac{[\text{Proteína-Ligando}]}{[\text{Proteína}][\text{Ligando}]} \quad (2-4)$$

Los parámetros K_b y n de la interacción de la proteína y el ligando, se pueden calcular a partir de la ecuación modificada de Stern-Volmer (Ecuación 2-5) (Sadeghi-kaji *et al.*, 2019):

$$\log \frac{(F_0 - F)}{F} = \log K_u + n \log [Q] \quad (2-5)$$

2.7.3 Dicroísmo circular

Algunas biomoléculas poseen asimetría molecular, es decir, si se reflejaran sus imágenes en un espejo no serían idénticas, estas moléculas son llamadas quirales. (Mathews *et al.*, 2002). La quiralidad es una característica molecular fundamental que regula los procesos biomoleculares más importantes tales como las interacciones de proteína-ligando. Esto es mediante la estereoselectividad, que es la formación preferente de un estereoisómero sobre todos los posibles, es decir, un isómero que tiene la misma fórmula molecular y la misma secuencia de átomos enlazados, con los mismos enlaces entre sus átomos, pero difieren en la orientación tridimensional de sus átomos en el espacio (Ranjbar & Gill, 2009).

El dicroísmo circular (DC) se define como la diferencia de la absorción de la luz circularmente polarizada a la izquierda y luz circularmente a la derecha, de una molécula con uno o más centros quirales, como se muestra en la Ecuación 2-6. Para moléculas aquirales $A_{izq} = A_{der}$ por lo tanto $\Delta A = 0$.

$$\Delta A = A_{izq} - A_{der} \quad (2-6)$$

En el caso de las proteínas los enlaces peptídicos provocan una perturbación en el sistema, tal que, su disposición espacial origina un efecto similar a las moléculas quirales, el método de DC, en la región del ultravioleta lejano (190-240 nm), es muy empleado para

determinar los cambios estructurales, debido a que es muy sensible a los cambios de las estructuras secundarias de las proteínas (Whitmore & Wallace, 2008). En la Figura 2-10 se presentan algunos ejemplos de los espectros de DC obtenidos de diferentes proteínas (Berndt, 1996). Asimismo, al realizar una deconvolución de los datos obtenidos de los espectros de DC empleando alguno de los algoritmos disponibles en la base de datos de *Dichroweb* se puede determinar el porcentaje de estructuras secundarias como α -hélices, hojas β así como estructuras en desorden (*random coil*) (Whitmore & Wallace, 2004). Por lo tanto, con este método se puede determinar si un ligando provoca cambios en las estructuras secundarias de una proteína.

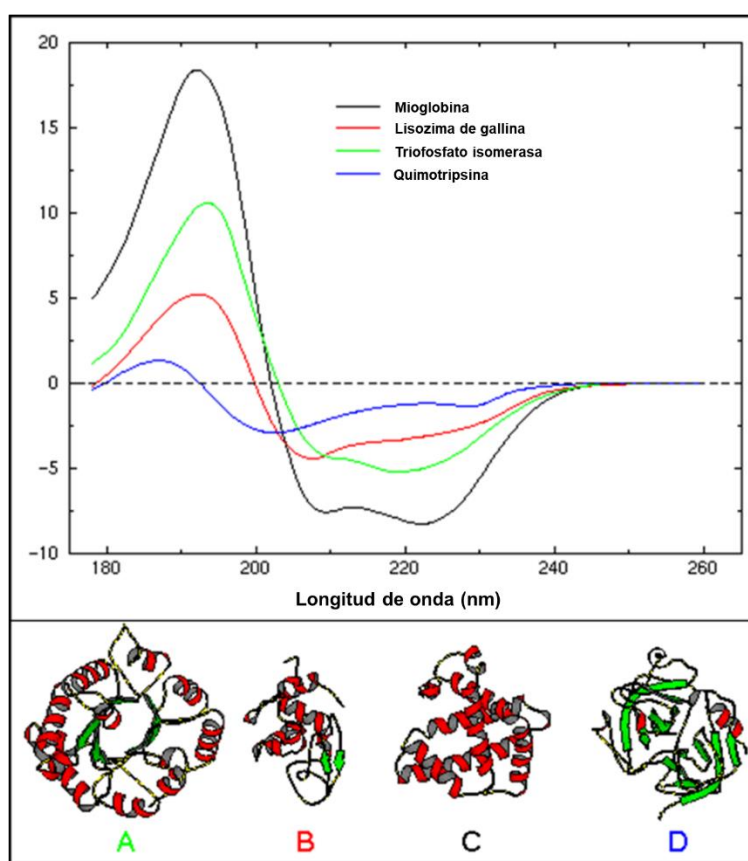


Figura 2-10. Espectros de dicroísmo circular de diferentes proteínas. **(A)** Mioglobina. **(B)** Lisozima de gallina. **(C)** Triofosfato isomerasa. **(D)** Quimotripsina (Berndt, 1996)

2.8 MODELACIÓN MOLECULAR EN SISTEMAS BIOLÓGICOS

Los átomos y moléculas al reaccionar entre sí dan lugar a cambios de conformación, como la disociación de las uniones entre ciertos átomos o la formación de nuevos enlaces. Así como otras alteraciones físicas y químicas como la transición de fase o de solvatación,



entre otros. Estos cambios en conjunto provocan alteraciones en la energía total del sistema, la cual se espera que este en su estado basal, es decir, en el nivel mínimo de energía posible. Asimismo, en el mismo sistema se espera que la entropía llegue a su valor máximo. Cuando se cumplen estos valores en los dos parámetros termodinámicos corresponde a que el sistema llegó a un equilibrio termodinámico. Para predecir la tendencia al equilibrio de un sistema en particular podemos construir modelos matemáticos de la energía del sistema (Vázquez *et al.* 2015).

Por otro lado, con el rápido avance de la tecnología informática y el desarrollo de programas computacionales que ayudan para el estudio de la interacción de biomoléculas. Se ha desarrollado una herramienta computacional que se ha vuelto muy popular para el estudio de la formación de complejos entre proteínas y diversas moléculas, la cual es llamada acoplamiento molecular. Esta herramienta es ampliamente utilizada en el desarrollo de nuevos fármacos, así como la ubicación de sitios de unión entre la proteínas y los fármacos (Fan *et al.*, 2017; Y. Wang *et al.*, 2017).

2.8.1 Acoplamiento molecular

La mayoría de los procesos biológicos depende de las interacciones de los receptores moleculares y sus ligandos. Se denomina acoplamiento molecular a un procedimiento de la química *in silico* utilizado para explorar e intentar predecir los posibles modos de formación de complejos ligando-receptor, siendo generalmente el receptor una proteína u oligómero y el ligando una pequeña molécula como la AFM1 u otra proteína (Alonso *et al.* 2006; Brooijmans, 2009). En la Figura 2-11 se presenta el fundamento del acoplamiento molecular que es predecir la forma en que se une una molécula pequeña o ligando con una proteína o receptor.

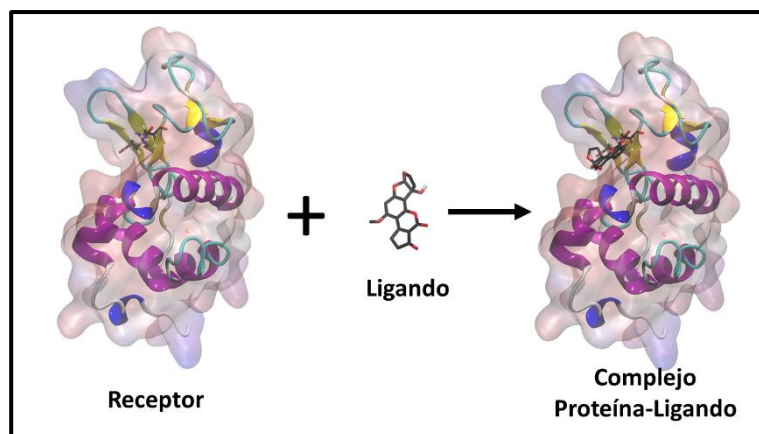


Figura 2-11. Esquema del fundamento del acoplamiento molecular que es predecir la forma de unión de un receptor y un ligando.

El proceso por el cual el ligando se une a una proteína no es sencillo, ya que está influenciado por diversos factores entrópicos y entálpicos. Además, la movilidad, tanto del ligando como del receptor y el efecto de la proteína sobre la distribución de cargas del ligando complican la descripción cuantitativa del proceso. La idea básica es generar un número suficiente de conformaciones del complejo ligando-receptor y entonces clasificarlos de acuerdo con su estabilidad. Los programas de acoplamiento molecular usan una combinación de dos componentes: un algoritmo de búsqueda y una función de puntuación (Alonso *et al.*, 2006; Brooijmans, 2009; Meng *et al.*, 2012).

2.8.1.1 Algoritmos de búsqueda

Un algoritmo de búsqueda riguroso debería elucidar exhaustivamente todos los modos posibles de unión entre el ligando y el receptor. Se deberían de explorar los seis grados de libertad traslacional y rotacional del ligando como se presentan en la Figura 2-12. Además de los grados de libertad de los ángulos de torsión que tienen los ligando y las cadenas laterales de los aa que conforman la proteína (receptor). La solución ideal sería combinar los mejores algoritmos de búsqueda con las mejores funciones de puntuación, pero esto es inviable en la práctica, debido al tamaño del espacio de búsqueda (Brooijmans, 2009; Sethi *et al.*, 2019).

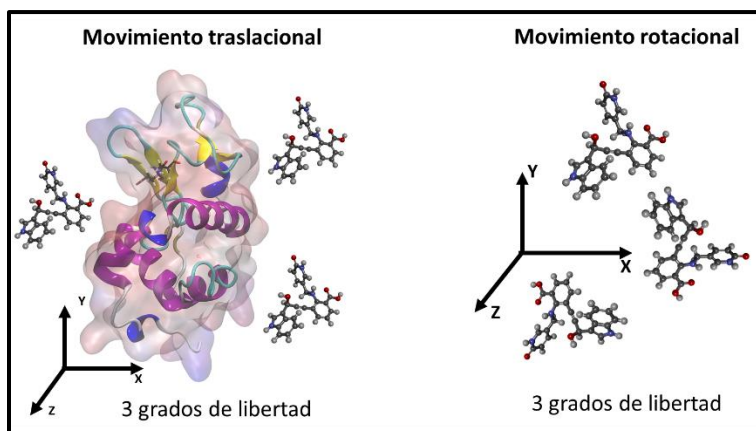


Figura 2-12. Grados de libertad rotacional y traslacional que tiene el ligando sobre el receptor.

Una de las soluciones para aplicar una búsqueda mas exhaustiva es con la implementación de cuadrículas tridimensionales rectangulares llamadas *grids* con las que se delimita el espacio en una región determinada del receptor como se muestra en la Figura 2-13. Asimismo, el uso de los *grids* permite la implementación de funciones de puntuación mas sofisticadas (Brooijmans, 2009; Sethi *et al.*, 2019).

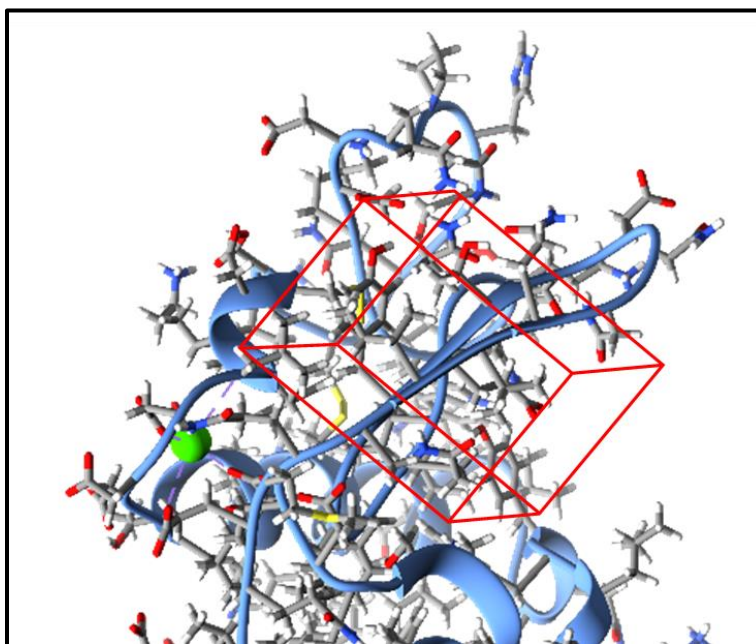


Figura 2-13. Ejemplo de delimitación del espacio de búsqueda de la mejor conformación ligando-receptor por medio de una *grid* tridimensional (rojo).

Existen dos enfoques para predecir la mejor conformación del ligando al unirse al receptor: la complementariedad entre las moléculas y la búsqueda por pasos. Haciendo una

analogía cuando se arma un rompecabezas para representar la complementariedad solo hay una forma en la que pueden encajar dos piezas, en este caso el ligando y el receptor como se puede ver en la Figura 2-14.

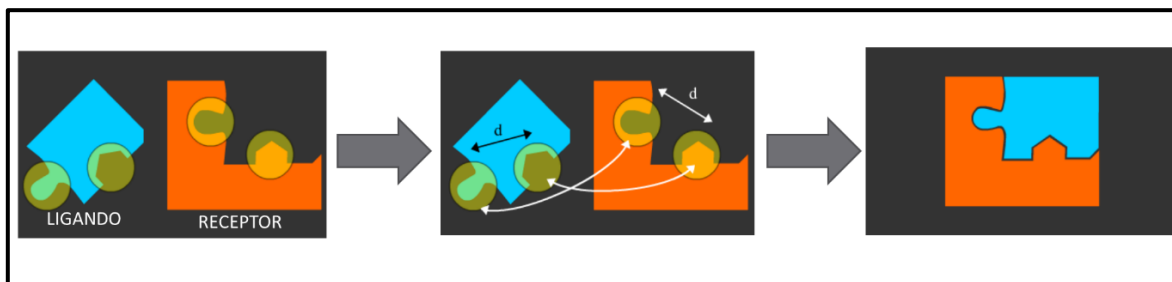


Figura 2-14. Enfoque de búsqueda del complejo ligando-receptor por el método de complementariedad.

Por otro lado, el método de búsqueda por pasos se basa en explorar un conjunto de posibles complejos ligando-receptor. Hay dos módulos que están implicados en este método: el posicionamiento, que es mediante un algoritmo de búsqueda que genera diferentes arreglos del ligando para determinar la mejor posición para formar el complejo y una función de puntuación, que evalúa la calidad de cada complejo. Existen una gran variedad de métodos de búsqueda de este tipo de enfoque, sin embargo, los más utilizados son: conformacional y exhaustiva por fragmentación (Brooijmans, 2009; Sethi *et al.*, 2019).

2.8.1.1.1 Búsqueda conformacional

Este método de búsqueda se basa en la construcción de conformaciones aleatorias del ligando, teniendo tres distintos métodos: Monte Carlo, tabú y algoritmo genético.

El método de Monte Carlo, emplea una conformación aleatoria inicial del ligando en el sitio de unión y evalúa la puntuación con base en calcular la mínima energía de unión (ΔG_b) del complejo, almacenando la configuración inicial y generando una nueva configuración. Si esta nueva configuración tiene mejor puntuación que la anterior se acepta automáticamente. Si, por el contrario, no es un nuevo mínimo, se le realiza un test basado en la función de probabilidad de Boltzmann; si lo supera se acepta, esto se repite hasta que se obtengan el número de conformaciones establecidas (Meng *et al.*, 2012; Taylor *et al.*, 2002).

Los algoritmos de tabú, toman en cuenta las áreas del espacio conformacional que ya han sido previamente exploradas y aceptan o rechazan una determinada conformación



según el valor de la desviación estándar calculada con respecto a cada una de las conformaciones previamente almacenadas (Meng *et al.*, 2012; Taylor *et al.*, 2002).

Los algoritmos genéticos (AG) son métodos estocásticos similares al de Monte Carlo, con la diferencia de que se basa en los principios biológicos de población y competición para encontrar la ΔG_b . Los grados de libertad del ligando se codifican como cadenas binarias llamadas genes. En el caso del acoplamiento molecular, la disposición particular de un ligando y una proteína puede definirse por un conjunto de variables que describen la orientación y conformación del ligando con respecto a la proteína. En el lenguaje del AG, cada variable corresponde a un gen. Este tipo de algoritmo se basa, en generar una población inicial de conformaciones del ligando (genes). Para cada gen de la población inicial evalúa la interacción con el receptor y hace una selección de las mejores conformaciones. Con los mejores genes realiza una serie de combinaciones o mutaciones aleatorias para así volver a evaluar la interacción con el receptor, este método se repite n veces hasta encontrar las mejores conformaciones (Meng *et al.*, 2012; Sethi *et al.*, 2019).

2.8.1.1.2 Búsqueda exhaustiva por fragmentación

En la búsqueda exhaustiva debido a que el número de posibles conformaciones puede ser muy grande, algunos algoritmos utilizan una aproximación que consiste, en una primera etapa el ligando se divide en dos fragmentos uno rígido y otro flexible (con enlaces rotables), posteriormente estos fragmentos se subdividen en la posición de otro enlace rotatable que posean mejor puntuación y así realiza una combinación de los fragmentos, similar al algoritmo genético. Este método también genera un número de iteraciones previamente establecidas hasta encontrar las mejores confirmaciones (Huang & Zou, 2010).

2.8.1.2 Funciones de puntuación

La segunda parte de un programa de acoplamiento molecular consiste en una función de puntuación, que distinguirá entre los modos de enlace generados. Las funciones de puntuación son métodos matemáticos utilizados para predecir la ΔG_b de la interacción entre el ligando y el receptor. Es un elemento clave de los algoritmos de búsqueda en el acoplamiento molecular, ya que determina directamente la precisión del algoritmo. El propósito es ordenar los complejos de menor a mayor ΔG_b (Huang & Zou, 2010; Meng *et al.*, 2012; Sethi *et al.*, 2019).



La ΔG_b es la cantidad termodinámica que interesa en el acoplamiento molecular y se define por la contribución de la diferencia entre la energía del complejo y la diferencia entre las energías del ligando y el receptor como se presenta en la Ecuación 2-7:

$$\Delta G_b = \Delta G_{\text{complejo}} - (\Delta G_{\text{ligando}} - \Delta G_{\text{receptor}}) \quad (2-7)$$

Una función de puntuación ideal sería computacionalmente eficiente y confiable. Numerosas funciones de puntuación se han desarrollado en las últimas décadas y se pueden agrupar en tres categorías básicas según sus métodos de derivación: campo de fuerza, empíricas y basadas en el conocimiento (Brooijmans, 2009; Huang & Zou, 2010).

2.8.1.2.1 Funciones de puntuación de campo de fuerza

Se basan en la descomposición de la ΔG_b del ligando en términos de la interacción con las energías de van der Waals, energías electrostáticas, energías de estiramiento, flexión, torsión de enlaces, entre otros. Para calcular la ΔG_b se basa en un conjunto de parámetros derivados de los campos de fuerza: uno es basado en la construcción asistida de modelos con refinamiento energético (AMBER por sus siglas en inglés) o el conjunto de campos de fuerza de mecánica molecular de la universidad de Harvard (CHARMM por sus siglas en inglés). Sin embargo, este tipo de función de puntuación solo toma en cuenta las fuerzas entrópicas entre el receptor y el ligando, la ΔG_b estimada es solo una aproximación a la verdadera ΔG_b (Brooijmans, 2009; Huang & Zou, 2010).

2.8.1.2.2 Funciones de puntuación empíricas

Una función de puntuación empírica consiste en comparar las energías reportadas en las bases de datos que aportan los diferentes tipos de interacción (formación de puentes de hidrógeno, interacciones iónicas, contactos hidrofóbicos entre otros) obtenidos de complejos conocidos, con las energías calculadas en la formación del complejo evaluado por el programa. Cada componente se multiplica por un coeficiente determinado y luego se suma para dar la ΔG_b . Los coeficientes se obtienen del análisis de una regresión ajustada a un conjunto de complejos ligando-receptor con ΔG_b conocidas. Una desventaja de esta función es que las predicciones de la ΔG_b sólo son precisas si las moléculas de estudio tienen interacciones similares a las de los complejos previamente reportados (Brooijmans, 2009; Meng *et al.*, 2012).



2.8.1.2.3 Funciones de puntuación basadas en el conocimiento

Los parámetros potenciales de las funciones de puntuación basadas en el conocimiento se derivan directamente de la información estructural en complejos receptor-ligando determinados experimentalmente. El principio detrás de estas funciones es el potencial de la fuerza media, que se define por la relación inversa de Boltzmann. Comparando con las funciones de campo de fuerza y empíricas, las basadas en el conocimiento ofrecen un buen equilibrio entre precisión y velocidad (Huang & Zou, 2010; Meng *et al.*, 2012). Sin embargo, al igual que la función empírica debe haber una buena base de datos de complejos similares al del objeto de estudio.

2.8.2 Programas para el acoplamiento molecular

Los programas de acoplamiento molecular realizan un algoritmo de búsqueda en el que las diferentes conformaciones del ligando se evalúan repetidamente hasta que se alcanza la convergencia a la menor ΔG_b . Asimismo, se emplea una función de puntuación, para clasificar a las conformaciones de menor a mayor ΔG_b . Los programas de acoplamiento más utilizados entre 1990 y 2013 son AutoDock, GOLD y Glide. Sin embargo, el único programa de dominio público es AutoDock (Pagadala *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2019).

2.8.2.1 AutoDock

Es uno de los programas más empleado para el acoplamiento molecular. AutoDock (AD) ha demostrado ser una herramienta eficaz y capaz de predecir con rapidez y precisión las conformaciones y ΔG_b del conjunto ligando-proteína. Ofrece campos de fuerza bien comparados como el campo de fuerza molecular de AMBER ampliamente utilizado en la última versión 4.2. Además, la implementación de un *grid* eficiente para delimitar el área de búsqueda en el sitio de unión de la proteína. Adicionalmente, permite utilizar un protocolo de acoplamiento flexible, considerando el movimiento de un número limitado de aa de la proteína, permitiendo someterlos a cambios conformacionales para buscar la mejor postura del ligando y obtener la mayor afinidad de unión a la proteína (Biesiada *et al.*, 2011; Morris *et al.*, 2009).

Además, AD combina el algoritmo Lamarckiano con el AG para mejorar la convergencia en los ligandos con más de ocho enlaces rotables. El AG Lamarckiano (AGL) intercambia el espacio entre el genotipo y el fenotipo. La mutación y el cruce de las



conformaciones del ligando tienen lugar en el espacio del genotipo, mientras que el espacio del fenotipo queda determinado por la optimización de la función de puntuación. El cálculo de la ΔG_b se lleva a cabo después de haber realizado los cambios del genotipo de la población en el espacio del fenotipo (Nguyen *et al.*, 2020; Vieira & Sousa, 2019).

2.8.3 Antecedentes de acoplamiento molecular con aflatoxinas

Hasta el momento hay pocos estudios sobre el acoplamiento molecular de las aflatoxinas con proteínas. Bren *et al.* (2014) realizaron el estudio del acoplamiento de la AFB1 con la enzima citocromo P450 3A4 (CYP3A4) la cual lleva a cabo la metabolización de la AFB1 en sus metabolitos AFB1 exo-8,9-epóxido (genotóxico) o al 3 α -hidroxi AFB1 (no tóxico). Sin embargo, al no haber estructuras experimentales del complejo CYP3A4-AFB1 reportadas en el banco de datos de proteínas (PDB por sus siglas en inglés), la estructura cristalizada de la CYP3A4 que emplearon fue la que tiene como ligando el ketoconazol (PDB 2V0M), esta selección la realizaron debido a que la cooperatividad homotrópica positiva ha sido inequívocamente establecida tanto por técnicas experimentales como teóricas para este complejo proteína-ligando.

La evaluación del acoplamiento lo realizaron empleando el programa GOLD con la función de puntuación Chemscore. Las coordenadas de búsqueda lo determinaron al reflejar el átomo de azufre cercano al residuo Cys-442 con el plano del complejo hemo IX férrico protoporfirina. El tamaño del *grid* lo establecieron de 15 Å para que la molécula de la AFB1 se acoplara completamente en ese espacio. Para la búsqueda emplearon 100,000 operaciones de AG con una población inicial de 100 genes. El acoplamiento lo realizaron en dos etapas: en la primera etapa, una molécula de AFB1 se acopló a la estructura apo de la CYP3A4 produciendo una conformación del complejo CYP3A4-AFB1, esta conformación sirvió como punto de partida para el acoplamiento de una segunda molécula de AFB1.

Los resultados que reportaron se presentan en la Figura 2-15, donde la primera molécula de AFB1 estaba unida en la zona lateral C8-C9 de la enzima tomando la orientación de su forma epóxica y la segunda molécula de AFB1 se unió en el mismo sitio, pero con la orientación de su forma hidroxilada.

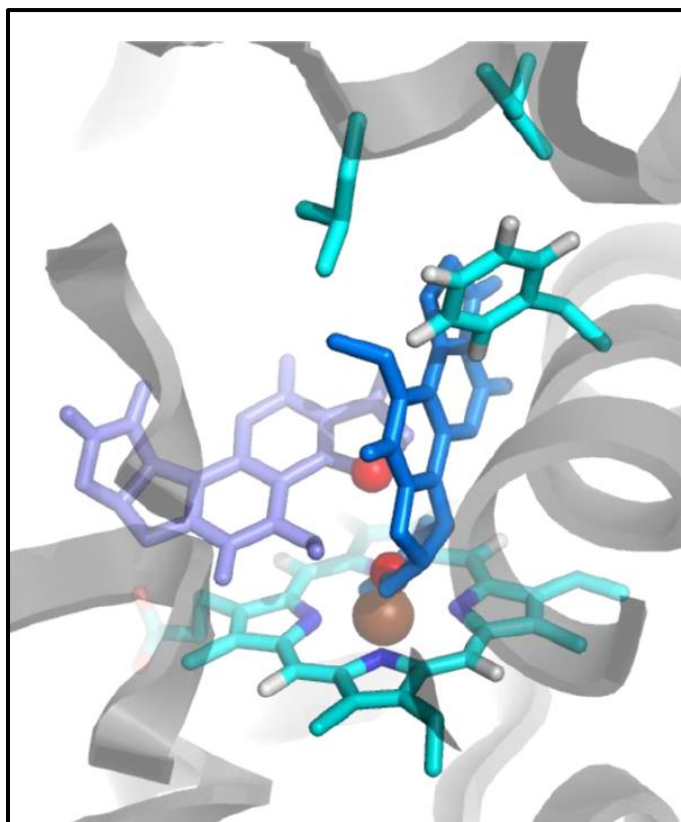


Figura 2-15. Estructuras del complejo CYP3A4-AFB1, la enzima CYP3A4 y los residuos Leu210, Leu211 y Phe304 están representados acorde de los colores de los átomos (carbón en cyan, oxígeno en rojo, nitrógeno en azul, hidrógeno en blanco y hierro en café), la AFB1 orientada de la forma epóxica (violeta) y la orientada en su forma hidroxilada (azul) (Bren *et al.*, 2014)

Por otro lado, Wang *et al.* (2017), realizaron la búsqueda de sitios de unión en proteínas que puedan interactuar con la AFB1 empleando los programas ChemMapper, el cual se basa en la forma y características de las proteínas y LigandProfiler que busca las similitudes de los farmacóforos. Una vez teniendo las diferentes proteínas que presentaron la capacidad de unirse a la micotoxina. Evaluaron el acoplamiento molecular de las proteínas con la AFB1 con el programa Glide XP encontrando 20 complejos AFB1-proteína.

A los complejos obtenidos con Glide XP, se le realizaron simulaciones por dinámica molecular (DM). Los átomos de hidrógeno de las proteínas se agregaron utilizando el módulo TLeap basado en el campo de fuerza AMBER ff99SB con el programa AMBER12. La geometría de los ligandos se optimizó en el nivel de teoría HF/6-31G* utilizando el

programa Gaussian09. Los parámetros del campo de fuerza de los ligandos los obtuvieron usando el módulo ANTECHAMBER basado en el campo de fuerza de AMBER.

Se utilizaron enfoques teóricos combinados, que incluían la búsqueda selectiva de los sitios de unión, el acoplamiento molecular, la simulación DM, el cálculo de las energías de la mecánica molecular combinadas con la ecuación de Poisson-Boltzmann y la solvatación de la superficie (MM/PBSA por sus siglas en inglés) para buscar los mejores sitios de unión de la AFB1 con las proteínas. Finalmente seleccionaron tres proteínas, trihidroxinaftaleno reductasa, GSK-3b y Pim-1, en la base de datos PDB se identifican con las claves: 1G00, 3F88 y 3JYA, respectivamente.

Describen que hay muchos residuos comunes de las proteínas que interactúan con el ligando nativo como con la AFB1. En la Figura 2-16 se presentan las interacciones de la AFB1 con las proteínas 1G00, 3JYA y 3F88 respectivamente. Se puede ver que las interacciones electroestáticas y las de van der Waals son las que predominan.

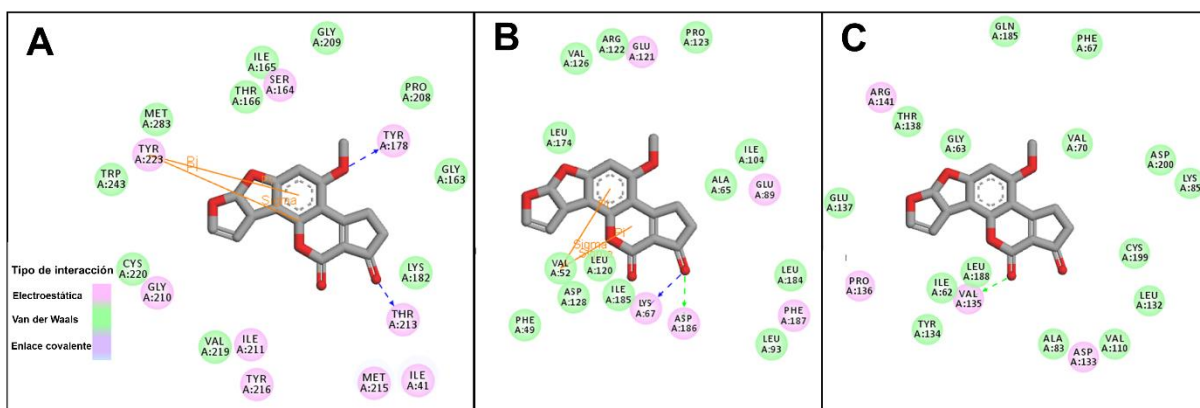


Figura 2-16. Diagramas en 2D de la interacción de la AFB1 con diferentes proteínas. **(A)** Proteína 1G00. **(B)** Proteína 3JYA. **(C)** Proteína 3F88 (Wang *et al.*, 2017).

Adicionalmente, en el trabajo realizado por Poór *et al.* (2017), evaluaron la interacción de las aflatoxinas: B1, B2, G1, G2 y M1 con la seroalbúmina humana (HSA). Primero realizaron la optimización de las estructuras de las aflatoxinas utilizando el programa MOPAC con el funcional PM3. Asimismo, utilizaron la estructura apo de la HSA (PDB 1A06). Para realizar el acoplamiento molecular emplearon el programa AutoDock 4.2. Por medio de la herramienta AutoDock Tools a las aflatoxinas se le adicionaron las cargas parciales de Gastaiger-Marsilli y para la HSA fue la carga de Kollman. El algoritmo de búsqueda empleado fue algoritmo genético Lamarckian. La determinación del sitio de unión

fue de dos formas, una búsqueda en toda la superficie de la proteína. Por lo cual asignaron un *grid* de tamaño 250 X 250 X 250 puntos con un espaciado por punto de 0.375 Å, el centro del *grid* lo ubicaron en el centro de la proteína. Una segunda evaluación la llevaron a cabo en un sitio específico de la proteína llamado Sitio I. En este caso el tamaño del *grid* fue de 90 X 90 X 90 puntos con el mismo espaciado, pero el centrado del *grid* fue en las coordenadas X=35.000, Y=31.825 y Z=37.000. Para ambas evaluaciones se llevaron a cabo 100 corridas de búsqueda conformacional y el número de evaluaciones de energía fue de 20 millones.

Los resultados de las conformaciones de las cinco aflatoxinas para las dos evaluaciones de búsqueda se presentan en la Figura 2-18A, la búsqueda en toda la proteína está identificado como Rank 1 y el Rank 2 es la búsqueda específica en el Sitio I. Asimismo, en la Figura 2-18B se muestra la interacción de la AFB1 en el Sitio I, observando que principalmente se forman puentes salinos con los residuos histidina (H) 222 y arginina (R) 257, y puentes de hidrógeno con H242 y lisina (K) 199. También reportan interacciones hidrofóbicas con los residuos isoleucina (I) 264 y 290, alanina (A) 261.

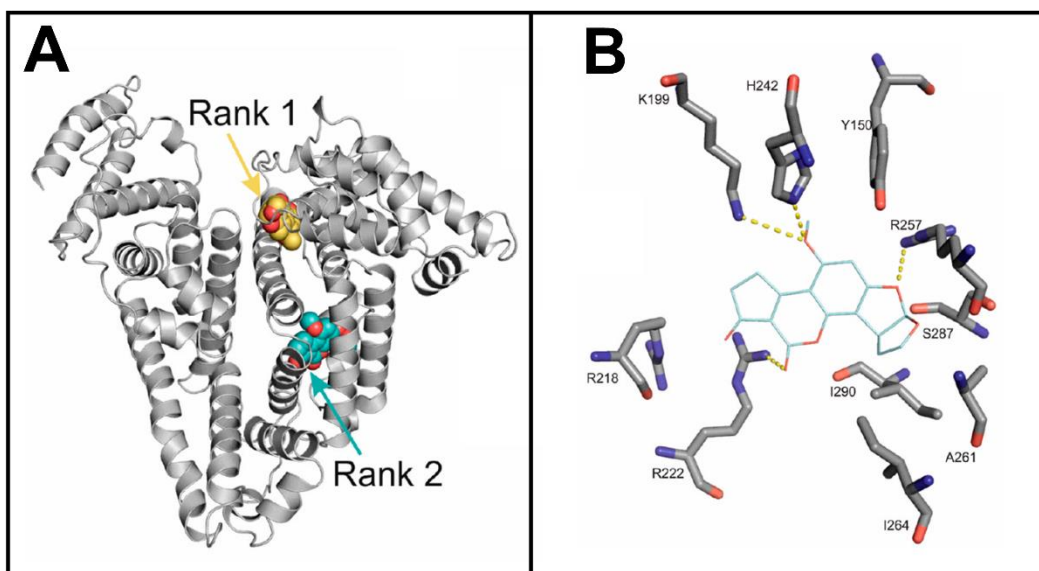


Figura 2-17. Representación del acoplamiento de la HSA (gris) con las conformaciones de la AFB1. **(A)** Búsqueda en toda la proteína Rank 1 (esferas amarillas) y en el sitio I y el Rank 2 (esferas cyan). **(B)** interacción de los aminoácidos con la AFB1 en el Sitio I (Poór *et al.*, 2017).



2.9 BIBLIOGRAFÍA

Alonso, H., Bliznyuk, A. y Gready, J., 2006. Combining docking and molecular dynamic simulations in drug design. *Medicinal Research Reviews* 26: 531–568.

Bakar, K. y Feroz, S., 2019. A critical view on the analysis of fluorescence quenching data for determining ligand–protein binding affinity. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy Elsevier B.V.*, 223: 117337.

Bakirci, I., 2001. A study on the occurrence of aflatoxin M 1 in milk and milk products produced in Van province of Turkey. *Food Control* 12: 1–5.

Barbiroli, A., Bonomi, F., Benedetti, S., Mannino, S., Monti, L., Cattaneo, T. y Iametti, S., 2007. Binding of aflatoxin M1 to different protein fractions in ovine and caprine milk. *Journal of dairy science Elsevier*, 90: 532–40.

Benkerroum, N., 2020. Aflatoxins: Producing-molds, structure, health issues and incidence in southeast asian and sub-saharan african countries. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 17, doi:10.3390/ijerph17041215.

Bennett, J. y Moore, G., 2019. Mycotoxins. En: Schmidt, T. (ed.) *Encyclopedia of Microbiology*, pp. 267–273.

Berndt, K., 1996. Circular dichroism spectroscopy. Disponible en: http://www.cryst.bbk.ac.uk/PPS2/course/section8/ss-960531_21.html.

Bhardwaj, S., Dwivedi, K. y Agarawal, D., 2015. A review: HPLC method development and validation. *International Journal of Analytical and Bioanalytical Chemistry* 5: 76–81.

Bhat, R., Rai, V. y Karim, A., 2010. Mycotoxins in food and feed: Present status and future concerns. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 9: 57–81.

Biesiada, J., Porollo, A., Velayutham, P., Kouril, M. y Meller, J., 2011. Survey of public domain software for docking simulations and virtual screening. *Human Genomics* 5: 497–505.

Brackett, R. y Marth, E., 1982. Association of aflatoxin M1 with casein. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung* 174: 439–441.



Bren, U., Fuchs, J. y Oostenbrink, C., 2014. Cooperative binding of aflatoxin B1 by cytochrome P450 3A4: A computational study. *Chemical Research in Toxicology* 27: 2136–2147.

Brooijmans, N., 2009. Docking methods, ligand design, and validating data sets in the structural genomics era. *Structural Bioinformatics* 635–664.

Bryden, W., 2019. Mycotoxins in the food chain and human health implications. *Encyclopedia of Environmental Health*. Elsevier Inc., 898–905 pp, doi:10.1016/B978-0-12-409548-9.11776-2.

Cámara Nacional de Industriales de la Leche (CANILEC), 2019. Estadística del sector lácteo 2010-2018. Disponible en: [https://www.canilec.org.mx/estadisticas lacteos 2019.pdf](https://www.canilec.org.mx/estadisticas_lacteos_2019.pdf).

Campagnollo, F., Ganev, K., Mousavi, A., Portela, B., Cruz, A., Granato, D., Corassin, C., Augusto, C., Oliveira, F. y Sant, A., 2016. The occurrence and effect of unit operations for dairy products processing on the fate of aflatoxin M1: A review. *Food Control* 68: 310–329.

Chavarría, G., Molina, A., Leiva, A., Méndez, G., Wong-González, E., Cortés-Muñoz, M., Rodríguez, C. y Granados-Chinchilla, F., 2017. Distribution, stability, and protein interactions of aflatoxin M1 in fresh cheese. *Food Control* 73: 581–586.

Chrysina, E., Brew, K. y Acharya, K., 2000. Crystal structures of apo and holo-bovine α -lactalbumin at 2.2-Å resolution reveal an effect of calcium on inter-lobe interactions. *Journal of Biological Chemistry* 275: 37021–37029.

Considine, T. y Flanagan, J., 2009. Interaction between milk proteins and micronutrients. En: Thompson, A., Boland, M. y Singh, H. (eds.) *Milk proteins: from expression to food*. Elsevier, New Zeland, pp. 377–407.

Delavari, B., Saboury, A., Atri, M., Ghasemi, A., Bigdeli, B., Khammari, A., Maghami, P., Moosavi-Movahedi, A., Haertlé, T. y Goliaei, B., 2015. Alpha-lactalbumin: A new carrier for vitamin D3 food enrichment. *Food Hydrocolloids* 45: 124–131.

Deveci, O., 2007. Changes in the concentration of aflatoxin M1 during manufacture and storage of white pickled cheese. *Food Control* 18: 1103–1107.

Domínguez-Ramírez, L., Del Moral-Ramírez, E., Cortes-Hernández, P., García-Garibay, M. y Jiménez-Guzmán, J., 2013. β -lactoglobulin's conformational requirements for ligand binding at the calyx and the dimer interphase: A flexible docking study. *PLoS ONE* 8: 1–13.



European Food Safety Authority (EFSA), 2004. Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to zearalenone as undesirable substance in animal feed. *EFSA Journal* 89: 1–35.

Elsanhoty, R., Salam, S., Ramadan, M. y Badr, F., 2014. Detoxification of aflatoxin M1 in yoghurt using probiotics and lactic acid bacteria. *Food Control* 43: 129–134.

Fan, J., Fu, A. y Zhang, L., 2019. Progress in molecular docking. *Quantitative Biology* 7: 83–89.

Figueroa Hernández, C., Jiménez Gumán, J., Rodríguez Serrano, G., Gómez Ruiz, L., García Garibay, M. y Cruz Guerrero, A., 2013. Leche como alimento funcional. *Contactos* 87: 17–24.

Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura (FIRA), 2019. Panorama agroalimentario: Leche y lácteos 2019. Disponible en: <https://www.inforural.com.mx/wp-content/uploads/2019/06/Panorama-Agroalimentario-Leche-y-la769cteos-2019.pdf>.

Fox, P., 2009. Milk: an overview. En: Thompson, A., Boland, M. y Singh, H. (eds.) *Milk proteins: from expression to food*. Elsevier, pp. 1–54.

Gonçalves, K., Sibaja, K., Feltrin, A., Remedi, R., de Oliveira Garcia, S. y Garda-Buffon, J., 2018. Occurrence of aflatoxins B1 and M1 in milk powder and UHT consumed in the city of Assomada (Cape Verde Islands) and southern Brazil. *Food Control* 93: 260–264.

Harris, D., 2010. Applications of spectrophotometry. *Quantitative Chemical Analysis*. Clancy Marshall, New York, pp. 424–425.

Huang, S. y Zou, X., 2010. Advances and challenges in Protein-ligand docking. *International Journal of Molecular Sciences* 11: 3016–3034.

International Agency for Research on Cancer, (IARC), 2002. Aflatoxins. *IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to Humans*. 86, pp. 171–274.

International Agency for Research on Cancer, (IARC), 2012. Aflatoxins. *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*, 100F, pp. 225–248.

Iqbal, S., Asi, M. y Ariño, A., 2013. Aflatoxins. En: Maloy, S. y Hughes, K. (eds.) *Brenner's Encyclopedia of Genetics*. Academic Press, San Diego, pp. 43–47.



Iqbal, S., Jinap, S., Pirouz, A. y Ahmad Faizal, A., 2015. Aflatoxin M1 in milk and dairy products, occurrence and recent challenges: A review. *Trends in Food Science & Technology* 46: 110–119.

Ismail, A., Akhtar, S., Levin, R., Ismail, T., Riaz, M. y Amir, M., 2016. Aflatoxin M1: Prevalence and decontamination strategies in milk and milk products. *Critical Reviews in Microbiology Informa Healthcare USA, Inc*, 42: 418–427.

Jing, M., Song, W. y Liu, R., 2016. Binding of copper to lysozyme: Spectroscopic, isothermal titration calorimetry and molecular docking studies. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy Elsevier B.V.*, 164: 103–109.

Karabulut, S., Paytakov, G. y Leszczynski, J., 2014. Reduction of aflatoxin B1 to aflatoxicol: A comprehensive DFT study provides clues to its toxicity. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 94: 3134–3140.

Kitchen, D., 2017. Computer-aided drug discovery research at a global contract research organization. *Journal of Computer-Aided Molecular Design Springer International Publishing*, 31: 309–318.

Kos, J., Hajnal, E., Jajić, I., Krstović, S., Mastilović, J., Šarić, B. y Jovanov, P., 2016. Comparison of ELISA, HPLC-FLD and HPLC-MS/MS methods for determination of aflatoxin M1 in natural contaminated milk samples. *Acta Chimica Slovenica* 63: 747–756.

Lakowicz, J., 2006. Introduction to fluorescence. *Principles of fluorescence spectroscopy*. Springer, pp. 1–25.

Livney, Y., 2010. Milk proteins as vehicles for bioactives. *Current Opinion in Colloid and Interface Science Elsevier Ltd*, 15: 73–83.

López, C., Ramos, L., Ramón, S., Bulacio, L. y Perez, J., 2001. Distribution of aflatoxin M1 in cheese obtained from milk artificially contaminated. *International Journal of Food Microbiology* 64: 211–215.

Manetta, A., Giammarco, M., Giuseppe, L., Fusaro, I., Gramenzi, A., Formigoni, A., Vignola, G. y Lambertini, L., 2009. Distribution of aflatoxin M1 during grana padano cheese production from naturally contaminated milk. *Food Chemistry Elsevier Ltd*, 113: 595–599.

Mathews, C., van Holde, K. y Ahern, K., 2002. Estructura tridimensional de las proteínas. *Bioquímica*. Pearson Educación, Madrid, España, pp. 228–229.



Megalla, S. y Mohran, M., 1984. Fate of aflatoxin B-1 in fermented dairy products. *Mycopathologia* 88 : 27–29.

Meng, X., Zhang, H., Mezei, H. y Cui, M., 2012. Docking: A powerful approach for structure-based drug discovery. *Current Computer-Aided Drug Design* 7: 146–157.

Mohammadi, F. y Moeeni, M., 2015a. Study on the interactions of trans-resveratrol and curcumin with bovine α -lactalbumin by spectroscopic analysis and molecular docking. *Materials Science and Engineering: C* 50: 358–366.

Mohammadi, F. y Moeeni, M., 2015b. Analysis of binding interaction of genistein and kaempferol with bovine α -lactalbumin. *Journal of Functional Foods Elsevier Ltd*, 12: 458–467.

Molognoni, L., Daguer, H., dos Santos, I. y De Dea Lindner, J., 2019. Influence of method validation parameters in the measurement uncertainty estimation by experimental approaches in food preservatives analysis. *Food Chemistry Elsevier*, 282: 147–152.

Monti, L., Panarelli, E., Iametti, S. y Giangiacomo, R., 2009. Aflatoxin M1 distribution during cream separation and butter manufacture from naturally contaminated milk. *Milchwissenschaft* 64: 82–84.

Morris, G., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M., Belew, R., Goodsell, D. y Olson, A., 2009. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of Computational Chemistry* 30: 2785–2791.

Motawee, M. y McMahon, D., 2009. Fate of aflatoxin M1 during manufacture and storage of feta cheese. *Journal of Food Science* 74: 42–45.

Murcia, H. y Diaz, G., 2020. In vitro hepatic aflatoxicol production is related to a higher resistance to aflatoxin B1 in poultry. *Scientific Reports Springer US*, 10: 1–8.

Nguyen, N., Nguyen, T., Pham, T.N., Huy, N., Bay, M., Pham, M., Nam, P., Vu, V. y Ngo, S., 2020. Autodock Vina adopts more accurate binding poses but Autodock4 forms better binding affinity. *Journal of Chemical Information and Modeling* 60: 204–211.

Norma Oficial Mexicana, NOM-243-SSA-2010, 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’Riordan, N., Kane, M., Joshi, L. y Hickey, R., 2014. Structural and functional characteristics of bovine milk protein glycosylation. *Glycobiology* 24: 220–236.

Oancea, A., Aprodu, I., Râpeanu, G., Bahrim, G. y Stanciuc, N., 2018. The binding mechanism of anthocyanins from sour cherries (*Prunus cerasus L*) skins to bovine β -lactoglobulin: A fluorescence and in silico-based approach. *International Journal of Food Properties Taylor & Francis*, 20: S3096–S3111.

Pagadala, N., Syed, K. y Tuszynski, J., 2017. Software for molecular docking: a review. *Biophysical Reviews Biophysical Reviews*, 9: 91–102.

Patrick, B., Creamer, L. y Jameson, G., 2009. Structure and stability of whey proteins. En: Thompson, A., Boland, M. y Singh, H. (eds.) *Milk proteins: from expression to food*. Elsevier, pp. 163–204.

Pike, A., Brew, K. y Acharya, K., 1996. Crystal structures of guinea-pig, goat and bovine α -lactalbumin highlight the enhanced conformational flexibility of regions that are significant for its action in lactose synthase. *Structure* 4: 691–703.

Poór, M., Bálint, M., Hetényi, C., Gődér, B., Kunsági-Máté, S., Kőszegi, T. y Lemli, B., 2017. Investigation of non-covalent interactions of aflatoxins (B1, B2, G1, G2, and M1) with serum albumin. *Toxins* 9: 1–12.

Prandini, A., Tansini, G., Sigolo, S., Filippi, L., Laporta, M. y Piva, G., 2009. On the occurrence of aflatoxin M1 in milk and dairy products. *Food and Chemical Toxicology* 47: 984–991.

Ranjbar, B. y Gill, P., 2009. Circular dichroism techniques: Biomolecular and nanostructural analyses- A review. *Chemical Biology and Drug Design* 74: 101–120.

Rouessac, F., & Rouessac, A. (2007). Ultraviolet and visible absorption spectroscopy. En *Chemical Analysis: Modern Instrumentation Methods and Techniques* (2nd Edition, pp. 167–203). John Wiley and sons.

Rovoli, M., Thireou, T., Choiset, Y., Haertlé, T., Sawyer, L., Eliopoulos, E. y Kontopidis, G., 2018. Thermodynamic, crystallographic and computational studies of non-mammalian fatty acid binding to bovine β -Lactoglobulin. *International Journal of Biological Macromolecules Elsevier B.V.*, 118: 296–303.



Sadeghi-kaji, S., Shareghi, B., Saboury, A. y Farhadian, S., 2019. Spectroscopic and molecular docking studies on the interaction between spermidine and pancreatic elastase. *International Journal of Biological Macromolecules* 131: 473–483.

Salari, N., Kazemina, M., Vaisi-Raygani, A., Jalali, R. y Mohammadi, M., 2020. Aflatoxin M1 in milk worldwide from 1988 to 2020: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Food Quality* 2020, doi:10.1155/2020/8862738.

Sethi, A., Joshi, K., Sasikala, K. y Alvala, M., 2019. Molecular docking in modern drug discovery: Principles and recent applications. *Drug Discovery and Development - New Advances [Working Title]* 1–21.

Shi, J., Wang, Q., Pan, D., Liu, T. y Jiang, M., 2017. Characterization of interactions of simvastatin, pravastatin, fluvastatin, and pitavastatin with bovine serum albumin: multiple spectroscopic and molecular docking. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* 35: 1529–1546.

Shrivastava, A. y Gupta, V., 2011. Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. *Chronicles of Young Scientists* 2: 21.

Shuib, N., Makahleh, A., Muhamad, S. y Saad, B., 2017. Natural occurrence of aflatoxin M1 in fresh cow milk and human milk in Penang, Malaysia. *Food Control* 73: 966–970.

Smith, J. y Groopman, J., 2018. Aflatoxins. *Encyclopedia of Cancer* 1–14.

Steijns, J., 2001. Milk ingredients as nutraceuticals. *International Journal of Dairy Technology* 54: 81–88.

Stubblefield, R., 1979. The rapid determination of aflatoxin M1 in dairy products. *Science and Education Administration* 800–801.

Tadesse, S., Berhanu, T. y Woldegiorgis, A., 2020. Aflatoxin M1 in milk and milk products marketed by local and industrial producers in Bishoftu town of Ethiopia. *Food Control Elsevier*, 118: 107386.

Taylor, R., Jewsbury, P. y Essex, J., 2002. A review of protein-small molecule docking methods. *Journal of Computer-Aided Molecular Design* 16: 151–166.

Van Eijkeren, J., Bakker, M. y Zeilmaker, M., 2006. A simple steady-state model for carry-over of aflatoxins from feed to cow's milk. *Food Additives and Contaminantes* 23: 833–838.



Vaz, A., Cabral Silva, A., Rodrigues, P. y Venâncio, A., 2020. Detection methods for aflatoxin M1 in dairy products. *Microorganisms* 8: 1–16.

Vázquez Contreras, E. y Vázquez González, M., 2015. Modelación molecular en sistemas biológicos. Universidad Autónoma Metropolitana, Cuajimalpa, Ciudad de México, 47 pp.

Vieira, T. y Sousa, S., 2019. Comparing AutoDock and Vina in ligand/decoy discrimination for virtual screening. *Applied Sciences (Switzerland)* 9, doi:10.3390/app9214538.

Wang, B., Pan, D., Zhou, K., Lou, Y. y Shi, J., 2019. Multi-spectroscopic approaches and molecular simulation research of the intermolecular interaction between the angiotensin-converting enzyme inhibitor (ACE inhibitor) benazepril and bovine serum albumin (BSA). *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy Elsevier B.V.*, 212: 15–24.

Wang, Y., Liu, J., Zhang, L., He, X. y Zhang, J., 2017. Computational search for aflatoxin binding proteins. *Chemical Physics Letters* 685: 1–8.

Whitmore, L. y Wallace, B., 2004. DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data. *Nucleic Acids Research* 32: 668–673.

Whitmore, L. y Wallace, B., 2008. Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: Methods and reference databases. *Biopolymers* 89: 392–400.

Williams, J., Phillips, T., Jolly, P., Stiles, J., Jolly, C. y Aggarwal, D., 2004. Human aflatoxin in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. *The American Journal of Clinical Nutrition* 80: 1106–1122.

Womack, E., Sparks, D. y Brown, A., 2016. Aflatoxin M1 in milk and milk products: A short review. *World Mycotoxin Journal* 9: 305–315.

Xiang, L. y Melton, L., 2018. Interactions of β -lactoglobulin with small molecules. *Encyclopedia of Food Chemistry Elsevier*, 2: 560–565.

Zhang, K. y Banerjee, K., 2020. A review: Sample preparation and chromatographic technologies for detection of aflatoxins in foods. *Toxins* 12: 1–39.



3 JUSTIFICACIÓN

En México se ha reportado un alto consumo de leche y sus derivados principalmente de quesos, además que en los últimos años se ha observado una alta incidencia de la micotoxina en estos alimentos, siendo un riesgo para la salud humana debido a que se ha demostrado que es un compuesto carcinogénico. A pesar de que existe una norma mexicana que legisla en contenido máximo permitido de AFM1 en la leche, no existe una normativa para los derivados de la leche.

Asimismo, hay diversas investigaciones que buscan formas de detoxificar la leche. Encontrando que esta micotoxina es resistente a los tratamientos térmicos que se le dan a la leche. Además, está reportado que con la fermentación de la leche con bacterias ácido-lácticas hay una disminución en el contenido de la AFM1. Sin embargo, durante la elaboración de quesos, no se ha encontrado que haya una reducción de la concentración de la micotoxina, sino que se describe que hay una variabilidad en la distribución entre la cuajada y el suero de leche. En las diversas investigaciones sobre la distribución e interacción de la micotoxina, no hay alguno que describa la forma en que interacciona la AFM1 con las proteínas de la leche.

Por otro lado, en diversas investigaciones han combinado el uso de métodos espectroscópicos, así como, herramientas computacionales como el acoplamiento molecular para describir la forma en que interactúan compuestos bioactivos con diversas proteínas. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la interacción de la AFM1 con las proteínas de la leche α -lactoalbúmina y β -lactoglobulina empleando métodos espectroscópicos y la herramienta del acoplamiento molecular para determinar los parámetros termodinámicos de la interacción de la AFM1 con las proteínas de la leche.



4 HIPÓTESIS

Si existe una interacción entre la AFM1 con la α -lactoalbúmina y β -lactoglobulina, se podrá demostrar mediante métodos *in silico* e *in vitro* los tipos de interacción.

5 OBJETIVO GENERAL

Determinar los parámetros termodinámicos de la interacción entre la AFM1 y las principales proteínas del suero de la leche: α -lactoalbúmina y β -lactoglobulina empleando métodos espectroscópicos y acoplamiento molecular.

6 OBJETIVOS PARTICULARES

- Realizar una búsqueda bibliográfica de la situación actual de las investigaciones que evalúan la concentración de AFM1 en la leche y quesos producidos en México.
- Estudiar la interacción de la AFM1 con la α -lactoalbúmina bovina por los métodos espectroscópicos:
 - UV-VIS.
 - Fluorescencia.
 - Dicroísmo circular.
- Determinar la forma de interacción de la α -lactoalbúmina y la β -lactoglobulina bovinas con la AFM1 por acoplamiento molecular.



7 ANÁLISIS DE LA CONTAMINACIÓN DE AFM1 EN LECHE Y QUESOS PRODUCIDOS EN MÉXICO

7.1 RESUMEN

El objetivo de este capítulo fue realizar una revisión de las investigaciones que han detectado y/o cuantificado la AFM1 en leche y quesos típicos producidos en México. La búsqueda sistemática reflejó que se han realizado pocos estudios en este país, encontrando solo 10 publicaciones que evaluaron el contenido de AFM1 en leche y 3 en dos tipos de queso: oaxaca y panela. Los métodos reportados para cuantificar la aflatoxina fueron HPLC-FD y ELISA. Encontrando que en el 55 y 100% de los trabajos que analizaron leche cruda e industrializada, respectivamente, determinaron concentraciones superiores a los $0.5 \mu\text{g AFM1 kg}^{-1}$, que es el límite establecido en la norma mexicana. Además, se observó que la leche cruda producida durante la temporada de lluvias en el estado de Jalisco (2007), cumplió con lo permitido en la norma. Respecto, a las investigaciones en los dos tipos de queso, también se reportaron concentraciones de AFM1 mayores a las permitidas en la leche. Asimismo, se ha reportado la presencia de las principales aflatoxinas en el alimento para ganado y estas pueden ser metabolizadas generando sus derivados hidroxilados, los cuales pueden estar presentes en la leche.

7.2 INTRODUCCIÓN

Las aflatoxinas son metabolitos secundarios tóxicos producidos por hongos del género *Aspergillus*, principalmente por las especies *A. flavus*, *A. parasiticus* y *A. nominus*. Las estructuras químicas de las cuatro principales aflatoxinas: B1 (AFB1); B2 (AFB2); G1 (AFG1) y G2 (AFG2) se muestran en la Figura 7-1 (IARC, 2012; Iqbal *et al.*, 2013). La contaminación de los alimentos con aflatoxinas ha ganado mucha atención, siendo uno de los principales factores de riesgos para la salud de los seres humanos y los animales (Iqbal *et al.*, 2013; Min *et al.*, 2020). De acuerdo con la agencia internacional de investigación del cáncer (IARC) las aflatoxinas se han identificado como carcinogénicos del grupo 1, es decir que está comprobado que pueden producir cáncer al humano (IARC, 2012). Las diferentes formas de exponerse a las micotoxinas pueden ser mediante la ingesta, inhalación y/o absorción por la piel (IARC, 2012; Vaz *et al.*, 2020). Se pueden encontrar en una amplia gama de productos agrícolas para el consumo humano como los cereales, especias, semillas oleaginosas, nueces de árbol, entre otros (Bhat *et al.*, 2010; IARC, 2012).

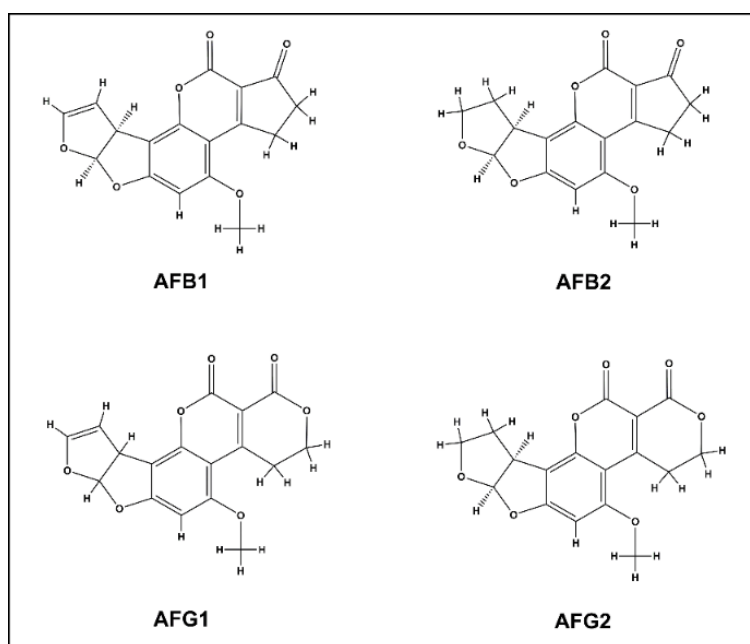


Figura 7-1. Estructuras químicas de las principales aflatoxinas producidas por hongos. Las cuales fueron obtenidas de la base de datos de PubChem.

Además, la exposición a las aflatoxinas también puede ser indirecta, es decir, al consumir carne o productos derivados de animales que fueron alimentados con piensos contaminados. Por ejemplo, en el hígado de las vacas por la acción de la enzima citocromo

P450 (CYP), la AFB1 es metabolizada en su derivado hidroxilado llamado AFM1, el cual puede ser excretado en la leche o la orina (Figura 7-2). Este metabolito también es considerado un carcinogénico del grupo 1 por la IARC (Benkerroum, 2020; Gonçalves *et al.*, 2018; IARC, 2012; Shuib *et al.*, 2017). Adicionalmente, Van Eijkeren *et al.* (2006) reportaron que entre el 0.3 y 6.2% de la AFB1 ingerida por los animales productores de leche es metabolizada a AFM1. La concentración de esta micotoxina en la leche varía dependiendo la raza de la vaca, la capacidad de producción de leche y la concentración de AFB1 en el alimento. Finalmente, se ha reportado el potencial de la AFM1 para unirse con las proteínas de la leche, por lo cual puede encontrarse en productos derivados como el queso (Chavarría *et al.*, 2017; Jiménez-Pérez *et al.*, 2020; Vaz *et al.*, 2020).

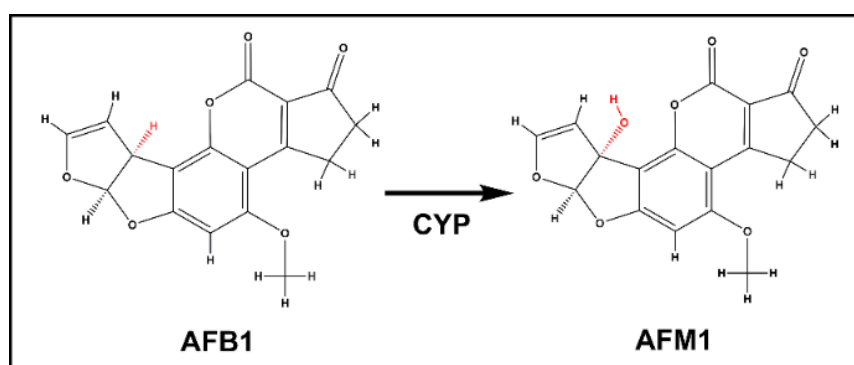


Figura 7-2. Representación de la metabolización de la AFB1 por acción de la enzima citocromo P450 (CYP) a su derivado hidroxilado AFM1 en el hígado de la vaca. Las estructuras fueron obtenidas de la base de datos de PubChem.

De acuerdo con el reporte del panorama agroalimentario: Leche y lácteos en el 2018 hubo un consumo aparente de 15,288 millones de litros de leche en México (FIRA, 2019). Debido a los riesgos a la salud derivados de la presencia de AFM1 en este producto, la Secretaría de Salud de México, en la norma NOM-243-SSA1-2010, estableció que la concentración máxima permitida en la leche es de $0.5 \mu\text{g AFM1 kg}^{-1}$. Como se puede ver en el Cuadro 7-1, los niveles de AFM1 en los productos lácteos se regulan de manera diferente dependiendo de cada país. Cabe destacar que en Honduras o Argentina el límite máximo de AFM1 en la leche es diez veces menor al establecido en México. Además, varios países establecieron límites en el contenido de AFM1 en productos lácteos como el queso. En contraste, en la norma mexicana no se establece un límite en el contenido de la micotoxina para el queso u otros derivados de la leche, a pesar de que el queso ha sido

considerado un producto lácteo de mayor demanda en el mundo, de acuerdo con el reporte del panorama agroalimentario: Leche y lácteos (FIRA, 2019).

Cuadro 7-1. Concentración máxima permitida de AFM1 en leche y queso en diferentes países.

País	Leche ($\mu\text{g AFM1 kg}^{-1}$)	Quesos ($\mu\text{g AFM1 kg}^{-1}$)
México ¹	0.50	Sin regulación
Estados Unidos ²	0.50	Sin regulación
Honduras ²	0.05	0.25
Argentina ²	0.05	0.25
Brasil ²	0.50	2.50
Suiza ²	0.05	0.25
Egipto ²	0.00	0.00
Nigeria ²	1.00	Sin regulación

Fuente: ¹.- NOM-243-SSA1-2010; ².- (Vaz *et al.*, 2020).

Debido al efecto carcinogénico de las aflatoxinas en los seres humanos, es de suma importancia tener métodos adecuados y precisos para detectar y cuantificar estos compuestos en la leche y sus derivados. En los últimos años, los investigadores se han enfrentado a diversos desafíos para desarrollar métodos analíticos con diferentes niveles de sensibilidad y precisión (Zhang & Banerjee, 2020). Uno de ellos es la extracción de la AFM1 de matrices complejas como la leche, donde se debe remover la grasa y posteriormente realizar la separación de la micotoxina de las proteínas. Para muestras de queso, es necesario realizar una molienda con algún solvente para asegurar la extracción adecuada de la micotoxina.

En consecuencia, para una detección y cuantificación óptima de la AFM1 en la leche y sus derivados, se requieren de pasos preliminares, tales como: (1) realizar un muestreo aleatorio y (2) la preparación de la muestra. En este último se incluye la extracción de la aflatoxina de la matriz alimentaria utilizando disolventes orgánicos (acetonitrilo, metanol,



acetona, cloroformo o diclorometano) seguido de un paso de purificación. Para ello, se pueden emplear columnas de extracción en fase sólida (SPE), columnas de inmunoafinidad (IAC) así como de extracción líquido-líquido (Salari *et al.*, 2020; Vaz *et al.*, 2020; Womack *et al.*, 2016).

Los métodos más utilizados para la identificación y cuantificación de aflatoxinas son la cromatografía líquida de alta resolución con detección de fluorescencia (HPLC-FD) y el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) (Salari *et al.*, 2020; Vaz *et al.*, 2020; Womack *et al.*, 2016). El primero tiene la ventaja de una alta sensibilidad con límites de detección de hasta 0.001 $\mu\text{g AFM1 kg}^{-1}$, mientras que el segundo se caracteriza por la facilidad en que se realiza el análisis, ya que requiere de pocos pasos de preparación de la muestra, y también permite realizar numerosos análisis al mismo tiempo empleando *kits* disponibles comercialmente. Sin embargo, como todos los métodos analíticos, presentan algunas desventajas. En el HPLC-FD se requiere de varios pasos para la extracción y el aislamiento de la micotoxina. Además, de insumos costosos para la cuantificación como el detector de fluorescencia. En el caso de ELISA, la mayor limitación es la obtención de falsos positivos y la necesidad de verificar los resultados con métodos más precisos como HPLC-FD (Kos *et al.*, 2016; Vaz *et al.*, 2020; Womack *et al.*, 2016).

Para garantizar una identificación y cuantificación confiables de la aflatoxina en las condiciones experimentales establecidas, es indispensable determinar los parámetros de validación del método analítico empleado. El primer parámetro es el límite de detección (LDD) que define la cantidad más baja de la micotoxina detectada por el método analítico y que se puede diferenciar del blanco (muestra sin AFM1). Así como el límite de cuantificación (LDC) el cual es la mínima concentración de micotoxina en una muestra que se puede determinar con exactitud y precisión. Estos límites son indispensables, ya que los umbrales de detección de los diversos métodos no son totalmente confiables en la cuantificación de concentraciones cercanas a cero (Shrivastava & Gupta, 2011). Otra parte esencial en la validación del método es la construcción de una curva de calibración a partir de diferentes concentraciones de un estándar de la AFM1, lo que permite obtener el coeficiente de correlación (R^2), un parámetro que mide la confianza del método en el valor de concentración determinado. Finalmente, es vital definir el porcentaje de recuperación con base al estándar analizado, ya que corresponde a la precisión del método.



Debido a que la presencia de AFM1 en la leche y sus derivados como el queso, representan un riesgo para la salud humana, además que en México hay un alto consumo de estos productos. Es importante obtener una perspectiva de la situación sobre el contenido de AFM1 en la leche y quesos típicos producidos en México en los últimos años con base en las publicaciones científicas. Por lo tanto, el objetivo de este capítulo fue realizar una búsqueda sistemática de publicaciones en los últimos 20 años sobre la detección y/o cuantificación de aflatoxinas en leche y quesos típicos producidos en México.

7.3 MÉTODO DE BÚSQUEDA DE LOS ARTÍCULOS

Se realizó una búsqueda bibliográfica sistemática en las siguientes bases de datos: Science Direct, Scopus y Google Scholar. Los criterios de búsqueda fueron: “Aflatoxin” and “M1” or “Milk” or “Cheese” and “México”. El período de búsqueda se definió desde enero de 2000 hasta agosto de 2020.

7.3.1 Selección de artículos

Los artículos de investigación seleccionados para esta revisión incluyeron estudios sobre detección y/o cuantificación de AFM1 en leche y/o queso producido en México. Los reportes que provenían de resúmenes de póster o trabajos de congresos no fueron considerados. Además, se descartó todo artículo que tuviera datos similares a otra investigación.

7.4 RESULTADOS

En las bases de datos consultadas se obtuvieron 13 publicaciones que coincidieron con los criterios de búsqueda determinados para esta revisión bibliográfica, de las cuales 12 son artículos y una tesis de especialidad. Encontrando que 10 de ellos se centran en el análisis de muestras de leche de vaca (Carvajal *et al.*, 2003a; Córdova-Izquierdo *et al.*, 2007; Espinosa Montesinos, 2019; Gutiérrez *et al.*, 2013a, 2013b; Hernández-Falcón *et al.*, 2018; Landeros *et al.*, 2012; Pérez *et al.*, 2008; Quevedo-Garza *et al.*, 2018; Reyes Velázquez *et al.*, 2009) y los 3 restantes en dos diferentes quesos frescos elaborados con leche de vaca: tipo oaxaca (Carvajal-Moreno *et al.*, 2019; Hernández-Camarillo *et al.*, 2016a) y tipo panela (Urbán *et al.*, 2009).



7.4.1 Métodos de detección y cuantificación

De acuerdo con la norma NOM-243-SSA1-2010, el método indicado para la cuantificación de la micotoxina es el HPLC-FD. Como se puede ver en el Cuadro 7-2, los trabajos que analizaron muestras de leche con este método fueron seis, mientras que en los cuatro restantes utilizaron el método de ELISA. Cabe destacar que Reyes Velázquez *et al.* (2009) determinaron los niveles de AFM1 utilizando ambos métodos. Se puede asumir que los autores que utilizaron el método de ELISA en lugar del HPLC-FD como lo dicta la norma por ser económico, rápido y fácil de usar. Esta suposición concuerda con lo descrito por Salari *et al.* (2020) que analizaron 122 artículos científicos sobre la cuantificación del contenido de AFM1 en muestras de leche en todo el mundo. Reportando que los métodos utilizados eran HPLC, ELISA y cromatografía en capa fina (TLC), mencionando que el método de ELISA era el más utilizado para la detección de aflatoxinas. Asimismo, las concentraciones de AFM1 en queso fueron determinadas por HPLC-FD en todos los trabajos de investigación incluidos en esta revisión.

Como ya se mencionó, es crucial validar el método analítico para asegurar que los resultados sean confiables. Sin embargo, como se ve en el Cuadro 7-2, a pesar de que el método de HPLC-FD fue el más utilizado, en ningún trabajo se reportaron los cuatro parámetros de validación detallados en la introducción. Los resultados más confiables obtenidos por HPLC-FD fueron los reportados por Quevedo-Garza *et al.* (2018) quienes determinaron los valores LDD y LDC, así como el porcentaje de recuperación de AFM1. Carvajal *et al.* (2003a) y Pérez *et al.* (2008) reportaron solo el valor de R^2 y el porcentaje de recuperación, mientras que Espinosa Montesinos (2019) solo reportó el coeficiente de correlación. La falta de los LDD y LDC no garantiza la precisión al determinar las concentraciones más bajas en estos trabajos. En los estudios en los que se evaluó el contenido de AFM1 en queso, encontramos que Urban *et al.* (2009) utilizó el método de ELISA y reportó los cuatro parámetros de validación y en los dos trabajos restantes calcularon el R^2 , porcentaje de recuperación y LDD, por lo que se puede asumir que sus resultados son precisos y exactos.



Cuadro 7-2. Métodos analíticos y sus parámetros de validación empleados para detectar y cuantificar los niveles de AFM1 en leche y quesos producidos en México.

Muestra	Método	LDD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LDC ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	R ²	AFM1 Rec. (%)	Referencia	
Leche	HPLC-FD	N/R		0.9990	96	Carvajal <i>et al.</i> 2003a	
			N/R			Córdova-Izquierdo <i>et al.</i> 2007	
		N/R		0.9982	91	Pérez <i>et al.</i> 2008	
			N/R			Reyes Velázquez <i>et al.</i> 2009	
			N/R			Gutiérrez <i>et al.</i> 2013a	
			N/R			Gutiérrez <i>et al.</i> 2013b	
			N/R	0.9866	N/R	Espinosa Montesinos 2019	
				N/R		Reyes Velázquez <i>et al.</i> 2009	
		ELISA	0.005		N/R		Landeros <i>et al.</i> 2012
				N/R		Hernández-Falcón <i>et al.</i> 2017	
		0.005	0.080	N/R	100	Quevedo-Garza <i>et al.</i> 2018	
Queso	HPLC-FD	0.221	0.560	0.9982	83	Urbán <i>et al.</i> 2009	
		0.010	N/R	0.9834	95	Hernández-Camarillo <i>et al.</i> 2016a	
		0.010	N/R	0.9834	95	Carvajal-Moreno <i>et al.</i> 2019	

LDD: límite de detección; LDC: límite de cuantificación; R²: coeficiente de correlación; AFM1 Rec.: AFM1 recuperada; N/R: no reportado.



7.4.2 Presencia de AFM1 en leche producida en México

De acuerdo con los estudios incluidos en esta revisión, se analizaron dos tipos de leche: leche cruda e industrializada. El primero no fue sometido a ningún tratamiento térmico (Córdova-Izquierdo *et al.*, 2007; Espinosa Montesinos, 2019; Gutiérrez *et al.*, 2013a, 2013b; Hernández-Falcón *et al.*, 2018; Reyes Velázquez *et al.*, 2009) mientras que el segundo se sometió al proceso de ultrapasteurización (UHT) o pasteurización (Carvajal *et al.*, 2003; Quevedo-Garza *et al.*, 2018). En dos de los trabajos realizaron el estudio tanto en leche cruda como en industrializada (Landeros *et al.*, 2012; Pérez *et al.*, 2008).

Por otro lado, se reportan dos procesos de producción de leche: convencional y orgánica. El convencional, es aquel que, durante la producción del forraje utilizado para alimentar a las vacas, se emplearon pesticidas y/o fertilizantes sintéticos para su cuidado, además algunos productores combinan el forraje con alimentos balanceados a los cuales se le agregan ciertos aditivos químicos como colorantes, conservadores, entre otros. En contraste, en el proceso orgánico los forrajes utilizados para el ganado deben ser cultivados y procesados con métodos naturales, es decir, no se utilizan productos sintetizados químicamente o aguas residuales para el riego. En cuanto a los alimentos balanceados no deben contener ningún aditivo o conservador artificial. Además, a los animales no se les debe administrar hormonas, anabólicos o antibióticos (FAO & WHO, 2007).

Por otro lado, en el 2006 en México se derogó la NOM-037-FITO-1995 en la cual se establecían las especificaciones para la producción y procesamiento de productos agrícolas orgánicos para ser sustituida por la Ley de Productos Orgánicos (2006) promulgada por el gobierno de México. Sin embargo, en esta Ley no se contempla un reglamento o especificaciones para su producción o procesamiento, por lo cual hay un vacío legal en la regulación de los productos orgánicos en México.

Finalmente, la Cámara Nacional de Industriales de la Leche (CANILEC) reporta que los principales estados productores de leche en México son Jalisco, Coahuila, Durango y Chihuahua con una participación del 20.3, 11.3, 10.2 y 9.4% de la producción nacional, respectivamente (CANILEC, 2019). Sin embargo, en los trabajos revisados las muestras de leche cruda fueron obtenidas en los estados de Chiapas, Ciudad de México, Estado de México, Hidalgo, Jalisco y Veracruz. Además, en el caso de la leche industrializada, los autores solo reportan el estado donde adquirieron las muestras de leche de las principales marcas consumidas en cada región. Por otro lado, únicamente Carvajal *et al.* (2003a)



realizaron la identificación con base en el estado donde son producidas, reportando a los estados de Aguascalientes, Chihuahua, Coahuila, Durango, Hidalgo, Jalisco y Querétaro. Por lo tanto, es posible que el análisis de los artículos no sea representativo del país, dado que los estados más productores de leche no están incluidos en las investigaciones encontradas; por lo que esto podría ser un análisis de la situación en los estados estudiados.

7.4.2.1 Presencia de AFM1 en leche cruda

Como se muestra en el Cuadro 7-3, se detectó AFM1 en muestras de leche cruda. La leche orgánica producida en Hidalgo y Chiapas contenía niveles elevados de esta micotoxina, observando que en el primer estado reportaron concentraciones de hasta 15 veces superior al límite máximo permitido en la norma mexicana.

Cabe destacar que se ha observado que la presencia de aflatoxinas en la leche se ve afectada por la temporada de producción. En las muestras de leche recolectadas en Chiapas durante la temporada de lluvias (junio-noviembre) contenían AFM1 en concentraciones dentro de los límites establecidos en la norma, mientras que la leche producida durante la temporada seca (mayo-junio) mostró niveles de AFM1 10 veces superiores al permitido.



Cuadro 7-3. Contenido de AFM1 en leche cruda producida en diferentes regiones de México.

Estado	Proceso de Producción	Temporada de muestreo	AFM1 ($\mu\text{g kg}^{-1}$)		Referencia
			Min.	Máx.	
Hidalgo	Orgánica	Mensual durante el año	0.230	7.660	Gutiérrez <i>et al.</i> 2013a
Chiapas		Mayo-junio	1.460	5.080	Gutiérrez <i>et al.</i> 2013b
	Junio-noviembre	0.020	0.450		
Hidalgo	Convencional	N/R	0.167	0.332	Córdova-Izquierdo <i>et al.</i> 2007
Ciudad de México, Estado de México		Octubre-febrero	0.400	92.300	Pérez <i>et al.</i> 2008
Jalisco	Convencional	Septiembre-octubre	0.014	0.065	Reyes Velázquez <i>et al.</i> 2009
			0.015	0.055	
			0.006	0.030	
			0.017	0.061	
			0.006	0.009	
			0.009	0.012	
			0.006	0.027	
Jalisco	Enero-mayo	0.005	0.100	Landeros <i>et al.</i> 2012	
Veracruz	Mensual durante el año	0.030	3.810	Gutiérrez <i>et al.</i> 2013a	
Hidalgo	N/R	N/R	0.012	Hernández-Falcón <i>et al.</i> 2017	
Hidalgo	N/R	2.280	6.900	Espinosa Montesinos 2019	

N/R: no reportado



Con base en estos resultados, Gutiérrez *et al.* (2013b) consideraron que durante la temporada seca al no tener la disponibilidad de forraje (disponible en temporada de lluvias) los animales consumen alimentos balanceados, lo que podría explicar la mayor concentración de la micotoxina en esta temporada. Esto coincide con lo descrito por algunos autores que reportan que la mayor concentración de AFM1 en la leche es en la temporada de invierno, debido a que las vacas son alimentadas con concentrados alimenticios en comparación con los forrajes que pueden obtener en verano (Bilandžić *et al.*, 2014; Fallah *et al.*, 2011; Khaneghahi Abyaneh *et al.*, 2020; Ruangwises & Ruangwises, 2009).

Por otra parte, en los trabajos que analizaron leche convencional (Cuadro 7-3), se observa que las muestras del estado de Jalisco y dos de Hidalgo, cumplen con lo establecido en la norma mexicana. En comparación con las de la Ciudad de México, Estado de México, Veracruz y una de Hidalgo, en las cuales se cuantificaron concentraciones de AFM1 superiores a lo permitido en México. Es importante mencionar que en el trabajo realizado por Reyes-Velázquez *et al.* (2009), el muestreo se realizó en temporada de lluvias, lo que explicaría la baja concentración de AFM1 en comparación con los resultados de Pérez *et al.* (2008) que determinaron una mayor concentración en el muestreo durante el invierno, destacando que ambos autores utilizaron el método de HPLC-FD para cuantificar la micotoxina. Estos datos están en concordancia con lo mencionado anteriormente en cuanto a la influencia de la estacionalidad la presencia de AFM1 en la leche.

A partir de los resultados observados en el Cuadro 7-3 donde hubo muestras de leche que cumplieron con la normativa mexicana en los dos procesos de producción, se puede concluir que no solo los niveles de AFM1 en la leche dependen de la temporada de producción, sino que también otros factores como la región y el proceso de producción son factores que influyen en contenido de la micotoxina en la leche. También es importante tener en cuenta el nivel de contaminación de los piensos y la raza de ganado (Van Eijkeren *et al.* 2006). Sin embargo, este último no puede ser un factor determinante de la incidencia de AFM1 en la leche en México ya que solo hay dos razas productoras la Holstein Fresian y Pardo Suiza Americana (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, 2015).

Finalmente, es fundamental seleccionar un método analítico adecuado para cuantificar AFM1. En la Cuadro 7-2 comparamos los métodos que se utilizaron para determinar las concentraciones de AFM1 (Cuadro 7-3). Por ejemplo, tanto Gutiérrez *et al.*



(2013a) y Montesinos Espinosa (2019) analizaron muestras de leche del estado de Hidalgo mediante HPLC-FD y obtuvieron valores similares de los niveles de contaminación de AFM1. Asimismo, Reyes-Velázquez *et al.* (2009) y Landeros *et al.* (2012) emplearon ELISA para evaluar la incidencia de aflatoxinas en la leche producida en el estado de Jalisco y coincidieron en las concentraciones reportadas. Cabe destacar que Reyes-Velázquez *et al.* (2009) verificaron sus resultados de ELISA con HPLC-FD. Con base a esto podemos asumir que ambos métodos demostraron ser adecuados y precisos. Esta hipótesis fue consistente con otros reportes en donde no encontraron diferencias en la precisión para el análisis cuantitativo de AFM1 usando HPLC-FD y ELISA (Kos *et al.*, 2016; Omar *et al.*, 2020; Shaneshin *et al.*, 2018). Además, Salari *et al.* (2020) han observado que el método de ELISA es el más utilizado por ser más económico y porque se pueden analizar un mayor número de muestras en un menor tiempo. Por otro lado, Khaneghahi Abyaneh *et al.* (2020) han señalado que con el HPLC-FD se pueden determinar concentraciones por debajo de las determinadas con ELISA. Además, se pueden obtener falsos positivos en este segundo método. En el caso de la presente revisión bibliográfica, las concentraciones reportadas de AFM1 cuantificadas con ELISA se determinaron en niveles más bajos que los obtenidos por HPLC-FD y, por lo tanto, los falsos positivos parecen no ser un problema en los artículos seleccionados.

7.4.2.2 Presencia de AFM1 en la leche industrializada

Aunque la producción de leche industrializada está sujeta a una estricta regulación, las muestras analizadas dieron positivo a la presencia de AFM1. El Cuadro 7-4 muestra los valores de las concentraciones de AFM1 determinadas para las principales marcas de leche consumidas en México que fueron compradas en cierta región. Carvajal *et al.* (2003a) identificaron los estados donde se produjeron las diferentes marcas de leche que analizaron. Reportando que el 10% de las muestras excedieron el límite establecido por la norma mexicana. Adicionalmente, observaron concentraciones más bajas de AFM1 en la leche UHT en comparación con la pasteurizada, por lo que es posible que este tipo de tratamiento térmico afecte la concentración de la micotoxina en la leche. Asimismo, de acuerdo con lo reportado por Deveci (2007) al pasteurizar leche contaminada con AFM1 con dos concentraciones diferentes de 11.95 y 4.91 $\mu\text{g kg}^{-1}$ durante 2 min a 72°C disminuyó el contenido de micotoxinas en un 9.1 y 12.4%, respectivamente. Por otro lado, en un estudio realizado por Bakirci (2001), se observó una disminución del 7.62% del nivel de AFM1 en la leche después de la pasteurización. Sin embargo, mencionan que esta

reducción no es significativa, concluyendo que este tratamiento térmico no es efectivo para reducir la concentración de la micotoxina.

Al comparar la incidencia de AFM1 en muestras de leche producidas en diferentes regiones, Pérez *et al.* (2008) reportaron que el 33.3 y 55% de las muestras de leche orgánica y convencional, respectivamente, producidas en la Ciudad de México estaban contaminadas con la micotoxina en concentraciones superiores al límite máximo establecido. Asimismo, los niveles de AFM1 en el 47 y 28.5% de las muestras de leche producidas en Nuevo León y Jalisco, respectivamente, estuvieron por encima de los 0.5 $\mu\text{g AFM1 kg}^{-1}$.

Cuadro 7-4. Contenido de AFM1 en las principales marcas de leche consumidas en México.

Estado	Proceso térmico	AFM1 ($\mu\text{g kg}^{-1}$)		Referencia
		Min.	Máx.	
Hidalgo ^a	UHT	0	4.78	
Aguascalientes ^a	UHT	0	3.95	
Querétaro, Jalisco y Chihuahua ^a	Pasteurizada	0	5.87	
	UHT	0	3.95	
Hidalgo ^a	Pasteurizada	0	8.35	Carvajal <i>et al.</i> 2003a
	UHT	0	6.52	
Hidalgo ^a	Pasteurizada	0	6.83	
	UHT	0	2.98	
Durango y Coahuila ^a	Pasteurizada	0	4.05	
	UHT	0	7.02	
Ciudad de México ^b	UHT	0.2	76.6	Pérez <i>et al.</i> 2008
	UHT-orgánica	0.2	88.6	
Jalisco ^b	Pasteurizada	0.005	0.637	Landeros <i>et al.</i> 2012
Nuevo León ^b	UHT o Pasteurizada	0.1	1.27	Quevedo-Garza <i>et al.</i> 2018

a: Región de producción; b: Región de muestreo; UHT: ultra pasteurizada



De los datos recopilados se observa claramente que la contaminación de la leche con AFM1 requiere legislaciones más eficientes en México. Como se observa en Cuadro 7-4, las muestras de leche de las principales marcas disponibles en la Ciudad de México dieron positivo para la presencia de esta micotoxina en concentraciones que excedían hasta 100 veces el límite establecido de $0.5 \mu\text{g AFM1 kg}^{-1}$. En otro estudio, Carvajal *et al.* (2003a) determinaron que la AFM1 estaba presente en algunas muestras de leche en concentraciones de casi 10 veces superiores al límite máximo permitido.

Finalmente, con base en las publicaciones analizadas, es notable que hay un riesgo para la salud de la población mexicana, en particular de los estados en donde se realizaron los análisis, ya que en los dos tipos de leche: cruda e industrializada se detectó la presencia de AFM1. Con lo que se puede concluir que es necesario, evaluar la norma actual y así tener una regulación más estricta para el contenido de la micotoxina.

7.4.3 Presencia de AFM1 en quesos

De acuerdo con fuentes oficiales, en 2018 se produjeron en México 410 mil toneladas de diferentes tipos de queso (SIAP, 2019). En este mismo año en el reporte del panorama agroalimentario (FIRA, 2019) se estimó que el consumo per cápita fue de 4.3 kg de queso con base a los datos proporcionados por el Consejo Nacional de Población. Asimismo, se ha reportado que el 80% del queso adquirido en México es de tipo fresco, siendo el queso tipo panela de los más consumidos (Jiménez-Guzmán *et al.*, 2009). Esta tendencia también fue encontrada en un estudio realizado en el estado de Veracruz, donde se reportó que los quesos más comprados son el tipo fresco y el Oaxaca con el 90 y 75%, respectivamente (Hernández-Camarillo *et al.*, 2016b).

Dentro de las investigaciones que analizaron muestras de queso, está el realizado por Hernández-Camarillo *et al.* (2016a) que evaluaron el contenido de AFM1 en queso tipo Oaxaca artesanal, es decir, su producción es a pequeña escala y su elaboración es principalmente con insumos locales y a mano, por lo que no se requiere de maquinaria especializada (González-Córdova *et al.*, 2016). Las muestras las adquirieron en diferentes mercados de la Ciudad de Veracruz. Como se puede ver en la Figura 7-3, de las 30 muestras analizadas en 20 no se detectó la presencia de la micotoxina, sin embargo, en 8 se cuantificaron concentraciones de AFM1 superiores a los $0.5 \mu\text{g kg}^{-1}$ que es el límite establecido en la norma para leche. Observando que los niveles determinados van desde 0.72 a $41.8 \mu\text{g AFM1 kg}^{-1}$.

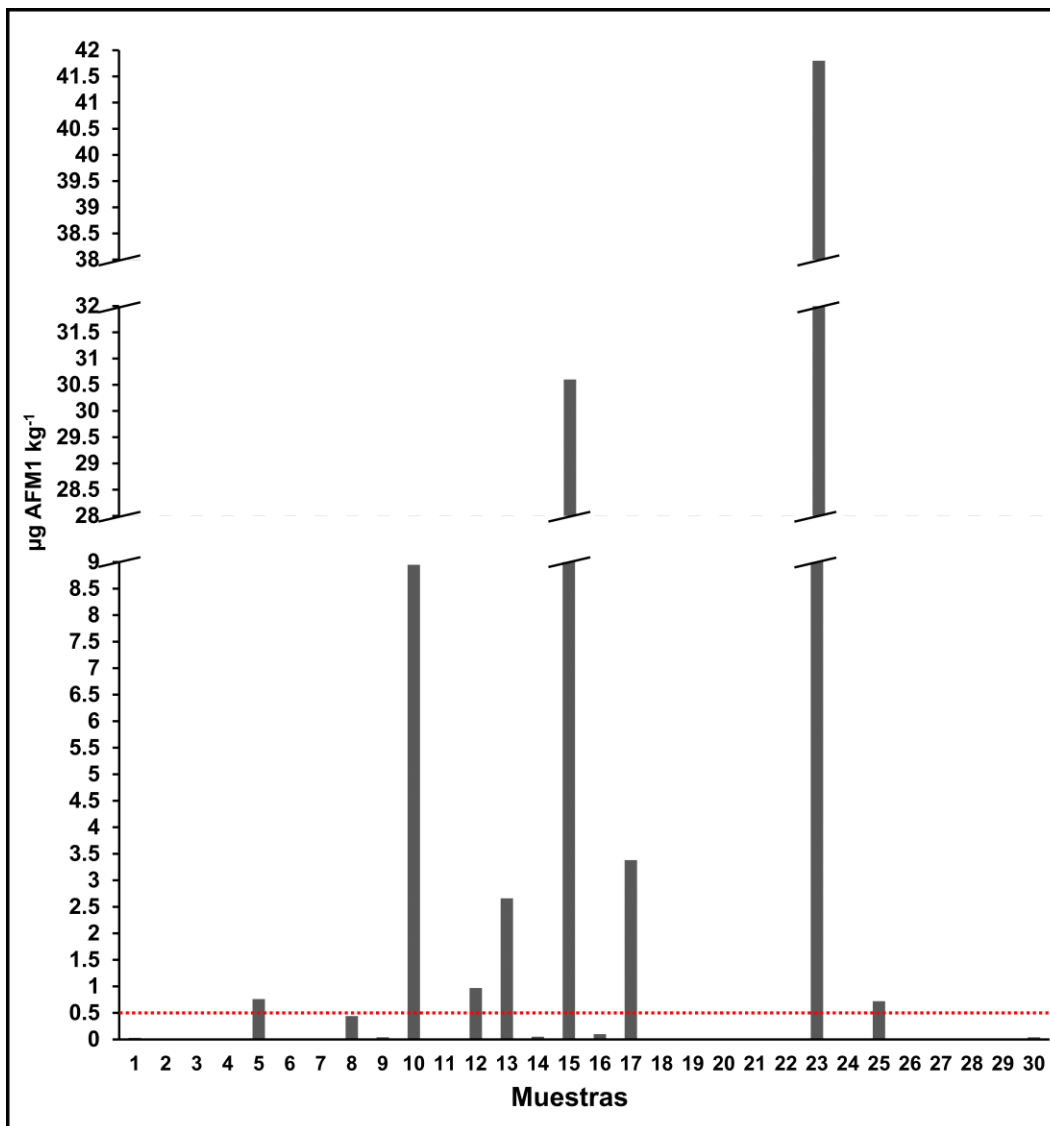


Figura 7-3. Concentraciones de AFM1 en muestras de queso tipo Oaxaca de producción artesanal distribuidos en la Ciudad de Veracruz. Línea roja indica el límite máximo establecido en la norma NOM-243-SSA1-2010. Datos de Hernández-Camarillo *et al.* (2016a).

Adicionalmente, Carvajal-Moreno *et al.* (2019) evaluaron 30 muestras de queso tipo Oaxaca de producción industrial, adquiriendo las muestras en diferentes supermercados de la Ciudad de México. Como se puede ver en la Figura 7-4, se detectó AFM1 en 17 muestras con concentraciones por encima del límite de establecido para leche, con un intervalo de 1.2 a 5 µg AFM1 kg⁻¹.

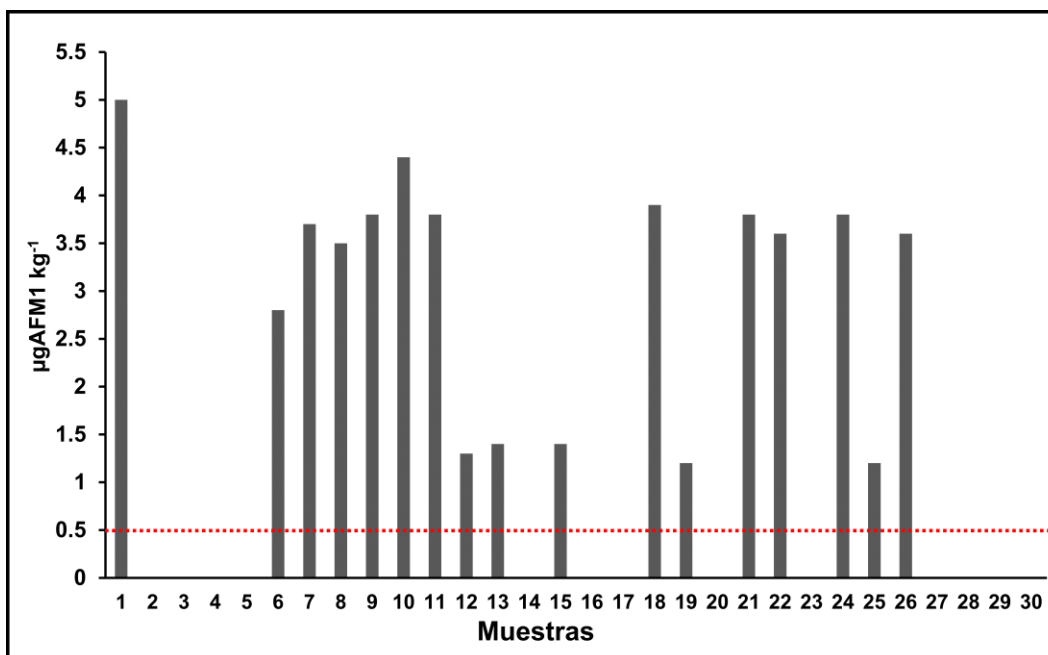


Figura 7-4. Concentraciones de AFM1 en muestras de queso tipo Oaxaca de producción industrial distribuidos en la Ciudad de México. Línea roja indica el límite máximo establecido en la norma NOM-243-SSA1-2010. Datos de Carvajal-Moreno *et al.* (2019).

Como se puede observar en los resultados publicados al analizar queso tipo Oaxaca, los niveles de AFM1 cuantificados en el queso de producción artesanal fueron más altos en comparación con el industrial, esto puede ser debido a que en el primer proceso se haya empleado leche cruda la cual no fue analizada, así como no cumplir con las normas de buenas prácticas de manufactura e higiene como debe ser el proceso industrial. Sin embargo, como se puede observar en la Figura 7-4, el queso industrial presentó un mayor número de muestras positivas en comparación con el artesanal (Figura 7-3). Lo que nos indica que a pesar de que en este tipo de proceso se deben cumplir con más regulaciones, aún hace falta la normativa en el contenido de AFM1 en este tipo de producto.

Por otra parte, Urbán *et al.* (2009) evaluaron el contenido de AFM1 en queso fresco tipo panela producido por 9 industrias queseras de diferentes regiones de México y uno elaborado artesanalmente en la Ciudad de México. Como se puede ver en la Figura 7-5, las concentraciones reportadas están en un intervalo de 0.19 hasta 1.22 µg AFM1 kg⁻¹, observando que el 80% de las muestras están por encima del límite establecido para leche. Únicamente las muestras obtenidas de Baja California y Guanajuato cumplieron con la norma.

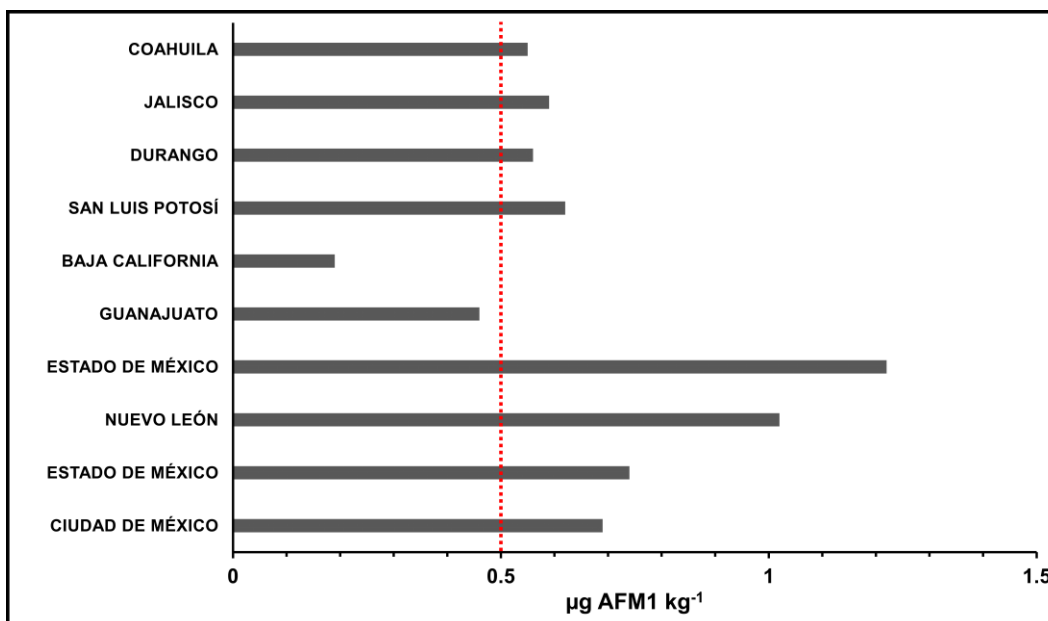


Figura 7-5. Concentraciones de AFM1 en muestras de queso tipo panela de industrias queseras de diferentes regiones de México. Línea roja indica el límite máximo establecido en la norma NOM-243-SSA1-2010. Datos de Urbán *et al.* (2009).

Por último, es importante destacar los factores que contribuyen a la contaminación por AFM1 en diferentes tipos de queso, como el origen de la leche, el proceso de producción y el tipo de queso (Campagnollo *et al.*, 2016). Por ejemplo, se evaluó la distribución de AFM1 durante la producción de Gran Padano, un tipo de queso madurado (Manetta *et al.*, 2009) y queso Feta (Motawee & McMahon, 2009). Los estudios mostraron que la mayor concentración de esta micotoxina se encontró en la cuajada. Sin embargo, otros reportes demostraron la presencia de AFM1 en el suero de leche durante el proceso de producción de queso madurado (López *et al.*, 2001) y queso fresco (Chavarría *et al.*, 2017).

También, se han realizado estudios para evaluar la capacidad de la AFM1 para formar complejos con las diferentes proteínas de la leche (Chavarría *et al.*, 2017; Jiménez-Pérez *et al.*, 2020). Con base en los resultados de estos artículos, es posible explicar la variabilidad en las concentraciones de la micotoxina en los dos tipos de queso. Por lo cual estas investigaciones pueden servir a la industria láctea en la búsqueda de alternativas más eficientes para la eliminación o reducción de AFM1 en sus productos.

En general, los datos disponibles sobre la contaminación por AFM1 en queso tipo oaxaca y panela demostraron concentraciones por encima del límite máximo de 0.5 µg AFM1 kg⁻¹. Los resultados implican que la exposición a esta micotoxina representa un

riesgo para la salud pública ya que estos dos tipos de queso son los más consumidos en México. Se recomienda encarecidamente abordar este problema mediante la implementación de un nuevo reglamento sobre los límites de AFB1 en derivados de la leche como el queso.

7.4.4 Presencia de otros derivados hidroxilados de la AFB1 en Leche

Como se observa en la Figura 7-6, algunos autores han reportado que durante la metabolización de la AFB1 por la CYP en el hígado de la vaca también se puede producir la aflatoxina P1 (AFP1) (Hayes *et al.*, 1977; Niu *et al.*, 2008). Asimismo, por acción de la NADPH reductasa la AFB1 puede reducirse en su metabolito aflatoxicol (AFL) (Karabulut *et al.*, 2014; Murcia & Díaz, 2020). Además, se ha reportado que estos metabolitos presentan una menor toxicidad, sin embargo, siguen siendo posibles agentes carcinogénicos. Por ejemplo, se ha descrito que el AFL es hasta 18 veces menos tóxico (Karabulut *et al.*, 2014).

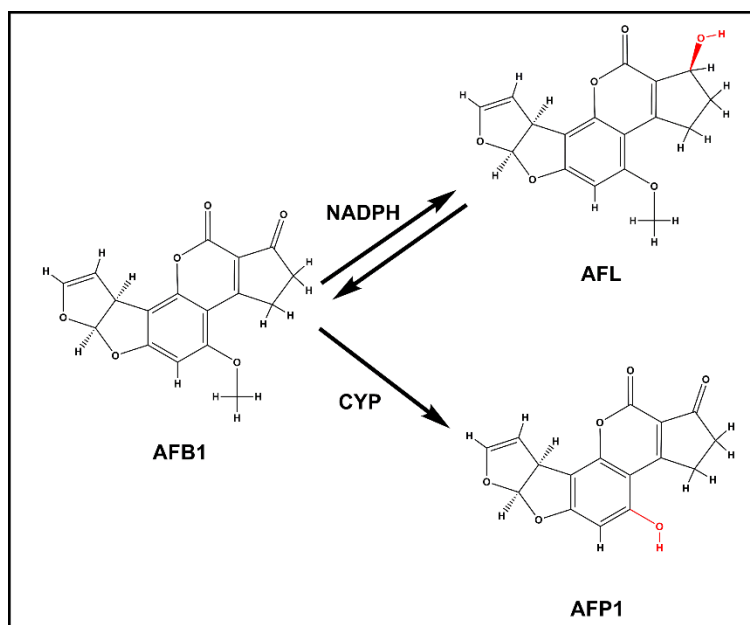


Figura 7-6. Derivados de la AFB1 producidos en el hígado de las vacas. Estructuras obtenidas de la base de datos PubChem.

La mayoría de los estudios se centraron en el análisis del contenido de AFM1 debido a su elevada concentración en la leche. Carvajal *et al.* (2003b) también evaluaron la presencia de AFB1 y AFL en las siete principales marcas de leche consumidas en México que fueron identificadas por la región de producción. Como se ve en el Cuadro 7-5, las

concentraciones de AFB1 en muestras de leche se detectaron en el rango de 0.01 a 0.42 $\mu\text{g kg}^{-1}$, mientras que los niveles de AFL excedieron los 0.5 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Con base en estos resultados, se puede concluir que dos metabolitos de AFB1 se excretan a la leche, conocidos como AFM1 y AFL. Además, Gonçalves *et al.* (2018) y Scaglioni *et al.* (2014) también reportaron la presencia de AFB1 en la leche.

Cuadro 7-5. Contenido de AFB1 y AFL en leche industrializada producida en diferentes regiones de México. Datos de Carvajal *et al.* (2003b).

Estado	Proceso térmico	AFB1 ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	AFL ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Querétaro,	Pasteurizada	0.04	0.75
Jalisco y Chihuahua	UHT	0.34	10.04
Hidalgo	UHT	0.01	12.40
Hidalgo	Pasteurizada	0.01	4.49
	UHT	0.03	6.27
Hidalgo	Pasteurizada	N/D	N/D
	UHT	0.01	0.63
Durango y Chihuahua	Pasteurizada	0.01	3.60
	UHT	0.42	7.16
Aguascalientes	UHT	0.02	0.51

UHT: ultra pasteurizada; N/D: no detectado

Como se ha reportado, uno de los factores de la presencia de AFM1 en la leche, es la ingesta de alimento contaminado con AFB1 por las vacas. Además, se ha informado que hasta el 6.2% es transformada en AFM1, dejando la posibilidad de que la AFB1 restante, pueda ser metabolizada en otro derivado como el AFL o la AFP1, así como no sufrir cambios y también ser excretada en la leche. Al ver estos resultados publicados, es evidente que



hace falta ampliar este tipo de estudios, para así poder llegar a una conclusión de si es necesario ampliar la normativa en el contenido de aflatoxinas en la leche.

7.4.5 Presencia de otros derivados hidroxilados de AFB1 en queso

En el contexto de la incidencia de aflatoxinas en la leche, es muy posible que los derivados de la leche, como el queso, también estén contaminados con diferentes micotoxinas. Esta hipótesis se apoya en los estudios realizados por Carvajal-Moreno *et al.* (2019) y Vargas-Ortiz *et al.* (2017) quienes evaluaron la coexistencia de las cuatro aflatoxinas principales: AFB1, AFB2, AFG1 y AFG2, junto con los metabolitos hidroxilados de la AFB1: AFM1, AFP1, AFL y de la AFB2: AFM2 en muestras de queso tipo Oaxaca de producción industrial y artesanal respectivamente. Como se ve en la Figura 7-7, el AFL fue el metabolito detectado con las concentraciones más altas en los quesos fabricados por ambos procesos. La presencia de otros derivados hidroxilados en las muestras de queso indica que los contaminantes de aflatoxinas excretados a la leche no pueden limitarse a AFM1. Cabe destacar que el queso artesanal se caracterizó por presentar los niveles más elevados de AFB1 en comparación con su homólogo industrial. Esto probablemente se debe a que durante la elaboración se adicionan almidones modificados, como el de maíz (probablemente contaminados con aflatoxinas) para aumentar los rendimientos (Vargas-Ortiz *et al.*, 2017).

Con base en la evidencia y los datos obtenidos de las publicaciones sobre el contenido de otras aflatoxinas en el queso, es de suma importancia tener una normativa que regule la presencia de estas micotoxinas, dado que son productos altamente consumidos en México.

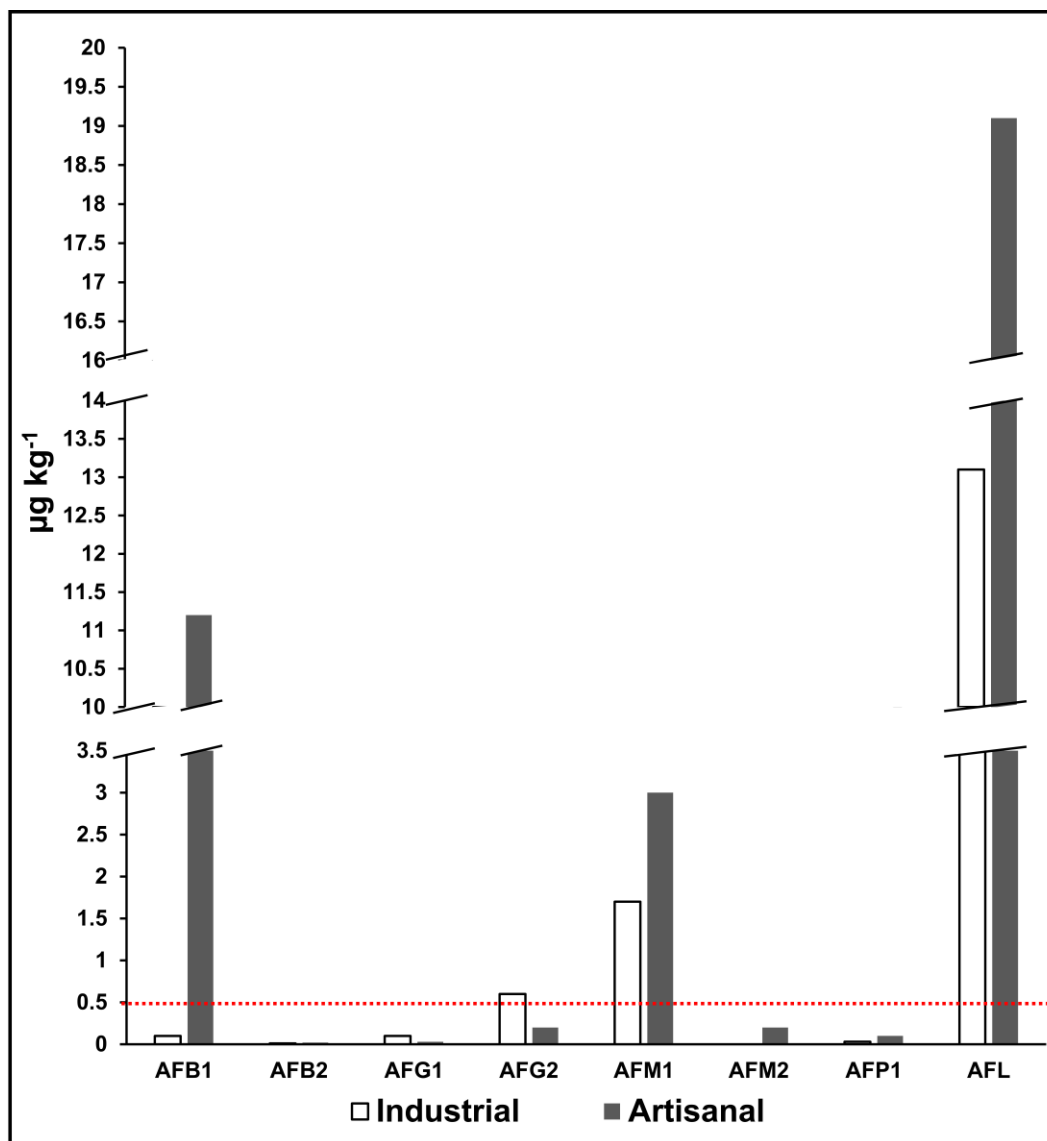


Figura 7-7. Contenido de aflatoxinas y sus derivados hidroxilados en queso tipo Oaxaca de producción industrial (Carvajal-Moreno *et al.*, 2019) y artesanal (Vargas-Ortiz *et al.*, 2017) distribuidos en la Ciudad de México y Veracruz, respectivamente. Línea roja indica el límite máximo de AFM1 establecido en la norma NOM-243-SSA1-2010 para leche.

7.4.6 Presencia de aflatoxinas en el alimento del ganado

Diversos grupos de investigación han reportado que la principal fuente de aflatoxinas son los cereales y algunos forrajes que se utilizan para formular alimentos destinados a vacas productoras de leche (Bani Ismail *et al.*, 2020; Borutova *et al.*, 2012; Bryden, 2012; Huerta-Treviño *et al.*, 2016). Por lo tanto, el contenido total de aflatoxinas (AFT): AFB1,



AFB2, AFG1 y AFG2, está regulado en México por la norma NOM-188-SSA1-2002 estableciendo un límite máximo de 20 $\mu\text{g AFT kg}^{-1}$ en el alimento del ganado.

En el trabajo de Reyes Velázquez *et al.* (2009) analizaron el contenido de AFT en 40 raciones de alimento balanceado para bovinos, reportando que el 92.5% presentaron contaminación en un intervalo entre los 4.82-24.89 $\mu\text{g AFT kg}^{-1}$, aunque solo el 9.3% de las muestras están por encima de la norma. Posteriormente, estos autores determinaron el contenido de AFM1 en la leche producida por las vacas alimentadas con estas raciones (Cuadro 7-3, sección 7.4.2.1), observando que en el 80% de las muestras se detectó la presencia de la micotoxina. Estos resultados parecen confirmar que uno de los factores en la incidencia de AFM1 en la leche es la contaminación del alimento con aflatoxinas. Por otra parte, Huerta-Treviño *et al.* (2016) evaluaron la incidencia de AFT en diferentes forrajes, determinando concentraciones promedio de 2.77, 0.5 y 0.36 $\mu\text{g AFT kg}^{-1}$ en alfalfa (*Medicago sativa L.*), zacate (*Cenchrus ciliaris L.*) y sorgo (*Sorghum Bicolor L. Moench*), respectivamente.

Por otro lado, se han buscado estrategias para disminuir la concentración de las micotoxinas en los alimentos para el ganado, dentro de las que se encuentran medidas preventivas tanto antes como después de la cosecha. Sin embargo, esto no es suficiente para evitar la contaminación del alimento con los hongos productores de micotoxinas. Por lo cual, se han evaluado también la adición de absorbentes no-nutritivos al alimento, los cuales tienen la capacidad de unirse a las aflatoxinas y reducir la biodisponibilidad, evitando que sean metabolizadas en el hígado de los animales y ser excretadas en la leche (Marroquín-Cardona *et al.*, 2009; Rojo *et al.*, 2014; Vila-Donat *et al.*, 2018). Por ejemplo, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) aprobó el uso de bentonita en todas las especies animales, ya que está comprobado que disminuye la concentración de micotoxinas (Rychen *et al.*, 2017). Sin embargo, se han realizado estudios sobre efectos adversos del uso de este tipo de compuestos, encontrando que además de tener la capacidad de absorber las micotoxinas, también pueden unirse micronutrientes presentes en el alimento, por lo cual disminuye la calidad nutrimental de los mismos. Además, en algunos estudios se han demostrado incluso efectos citotóxicos, principalmente en aves y cerdos (Elliott *et al.*, 2020).

7.5 CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

La presente revisión recopiló y comparó los datos de investigación disponibles sobre la presencia de AFM1 en la leche y los quesos producidos en México en los últimos veinte años. Se encontró que las muestras de leche cruda e industrializada estaban contaminadas con AFM1 en concentraciones que excedían el límite máximo establecido en la norma mexicana. La incidencia de esta micotoxina en la leche se vio afectada por la temporada de producción y la contaminación del alimento para el ganado con aflatoxinas. La detección y cuantificación de micotoxinas en la leche se realizó mediante los métodos de HPLC-FD y ELISA.

El análisis de los quesos se limitó a los resultados disponibles solo para los quesos tipo panela y Oaxaca. La concentración más alta de AFM1 se reportó para el queso artesanal tipo Oaxaca, mientras que los quesos producidos industrialmente mostraron la mayor incidencia de esta micotoxina. Además, se detectó AFM1 en la mayoría de las muestras de queso tipo panela en concentraciones superiores al límite oficial establecido para la leche. Este valor se utilizó como referencia dada la falta de una legislación sobre el contenido de AFM1 en el queso en México. El método de HPLC-FD fue el utilizado para cuantificar las micotoxinas en el queso.

Además, los reportes indicaron la presencia de otras aflatoxinas y sus metabolitos hidroxilados en la leche y los quesos producidos en México, lo que sugiere la contaminación de los alimentos que consume el ganado lechero.

En resumen, los resultados analizados demostraron claramente que la leche y sus derivados producidos en México presentaban alta incidencia de contaminación no solo con AFM1, sino también con otras aflatoxinas. Por lo tanto, es de suma importancia implementar una legislación más estricta con respecto a estas micotoxinas en la leche, sus derivados y la alimentación del ganado.

Dado que existe un número limitado de estudios sobre la incidencia de AFM1 en la leche y otros productos lácteos como el queso, es necesario realizar más investigaciones sobre este tema debido a su relevancia para la salud pública en México. En primer lugar, es fundamental estandarizar la metodología de muestreo de leche y queso. Por ejemplo, deberían establecerse normas relativas a la determinación del número de muestras junto con los límites de detección y cuantificación. El principal inconveniente de las publicaciones



analizadas en esta revisión fue el hecho de que solo unas pocas informaron parámetros de validación. Además, se recomienda establecer un período de muestreo de un año para determinar la temporada de producción que se caracteriza por la menor incidencia de micotoxinas. Asimismo, se deben mejorar las medidas de control sobre la calidad de la alimentación del ganado, ya que se ha demostrado que los forrajes contaminados son una fuente principal de aflatoxinas, las cuales pueden ser metabolizadas y excretadas a la leche de vaca.

También es necesario ampliar el alcance de los estudios de AFM1 hacia otros tipos de quesos comercializados en México para recabar información completa sobre ese tema. Se recomienda introducir medidas reglamentarias sobre la contaminación con la micotoxina en otros tipos de queso. Finalmente, es importante ampliar la investigación hacia la incidencia de otras aflatoxinas en la leche y sus derivados ya que su presencia también ha sido considerada un riesgo para la salud humana.

7.6 BIBLIOGRAFÍA

Bakirci, I., 2001. A study on the occurrence of aflatoxin M 1 in milk and milk products produced in Van province of Turkey. *Food Control* 12: 1–5.

Bani Ismail, Z., Al-Nabulsi, F., Abu-Basha, E. and Hananeh, W., 2020. Occurrence of on-farm risk factors and health effects of mycotoxins in dairy farms in Jordan. *Tropical Animal Health and Production Tropical Animal Health and Production*, 52: 2371–2377.

Benkerroum, N., 2020. Aflatoxins: Producing-molds, structure, health issues and incidence in southeast asian and sub-saharan african countries. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 17, doi:10.3390/ijerph17041215.

Bhat, R., Rai, V. and Karim, A., 2010. Mycotoxins in food and feed: Present status and future concerns. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 9: 57–81.

Bilandžić, N., Božić, D., Dokić, M., Sedak, M., Kolanović, B., Varenina, I., Tanković, S. and Cvetnić, Ž., 2014. Seasonal effect on aflatoxin M1 contamination in raw and UHT milk from Croatia. *Food Control* 40: 260–264.



Borutova, R., Aragon, Y., Nährer, K. and Berthiller, F., 2012. Co-occurrence and statistical correlations between mycotoxins in feedstuffs collected in the Asia-Oceania in 2010. *Animal Feed Science and Technology Elsevier B.V.*, 178: 190–197.

Bryden, W., 2012. Mycotoxin contamination of the feed supply chain: Implications for animal productivity and feed security. *Animal Feed Science and Technology Elsevier B.V.*, 173: 134–158.

Cámara Nacional de Industriales de la Leche, (CANILEC), 2019. Estadística del sector lácteo 2010-2018. Available at: [https://www.canilec.org.mx/estadisticas lacteos 2019.pdf](https://www.canilec.org.mx/estadisticas_lacteos_2019.pdf).

Campagnollo, F., Ganev, K., Mousavi, A., Portela, B., Cruz, A., Granato, D., Corassin, C., Augusto, C., Oliveira, F. and Sant, A., 2016. The occurrence and effect of unit operations for dairy products processing on the fate of aflatoxin M1: A review. *Food Control* 68: 310–329.

Carvajal-Moreno, M., Vargas-Ortiz, M., Hernández-Camarillo, E., Ruiz-Velasco, S. and Rojo-Callejas, F., 2019. Presence of unreported carcinogens, aflatoxins, and their hydroxylated metabolites, in industrialized Oaxaca cheese from Mexico City. *Food and Chemical Toxicology Elsevier*, 124: 128–138.

Carvajal, M., Bolaños, A., Rojo, F. and Méndez, I., 2003. Aflatoxin M1 in pasteurized and ultrapasteurized milk with different fat content in Mexico. *Journal of Food Protection* 66: 1885–1892.

Chavarría, G., Molina, A., Leiva, A., Méndez, G., Wong-González, E., Cortés-Muñoz, M., Rodríguez, C. and Granados-Chinchilla, F., 2017. Distribution, stability, and protein interactions of aflatoxin M1 in fresh cheese. *Food Control* 73: 581–586.

Córdova-Izquierdo, A., Saltijeral Oaxaca, J., Ruiz Lang, G., Cortés Suárez, S., Xolalpa Campos, V., Peña Betancourt, S., Córdova-Jiménez, M., Córdova-Jiménez, C., Pérez-Gutiérrez, J. and Guerra Liera, J., 2007. Identification of M1 aflatoxin in milk of collector tank. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 6: 194–197.



Deveci, O., 2007. Changes in the concentration of aflatoxin M1 during manufacture and storage of white pickled cheese. *Food Control* 18: 1103–1107.

Elliott, C., Connolly, L. and Kolawole, O., 2020. Potential adverse effects on animal health and performance caused by the addition of mineral adsorbents to feeds to reduce mycotoxin exposure. *Mycotoxin Research* 36: 115–126.

Espinosa Montesinos, D., 2019. Detoxificación de leche contaminada con aflatoxinas (Tesis de Especialidad). Universidad Autónoma Metropolitana, Ciudad de México, 40 pp.

Fallah, A., Rahnema, M., Jafari, T. and Saei-Dehkordi, S., 2011. Seasonal variation of aflatoxin M1 contamination in industrial and traditional Iranian dairy products. *Food Control Elsevier Ltd*, 22: 1653–1656.

Food and Agriculture Organization, (FAO) and World Health Organization, (WHO), 2007. *Organically Produced Foods*. Rome Available at: <http://www.fao.org/3/a1385e/a1385e00.pdf>. Accessed October 9, 2020.

Gonçalves, K., Sibaja, K., Feltrin, A., Remedi, R., de Oliveira Garcia, S. and Garda-Bufferon, J., 2018. Occurrence of aflatoxins B1 and M1 in milk powder and UHT consumed in the city of Assomada (Cape Verde Islands) and southern Brazil. *Food Control* 93: 260–264.

Gutiérrez, R., Rosell, P., Vega, S., Pérez, J., Ramírez, A. and Coronado, M., 2013a. Self and foreign substances in organic and conventional milk produced in the eastern region of Mexico. *Food and Nutrition Sciences* 4: 586–593.

Gutiérrez, R., Vega, S., Pérez, J., Ruiz, J., Yamazaki, A., Rivera, J., Urbán, G. and Escobar, A., 2013b. Evaluación de aflatoxina M1 en leche orgánica producida en Tecpatán, Chiapas, México. *Revista de Salud Animal* 35: 33–37.

Hayes, J., Polan, C. and Campbell, T., 1977. Bovine liver metabolism and tissue distribution of aflatoxin B1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 25: 1189–1193.

Hernández-Camarillo, E., Carvajal-Moreno, M., Robles-Olvera, V., Vargas-Ortiz, M., Salgado-Cervantes, M. and Rodríguez-Jiménez, G., 2016. Quantifying the levels of the mutagenic, carcinogenic hydroxylated aflatoxins (AFM1 and AFM2) in artisanal oaxaca-type



cheeses from the City of Veracruz, Mexico. *Journal of Microbial & Biochemical Technology* 8: 491–497.

Hernández-Falcón, T., Monter-Arciniega, A., Cruz-Cansino, N., Alanís-García, E., Rodríguez-Serrano, G., Castañeda-Ovando, A., García-Garibay, M., Ramírez-Moreno, E. and Jaimez-Ordaz, J., 2018. Effect of thermoultrasound on aflatoxin M1 levels, physicochemical and microbiological properties of milk during storage. *Ultrasonics Sonochemistry* 48: 396–403.

Huerta-Treviño, A., Dávila-Aviña, J., Sánchez, E., Heredia, N. and García, S., 2016. Occurrence of mycotoxins in alfalfa (*Medicago sativa* L.), sorghum [*Sorghum Bicolor* (L.) Moench], and grass (*Cenchrus ciliaris* L.) retailed in the state of Nuevo león, México. *Agrociencia* 50: 825–836.

International Agency for Research on Cancer, (IARC), 2012. Aflatoxins. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, 100F, pp. 225–248.

Iqbal, S., Asi, M. and Ariño, A., 2013. Aflatoxins. In: Maloy, S. and Hughes, K. (eds.) *Brenner's Encyclopedia of Genetics*. Academic Press, San Diego, pp. 43–47.

Jiménez-Guzmán, J., Flores-Nájera, A., Cruz-Guerrero, A. and García-Garibay, M., 2009. Use of an exopolysaccharide-producing strain of *Streptococcus thermophilus* in the manufacture of mexican panela cheese. *LWT - Food Science and Technology* 42: 1508–1512.

Jiménez-Pérez, C., Tello-Solís, S.R., Gómez-Castro, C.Z., Alatorre-Santamaría, S., Gómez-Ruiz, L., Rodríguez-Serrano, G., Cruz-Borbolla, J., García-Garibay, M. and Cruz-Guerrero, A., 2020. Spectroscopic studies and molecular modelling of the aflatoxin M1-bovine α -lactalbumin complex formation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 209: 111957.

Karabulut, S., Paytakov, G. and Leszczynski, J., 2014. Reduction of aflatoxin B1 to aflatoxicol: A comprehensive DFT study provides clues to its toxicity. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 94: 3134–3140.



Khaneghahi Abyaneh, H., Bahonar, A., Noori, N., Yazdanpanah, H. and Shojaee AliAbadi, M., 2020. The overall and variations of aflatoxin M1 contamination of milk in Iran: A systematic review and meta-analysis study. *Food Chemistry Elsevier*, 310: 9.

Kos, J., Hajnal, E., Jajić, I., Krstović, S., Mastilović, J., Šarić, B. and Jovanov, P., 2016. Comparison of ELISA, HPLC-FLD and HPLC-MS/MS methods for determination of aflatoxin M1 in natural contaminated milk samples. *Acta Chimica Slovenica* 63: 747–756.

Landeros, P., Noa, M., López, Y., González, D., Noa, E., Real, M., Juárez, C. and Medina, M., 2012. Niveles de aflatoxina M1 en leche cruda y pasteurizada comercializada en la zona metropolitana de Guadalajara, México. *Revista de Salud Animal* 34: 40–45.

López, C., Ramos, L., Ramadán, S., Bulacio, L. and Perez, J., 2001. Distribution of aflatoxin M1 in cheese obtained from milk artificially contaminated. *International Journal of Food Microbiology* 64: 211–215.

Manetta, A., Giammarco, M., Giuseppe, L., Fusaro, I., Gramenzi, A., Formigoni, A., Vignola, G. and Lambertini, L., 2009. Distribution of aflatoxin M1 during grana padano cheese production from naturally contaminated milk. *Food Chemistry Elsevier Ltd*, 113: 595–599.

Marroquín-Cardona, A., Deng, Y., Taylor, J., Hallmark, C., Johnson, N. and Phillips, T., 2009. In vitro and in vivo characterization of mycotoxin-binding additives used for animal feeds in Mexico. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment* 26: 733–743.

Min, L., Li, D., Tong, X., Sun, H., Chen, W., Wang, G., Zheng, N. and Wang, J., 2020. The challenges of global occurrence of aflatoxin M1 contamination and the reduction of aflatoxin M1 in milk over the past decade. *Food Control Elsevier*, 117: 107352.

Motawee, M. and McMahon, D., 2009. Fate of aflatoxin M1 during manufacture and storage of feta cheese. *Journal of Food Science* 74: 42–45.

Murcia, H. and Diaz, G., 2020. In vitro hepatic aflatoxicol production is related to a higher resistance to aflatoxin B1 in poultry. *Scientific Reports Springer US*, 10: 1–8.



Niu, G., Wen, Z., Rupasinghe, S., Ren, S., Berenbaum, M. and Schuler, M., 2008. Aflatoxin B1 detoxification by CYP321A1 in *Helicoverpa zea*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 69: 32–45.

Norma Oficial Mexicana, N.-188-S.-2002, 2002. Productos y servicios. Control de aflatoxinas en cereales para consumo humano y animal. Especificaciones sanitarias.

Norma Oficial Mexicana, N.-243-S.-2010, 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*.

Omar, S., Haddad, M. and Parisi, S., 2020. Validation of HPLC and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) techniques for detection and quantification of aflatoxins in different food samples. *Foods* 9. doi:10.3390/foods9050661.

Pérez, J., Gutiérrez, R., Vega, S., Díaz, G., Urbán, G., Coronado, M. and Escobar, A., 2008. Occurrence of aflatoxin M1 in raw, ultrapasteurized and organic milks produced and marketed in Mexico. *Revista de Salud Animal* 30: 103–109.

Quevedo-Garza, P., Amador-Espejo, G., Cantú-Martínez, P. and Trujillo-Mesa, J., 2018. Aflatoxin M1 occurrence in fluid milk commercialized in Monterrey, Mexico. *Journal of Food Safety* 38: 1–4.

Reyes Velázquez, W., Patricio Martínez, S., Isaías Espinosa, V., Nathal Vera, M., De Lucas Palacios, E. and Rojo, F., 2009. Aflatoxinas totales en raciones de bovinos y AFM1 en leche cruda obtenida en establos del estado de Jalisco, México. *Tecnica Pecuaria en Mexico* 47: 223–230.

Rojo, F., Patricio, S., Hugo, V. and Espinoza, I., 2014. Evaluación de adsorbentes para la reducción de aflatoxina M1 en leche de vacas alimentadas con dietas contaminadas artificialmente con AFB1. *Revista Mexicana de Ciencia Pecuaria* 5: 1–15.

Ruangwises, S. and Ruangwises, N., 2009. Occurrence of aflatoxin M1 in pasteurized milk of the school milk project in thailand. *Journal of Food Protection* 72: 1761–1763.



Salari, N., Kazeminia, M., Vaisi-Raygani, A., Jalali, R. and Mohammadi, M., 2020. Aflatoxin M1 in milk worldwide from 1988 to 2020: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Food Quality* 2020, doi:10.1155/2020/8862738.

Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, 2015. Ganadería bovina y sus derivados. Available at: <https://www.gob.mx/agricultura/es/articulos/ganaderia-bovina-y-sus-derivados>. Accessed October 9, 2020.

Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, (SIAP), 2019. Available at: <http://infosiap.siap.gob.mx/opt/boletlech/Boletín de Leche enero-marzo 2019.pdf>.

Shaneshin, M., Noursalehi, H., Mousavi, Z., Pourjabbar, Z. and Hajimahmoodi, M., 2018. Determination of Aflatoxin M1 in whey powder by HPLC and ELISA methods. *Journal of Food Safety and Hygiene* 4: 21–26.

Shrivastava, A. and Gupta, V., 2011. Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. *Chronicles of Young Scientists* 2: 21.

Shuib, N., Makahleh, A., Muhamad, S. and Saad, B., 2017. Natural occurrence of aflatoxin M1 in fresh cow milk and human milk in Penang, Malaysia. *Food Control* 73: 966–970.

Smith, J. and Groopman, J., 2018. Aflatoxins. *Encyclopedia of Cancer* 1–14.

Urbán, G., Pérez, J., Martínez, F., Salas, J., Díaz, G., Castro, G., Vega, S., Gutiérrez, R. and Escobar, A., 2009. Niveles de aflatoxina M1 en quesos frescos producidos en diferentes zonas de México. *Revista de Salud Animal* 31: 115–121.

Van Eijkeren, J., Bakker, M. and Zeilmaker, M., 2006. A simple steady-state model for carry-over of aflatoxins from feed to cow's milk. *Food Additives and Contaminants* 23: 833–838.

Vargas-Ortiz, M., Carvajal-Moreno, M., Hernández-Camarillo, E., Ruiz-Velasco, S. and Rojo-Callejas, F., 2017. Unreported aflatoxins and hydroxylate metabolites in artisanal Oaxaca cheese from Veracruz, Mexico. *Biochemistry & Analytical Biochemistry* 6, doi:10.4172/2161-1009.1000322.

Vaz, A., Cabral Silva, A., Rodrigues, P. and Venâncio, A., 2020. Detection methods for aflatoxin M1 in dairy products. *Microorganisms* 8: 1–16.



Vila-Donat, P., Marín, S., Sanchis, V. and Ramos, A., 2018. A review of the mycotoxin adsorbing agents, with an emphasis on their multi-binding capacity, for animal feed decontamination. *Food and Chemical Toxicology Elsevier*, 114: 246–259.

Womack, E., Sparks, D. and Brown, A., 2016. Aflatoxin M1 in milk and milk products: A short review. *World Mycotoxin Journal* 9: 305–315.

Zhang, K. and Banerjee, K., 2020. A review: Sample preparation and chromatographic technologies for detection of aflatoxins in foods. *Toxins* 12: 1–39.



8 ESTUDIOS ESPECTROSCÓPICOS Y MODELAMIENTO MOLECULAR DE LA FORMACIÓN DEL COMPLEJO AFLATOXINA M1- α -LACTOALBÚMINA BOVINA

8.1 RESUMEN

El objetivo de este capítulo fue evaluar la interacción entre la α -lactoalbúmina bovina (α -LA) y la AFM1 utilizando diferentes métodos espectroscópicos y la herramienta de acoplamiento molecular. Por medio de la espectroscopía de fluorescencia se demostró que debido a la adición de la AFM1 a una solución con α -LA hubo una disminución de la intensidad de fluorescencia a través de un mecanismo estático. Los resultados indicaron que la reacción es endotérmica y la unión entre la AFM1 y la α -LA es principalmente mediante interacciones hidrofóbicas. Los valores estequiométricos del sitio de unión ($n = 1.32$) y la constante de unión de $2.12 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ se calcularon de acuerdo con la ecuación de Stern-Volmer modificada. Los parámetros termodinámicos ΔH , ΔS y ΔG_u obtenidos experimentalmente fueron $93.58 \text{ kJ mol}^{-1}$, $0.378 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ y $-19.17 \pm 0.96 \text{ kJ mol}^{-1}$, respectivamente. Además, los estudios de dicroísmo circular del UV-lejano revelaron alteraciones en las estructuras secundarias de la α -LA cuando se formó el complejo α -LA-AFM1. Observando un aumento del contenido de estructuras α -hélices (del 35 al 40%) y de hojas β plegadas (del 16 al 19%). Asimismo, mediante el acoplamiento molecular se demostró que la AFM1 podría unirse en las regiones hidrofóbicas de la α -LA. En conclusión, con los resultados obtenidos se confirmó la formación del complejo α -LA-AFM1.

8.2 INTRODUCCIÓN

Las aflatoxinas son un grupo de micotoxinas producidas principalmente por hongos filamentosos como *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* (Iqbal *et al.*, 2013). El consumo de alimentos y bebidas contaminados con estas micotoxinas, en particular con aflatoxina B1 (AFB1), representa una grave amenaza para la salud pública, ya que está comprobado que es un carcinógeno de clase 1 (Creppy, 2002; Iqbal *et al.*, 2013). En la Figura 8-1 se muestra la estructura química de la aflatoxina M1 (AFM1), que es un metabolito de la AFB1. Cuando las vacas son alimentadas con forraje o granos contaminados con AFB1, en el hígado del animal es producida la AFM1 la cual es excretada en la leche y la orina (Iqbal *et al.*, 2013). Debido a la alta incidencia de AFM1 en la leche y sus derivados, es de suma importancia investigar y desarrollar métodos de prevención adecuadas (Creppy, 2002; Iqbal *et al.*, 2015). Se ha reportado que la concentración de AFM1 en el queso podría ser significativamente mayor que en la leche de la que se produjo (Manetta *et al.*, 2009). Además, el contenido de AFM1 en el queso varía según el tipo de queso, el origen de la leche y el proceso de fabricación (Campagnollo *et al.*, 2016). No hay reportes concluyentes en cuanto a la distribución de la AFM1 en la cuajada y el suero de leche durante el proceso de elaboración del queso. Algunos autores afirman que el mayor contenido de la micotoxina está en la cuajada (Manetta *et al.*, 2009; Motawee & McMahon, 2009), mientras que otros reportaron que se encuentra en el suero de leche (Chavarría *et al.*, 2017; López, *et al.*, 2001). Por otro lado, Chavarría *et al.* (2017) realizaron un estudio comparativo de la interacción de la AFM1 con las proteínas de la leche purificadas, encontrando que la α -lactoalbúmina (α -LA) presentaba una mayor afinidad en comparación con las caseínas, con una retención del 87.7 y 80.6% de la micotoxina, respectivamente. En otro estudio, Barbiroli *et al.* (2007) compararon la afinidad de la AFM1 hacia las principales fracciones de proteína en la leche de oveja y cabra durante la producción de queso. Se estableció que la AFM1 se unía preferiblemente a las proteínas del suero (56-75%) en la leche de oveja, mientras que se que las caseínas tenían una mayor afinidad por la AFM1 en la leche de cabra (53-62%).

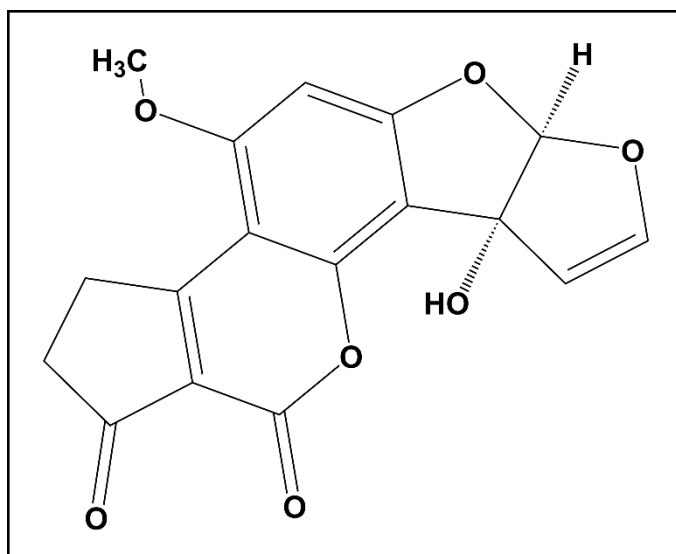


Figura 8-1. Estructura química de la aflatoxina M1 obtenida de PubChem (CID 1558498).

La α -LA bovina se caracteriza por tener dos regiones hidrofóbicas que le aportan la función de transportar compuestos bioactivos (Chrysin, *et al.*, 2000; Livney, 2010). Entre las biomoléculas que interacción con la proteína se encuentran el ácido cumárico, ácido ferúlico (Zhang *et al.*, 2014), vitamina D₃ (Delavari *et al.*, 2015), genisteína, kaempferol (Mohammadi & Moeeni, 2015a), trans-resveratrol, curcumina (Mohammadi & Moeeni, 2015b) y epigallocatequina-3-galato (Al-Hanish *et al.*, 2016). Recientemente, los estudios de acoplamiento molecular revelaron que los sitios de unión de la α -LA para los compuestos bioactivos son la caja hidrófoba y el grupo aromático I (Delavari *et al.*, 2015; Mohammadi & Moeeni, 2015a, 2015b). Además, los parámetros termodinámicos de la interacción de la α -LA con diferentes compuestos se determinaron mediante espectroscopía de fluorescencia (Delavari *et al.*, 2015; Mohammadi & Moeeni, 2015a, 2015b). Debido a la variabilidad en el contenido de AFM1 en la leche y sus derivados, el objetivo de este capítulo fue evaluar la formación del complejo α -LA-AFM1 utilizando métodos espectroscópicos y por acoplamiento molecular. Con la combinación de estos métodos se determinaron los parámetros termodinámicos de esta interacción y los posibles sitios de unión de la micotoxina con la α -LA.

8.3 MATERIALES Y MÉTODOS

8.3.1 Materiales

El etanol absoluto y la α -LA de leche bovina tipo I se obtuvieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE. UU.). La AFM1 se adquirió en Enzo Life Sciences, Inc. (Nueva York, NY,



EE. UU.). Los fosfatos de potasio monobásico y dibásico se obtuvieron de J. T. Baker (Estado de México, México). Los experimentos se llevaron a cabo a pH 6.5 para simular el pH de la leche. Se prepararon soluciones de α -LA a una concentración de 10 μ M en regulador de fosfato (BP) 50 mM a pH 6.5 para espectroscopía de fluorescencia y 1.40 μ M en BP 5 mM a pH 6.5 para espectrofotometría UV-VIS y dicroísmo circular (DC). El motivo de utilizar una menor concentración de α -LA en los experimentos de UV-VIS y DC en comparación con la empleada para la espectroscopía de fluorescencia tuvo como objetivo evitar una posible agregación de proteínas. La concentración exacta de la proteína se determinó mediante el coeficiente de extinción $A_{1cm}^{1\%} = 20.1$ a 280 nm, previamente reportado por Kronman & Andreotti (1964). Se prepararon soluciones de AFM1 en etanol absoluto a 3 mM para espectroscopía de fluorescencia y 608 μ M para espectrofotometría UV-VIS y DC. Una menor concentración de AFM1 implica menos residuos que afectan el medio ambiente. Todas las soluciones se prepararon al momento de realizar los experimentos y se utilizaron inmediatamente. Los experimentos se llevaron a cabo en la Ciudad de México a una presión atmosférica promedio de 0.77 atm.

8.3.2 Espectrofotometría de UV-VIS

Las mediciones de los espectros del UV-VIS se realizaron en un espectrofotómetro Shimadzu UV-1800 (Tokio, Japón) equipado con un soporte para celdas con control de temperatura Shimadzu TCC-20A (Tokio, Japón). En resumen, en una celda de cuarzo con una longitud de paso óptico de 1 cm que contenía 3.3 mL de la solución de α -LA (1.40 μ M) se fueron adicionando alícuotas de 25 μ L de la solución madre de AFM1 (608 μ M) hasta alcanzar un volumen final de 3.4 mL. Las concentraciones de AFM1 obtenidas estaban en un intervalo de 4.48 a 17.92 μ M. Al final de la titulación, la relación molar [AFM1]/[α -LA] fue de 12.8. Cada alícuota de la titulación se mezcló manualmente y se incubó durante 3 minutos con agitación magnética en un soporte para celdas y la temperatura se mantuvo constante. Los espectros de absorción de UV-VIS se registraron en un intervalo de longitud de onda entre 190-450 nm a 298 K. Todos los espectros se corrigieron utilizando un espectro de BP (5 mM, pH 6.5) como línea base.

8.3.3 Espectroscopía de fluorescencia

Las mediciones de los espectros de fluorescencia se realizaron en un espectrofotómetro de fluorescencia PC1 de ISS (Champaign, IL, EE. UU.) equipado con un soporte para celdas con chaqueta de agua para controlar la temperatura. En resumen, en



una celda de fluorescencia que contenía 2.9 mL de solución de α -LA (10 μ M) se le adicionaron los siguientes volúmenes de la solución madre de AFM1 (3 mM): 35, 10, 15, 15, 15 y 10 μ L, para alcanzar un volumen final de 3.0 mL. Las concentraciones de AFM1 obtenidas estaban en un intervalo de 35 a 100 μ M. Al final de la titulación, la relación molar [AFM1]/[α -LA] fue de 10. Cada alícuota de la titulación se realizó como se describe para la espectrofotometría UV-VIS. La longitud de onda de excitación se estableció en 280 nm y los espectros de emisión se registraron en un intervalo de longitud de onda de 290-500 nm. El ancho de las rejillas para la excitación y emisión se ajustaron a 0.5 mm. Los experimentos se llevaron a cabo a 298, 303 y 308 K. Todos los espectros se corrigieron utilizando un espectro de BP (50 mM, pH 6.5) como línea base.

8.3.4 Dicroísmo circular

Los efectos de la micotoxina en el cambio de las estructuras secundarias de la α -LA se monitorearon utilizando un espectropolarímetro Jasco J-715 (Tokio, Japón) equipado con un soporte para celdas con control de temperatura tipo Peltier. Los valores de DC se reportaron como la elipticidad por residuo medio ($[\theta]_{MWR}$), los cuales se calcularon usando una masa media de los residuos de 110 Da. La titulación de la α -LA (3.3 mL, 1.40 μ M) con diferentes alícuotas de AFM1 (608 μ M) se realizó en una celda de cuarzo con 1 cm de paso óptico a 298 K. Al final de la titulación, la relación molar [AFM1]/[α -LA] fue de 12.8. Cada alícuota de titulación se realizó como se describe para la espectrofotometría UV-VIS. Los espectros de DC en la región del UV-lejano se registraron en un intervalo de longitud de onda de 190-240 nm. Todos los espectros se corrigieron usando un espectro de AFM1 en BP (5 mM, pH 6.5) como línea base, debido a que no se observaron diferencias para los espectros de BP con y sin la AFM1 (Figura 11-1 del Anexo I). Se realizaron cinco barridos para obtener el espectro de DC final. Para estimar el porcentaje de estructuras secundarias, los datos de DC se analizaron mediante el *algoritmo CDSSTR* utilizando el conjunto de datos de referencia *SP175* (Lees *et al.*, 2006) que incluye más tipos de estructuras de proteínas disponible en DICHROWEB (Whitmore & Wallace, 2008).

8.3.5 Acoplamiento molecular

El proceso de selección de la estructura cristalográfica de la α -LA y la optimización de la estructura de la AFM1 se describen en el Anexo I (Secciones 11.1 a 11.4; Figuras 11-2 y 11-3).



La forma en que se une la AFM1 con la α -LA se modeló utilizando el programa *AutoDock* 4.2 (Morris *et al.*, 2009). Las estructuras de la micotoxina y la proteína se prepararon con parámetros estandarizados utilizando *AutoDockTools*. Los átomos de hidrógeno faltantes en la estructura cristalográfica de la α -LA se adicionaron de acuerdo con los valores del pK_a de los aminoácidos titulables calculados por el programa H ++ (Anandakrishnan *et al.*, 2012) a un pH de 6.5.

La estructura más favorable del complejo α -LA-AFM1, definida por la menor energía libre de unión (ΔG_u), se obtuvo utilizando un procedimiento llamado acoplamiento ciego en el que está involucrada toda la estructura de la proteína. El valor de ΔG_b se determinó utilizando el *Algoritmo Genético de Lamarckian* (Morris *et al.*, 1998). En resumen, el número de algoritmos genéticos fue de 100 y se consideró un tamaño de población inicial de 150 genes con un máximo de 2×10^3 generaciones y 25×10^6 evaluaciones de energía. El *grid* se ubicó en el centro geométrico de la proteína con un tamaño de 84 X 92 X 126 puntos con un espaciado de 0.375 Å entre cada punto. Las imágenes de los complejos de la α -LA con la AFM1 y los esquemas de las interacciones hidrofóbicas se obtuvieron utilizando los programas *VMD* (Humphrey *et al.*, 1996) y *LigPlot +* (Wallace *et al.*, 1995), respectivamente.

8.4 RESULTADOS

8.4.1 Espectrofotometría de UV-VIS

Se utilizó el método de espectroscopía de absorción UV-VIS para explorar los cambios estructurales de la α -LA en presencia de la AFM1, ya que tales variaciones indicarían la formación del complejo (Ranjbar *et al.*, 2013; Sadeghi-kaji *et al.*, 2019). En la Figura 8-2A se muestran los espectros de absorción UV-VIS de la α -LA libre (línea negra) con la banda de absorción máxima a 280 nm, mientras que la AFM1 libre en BP (línea azul) se caracteriza por tener tres máximos de absorción a los 226, 265 y 356 nm, así como tres mínimos a los 219, 252 y 290 nm. Cuando se tituló la α -LA con la micotoxina hasta alcanzar una concentración de 17.92 μ M AFM1 (línea púrpura), se observó un incremento en la intensidad de la absorción para los máximos a 265 y 356 nm, mientras que el pico a 226 nm desapareció en comparación con los espectros de AFM1 libre. De manera similar, la intensidad de absorción de los mínimos a 252 y 290 nm fue mayor durante la titulación que la registrada para la micotoxina libre. Finalmente, el mínimo de absorción a 290 nm tuvo un corrimiento al rojo de 10 nm. Las alteraciones observadas de los espectros de UV-VIS alrededor de los 280 nm podrían explicarse por los cambios en el microambiente cercano

a los aminoácidos aromáticos Trp, Tyr y Phe, como lo describió Jing *et al.* (2016). Con lo que se puede asumir que la AFM1 podría disminuir la hidrofobicidad alrededor de estos residuos. Además, no se observaron cambios en los espectros de absorción UV-VIS durante el curso de titulación al aumentar la concentración de la micotoxina como se muestra en la Figura 8-2B.

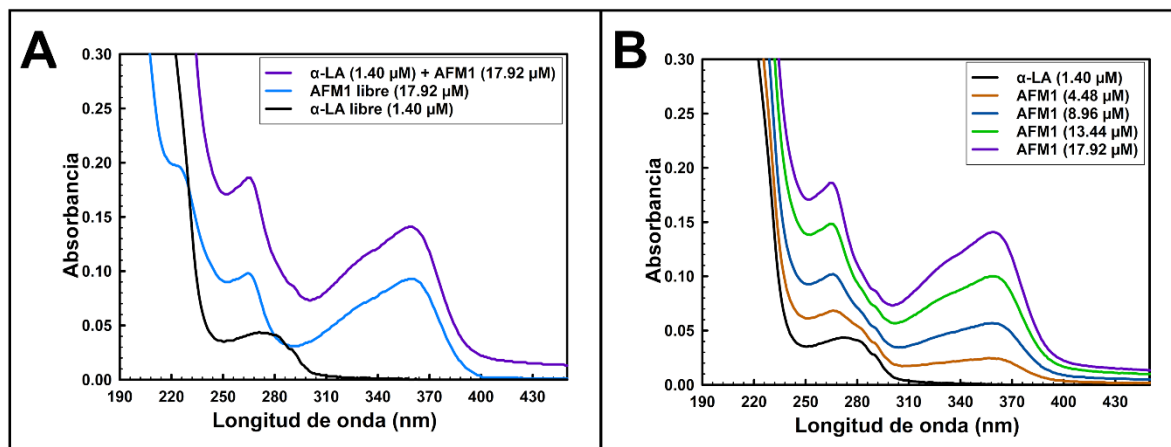


Figura 8-2. (A) Espectros de absorción UV-VIS de α -LA libre a 1.40 μM (línea negra); AFM1 libre (17.92 μM) en BP (línea azul); punto de la titulación de α -LA (1.40 μM) con AFM1 (17.92 μM) (línea violeta) a 298 K. **(B)** Espectros de absorción UV-VIS de α -LA en 1.40 μM (línea negra) titulada con diferentes concentraciones de AFM1 en el intervalo de 4.48 a 17.92 μM (líneas de color) a 298 K.

8.4.2 Espectroscopía de fluorescencia

La principal fuente de fluorescencia de las proteínas son los aminoácidos aromáticos Trp, Tyr y Phe. Se ha observado que para varias proteínas la presencia del residuo Trp se correlaciona directamente con la intensidad de fluorescencia observada. Por este motivo, la espectroscopía de fluorescencia es una de las técnicas más utilizadas para estudiar la formación de complejos proteína-ligando, además de que sirve para determinar los parámetros de unión del complejo (Lakowicz, 2006a; Sadeghi-kaji *et al.*, 2019).

8.4.2.1 Mediciones de la fluorescencia intrínseca

Dado que el efecto de filtro interno (EFI) se observó en los espectros de absorción ultravioleta en las longitudes de onda de excitación y emisión, cuando se agregó la AFM1 a la solución de α -LA (Figura 8-2), se utilizó la Ecuación (8-1) para corregir la intensidad de los espectros de fluorescencia durante la titulación de la α -LA con AFM1 (Shi *et al.*, 2017):

$$F_{cor} = F_{obs} \times 10^{(A_{ex} - A_{em})/2} \quad (8-1)$$

Donde F_{cor} es la intensidad de fluorescencia corregida y F_{obs} es la intensidad de fluorescencia observada en el experimento, A_{ex} y A_{em} son las absorbancias en el espectro de UV-VIS de todos los componentes a la longitud de onda de excitación y emisión, respectivamente.

Los espectros de fluorescencia obtenidos al titular la α -LA con diferentes concentraciones de AFM1 a 298 K se muestran en la Figura 8-3A. La proteína libre tiene una emisión máxima a 310 nm (línea negra). Además, se observó una disminución de la intensidad de la fluorescencia de la proteína conforme se adicionaba la AFM1, indicando que hay una interacción con la micotoxina. Asimismo, la formación de un punto isobéptico a 370 nm es otra evidencia de que la interacción solo involucró a la AFM1 y la α -LA, y que la estequiometría de la reacción permaneció sin cambios en una proporción de 1:1 cuando se formó el complejo α -LA-AFM1 (Harris, 2010). Del mismo modo, no se observaron diferencias en los espectros de fluorescencia registrados para la α -LA titulada con AFM1 a 303 y 308 K en comparación con el de 298 K (Anexo I; Figura 11-4). Los resultados obtenidos son consistentes con lo reportado por Mohammadi & Moeeni (2015) y Bagheri & Fatemi (2018) que obtuvieron espectros de fluorescencia similares para el complejo de α -LA-trans-resveratrol y el complejo de seroalbúmina humana-AFB1, respectivamente. Finalmente, la presencia de una segunda banda de emisión con un máximo a 420 nm como se puede ver en la Figura 8-3A corresponde a la AFM1, esto fue comprobado al titular una disolución de BP con la micotoxina (Figura 8-3B). Además, tras la adición de AFM1 a la solución de α -LA (Figura 8-3A) se observó una disminución de la intensidad de la micotoxina libre a 420 nm en comparación con la observada en la Figura 8-3B.

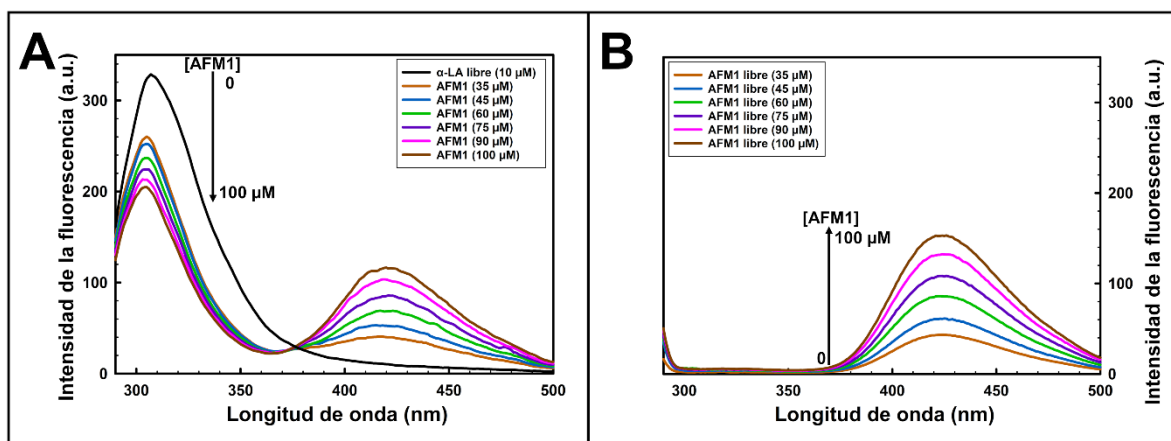


Figura 8-3. (A) Espectros de fluorescencia de la α -LA 10 μ M (línea negra) titulada con diferentes concentraciones de AFM1 (35 a 100 μ M) a 298 K. **(B)** Espectros de fluorescencia

de la α -LA 10 μM (línea negra) titulada con diferentes concentraciones de AFM1 (35 a 100 μM) a 298 K.

8.4.2.2 Mecanismo de disminución de fluorescencia

La disminución o desactivación de la fluorescencia de las proteínas se produce cuando interactúan con otras moléculas llamadas ligandos. Hasta ahora se han descrito tres mecanismos de interacción: dinámica (proceso de colisión), estática (formación del complejo) y una combinación de ambos que provoca un proceso de colisión y la formación del complejo con el mismo ligando. Estos mecanismos se pueden distinguir por la correlación entre la constante de Stern-Volmer (K_{sv}) y la temperatura. Para la interacción dinámica, el valor de K_{sv} aumenta al incrementar la temperatura debido que hay un mayor coeficiente de difusión para el ligando promoviendo la transferencia de electrones. Por el contrario, en caso de interacción estática, K_{sv} disminuye con el aumento de la temperatura, debido a que se afecta la estabilidad del complejo. El mecanismo de interacción se puede describir mediante la ecuación de Stern-Volmer (Ecuación (8-2)) (Lakowicz, 2006b; Lu *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2017):

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{sv}[Q] = 1 + k_q\tau_0[Q] \quad (8-2)$$

Donde F_0 y F son las intensidades de fluorescencia de la proteína en ausencia y presencia del ligando, respectivamente; K_{sv} es la constante de Stern-Volmer; τ_0 es la vida media del ligando; $[Q]$ es la concentración del ligando; y k_q es la cantidad de la constante de velocidad de desactivación (Sadeghi-kaji *et al.*, 2019). Si k_q es mayor que $2 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, el mecanismo de interacción es estático, y si es menor, el mecanismo es dinámico (Delavari *et al.*, 2015).

Con base en los datos de la Figura 8-4A, se determinó que la K_{sv} es igual a $(5.90 \pm 0.42) \times 10^3 \text{ M}^{-1}$. Para calcular la k_q , se utilizó el valor τ_0 para la α -LA (2.6 ns) previamente reportada por Delavari *et al.* (2015). Dado que el valor de k_q obtenido fue $(2.27 \pm 0.17) \times 10^{12} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, se concluyó que el mecanismo de interacción entre la α -LA y la AFM1 fue estático con lo que se confirmó la formación del complejo α -LA-AFM1. Los valores calculados de K_{sv} y k_q a 303 y 308 K están reportados en el Cuadro 11-1 del Anexo I.

8.4.2.3 Determinación de los parámetros de unión

Un posible mecanismo de formación del complejo puede ser expresado con la siguiente Ecuación (8-3):



Considerando que la reacción está en equilibrio de acuerdo con la Ecuación 8-3, la constante de unión (K_u) puede ser expresada por la siguiente Ecuación (8-4):

$$K_u = \frac{[\alpha\text{-La-AFM1}]}{[\alpha\text{-La}][\text{AFM1}]} \quad (8-4)$$

Además, cuando el mecanismo de interacción es estático, la ecuación de Stern-Volmer modificada (Ecuación (8-5)) se puede utilizar para determinar la K_u y el número de sitios de unión (n) (Mohammadi & Moeeni, 2015b, 2015a; Zhang *et al.*, 2014).

$$\log \frac{(F_0 - F)}{F} = \log K_u + n \log [\text{AFM1}] \quad (8-5)$$

Basados en los datos de la Figura 8-4B fue posible determinar los n y la K_b . El valor de los n fue de 1.32 ± 0.07 , lo que significa, que se formó el complejo con una relación 1:1 entre la α -LA y la AFM1. Como se puede observar en el Cuadro 8-1, con un valor de $K_b > 1$, la formación del complejo α -LA-AFM1 se ve favorecida de acuerdo con la reacción en el equilibrio mostrado en la Ecuación 8-4. Asimismo, mediante la Ecuación 8-6 se calculó el ΔG_u (Cuadro 8-1) y debido a que la $\Delta G_u < 0$ se favorece la formación del complejo.

$$\Delta G_u = -RT \ln K_u \quad (8-6)$$

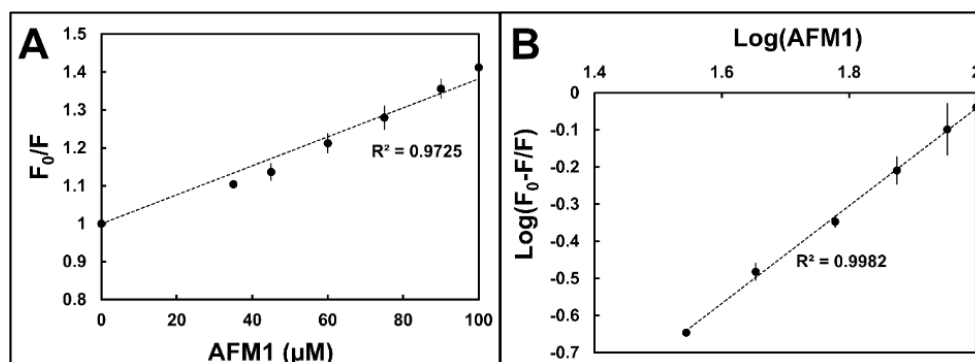


Figura 8-4. (A) Gráfico de Stern-Volmer: describe la disminución de la fluorescencia de la α -LA por la adición de AFM1 a 298 K. (B) Gráfico de la ecuación modificada de Stern-Volmer de la formación del complejo α -LA-AFM1 a 298 K.

Cuadro 8-1. K_u , n y ΔG_u obtenidos de la interacción de la α -LA con diferentes compuestos obtenidos por espectroscopía de fluorescencia.

Compuesto	K_u (M^{-1})	n	ΔG_u ($kJ\ mol^{-1}$)	Referencia
AFM1	$(2.12 \pm 0.59) \times 10^3$	1.32 ± 0.07	-19.17 ± 0.96	Este trabajo
Kaempferol	$(1.44 \pm 0.59) \times 10^6$	1.29 ± 0.04	-38.77 ± 1.05	Mohammadi & Moeeni 2015a
Genisteína	$(0.59 \pm 1.36) \times 10^6$	1.23 ± 0.19	-35.69 ± 0.54	
Curcumina	$(1.47 \pm 0.66) \times 10^6$	1.20 ± 0.17	-35.48 ± 1.09	Mohammadi & Moeeni 2015b
Trans-resveratrol	$(6.32 \pm 3.10) \times 10^6$	1.16 ± 0.04	-37.15 ± 1.21	
Vitamina D₃	$(0.70 \pm 0.49) \times 10^6$	1.30 ± 0.01	-33.47 ± 0.00	Delavari <i>et al.</i> 2015

K_u : constante de unión; n : sitios de unión; ΔG_u : energía libre de unión.

8.4.3 Naturaleza de la interacción

La naturaleza de la interacción entre la α -LA y la AFM1 se estableció al determinar los cambios de los valores de la entalpía (ΔH) y la entropía (ΔS) (Ross & Subramanian, 1981; Suryawanshi *et al.*, 2016) utilizando la Ecuación de van't Hoff (Ecuación (8-7)):

$$\ln K_b = -\frac{\Delta H}{R} \frac{1}{T} + \frac{\Delta S}{R} \quad (8-7)$$

En este trabajo, los valores de K_u se evaluaron a tres temperaturas diferentes (Anexo I, Figura 11-5 y Cuadro 11-1) para poder construir la gráfica de van't Hoff como lo reportó Suryawanshi *et al.* (2016). Con base a los datos de la Figura 8-5, los valores de ΔH y ΔS obtenidos fueron $93.58\ kJ\ mol^{-1}$ y $0.378\ kJ\ mol^{-1}K^{-1}$, respectivamente. Debido al signo positivo de estos parámetros, se concluyó que la interacción entre la α -LA y la AFM1 es de naturaleza hidrofóbica, como lo descrito previamente por Suryawanshi *et al.* (2016). Además, Delavari *et al.* (2015) reportaron que el complejo α -LA-vitamina D₃ también es de naturaleza hidrofóbica.

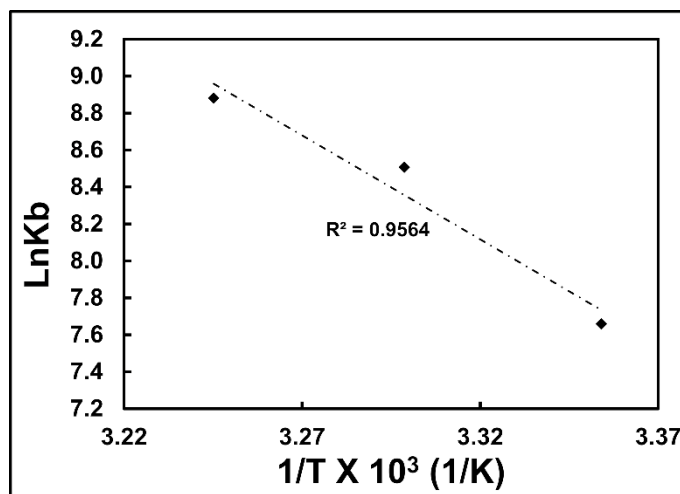


Figura 8-5. Gráfico de van't Hoff para las constantes de unión (K_b) a 298, 303 y 308 K calculadas por extinción de fluorescencia de α -La por AFM1.

8.5 DICROÍSMO CIRCULAR

La espectroscopía de DC es un método sensible para examinar los efectos de los ligandos sobre los posibles cambios conformacionales en las estructuras secundarias de las proteínas en solución (Shahlaei *et al.*, 2015). Los espectros de DC-UV lejano registrados para la titulación de la α -LA con AFM1 a 298 K se muestran en la Figura 8-6. Como se puede observar hay cambios en los espectros de DC conforme se van adicionando diferentes concentraciones de AFM1 a la solución de proteína. En el Cuadro 8-2 se reporta el contenido porcentual de estructuras secundarias en cada punto de la titulación de la α -LA con AFM1 calculados con el *algoritmo CDSSTR*. Además, de acuerdo con Whitmore *et al.* (2004), la desviación cuadrática media normalizada (NRMSD) es un parámetro de ajuste. Si el valor es mayor que 0.1, las estructuras secundarias experimentales no corresponden con las estructuras de la base de datos del algoritmo. Como se puede ver en el Cuadro 8-2, los valores de NRMSD obtenidos en este trabajo están por debajo de 0.1, lo que significa que las estructuras secundarias de la α -LA se ajustaron correctamente. Asimismo, los resultados obtenidos para el contenido de α -hélice fueron consistentes con los reportados por Delavari *et al.* (2015). Por lo tanto, los estudios de DC-UV lejano confirmaron que la AFM1 altera las estructuras secundarias de la α -LA cuando se forma el complejo. Los mayores cambios se observaron en las estructuras de la α -hélices con un cambio del 35 al 40% así como de las hojas β del 16 al 19%, lo que corresponde al aumento del 12.5% y del 15.8% de las estructuras α -hélice y hojas β , respectivamente. Por el contrario, las estructuras secundarias de asas y *random coil* disminuyeron en un 20% y un 12%,

respectivamente. Con el fin de excluir el posible efecto del etanol absoluto sobre las estructuras secundarias de la α -LA, se llevó a cabo el experimento con el blanco apropiado (datos no mostrados) en el cual no se observaron cambios en los espectros de DC.

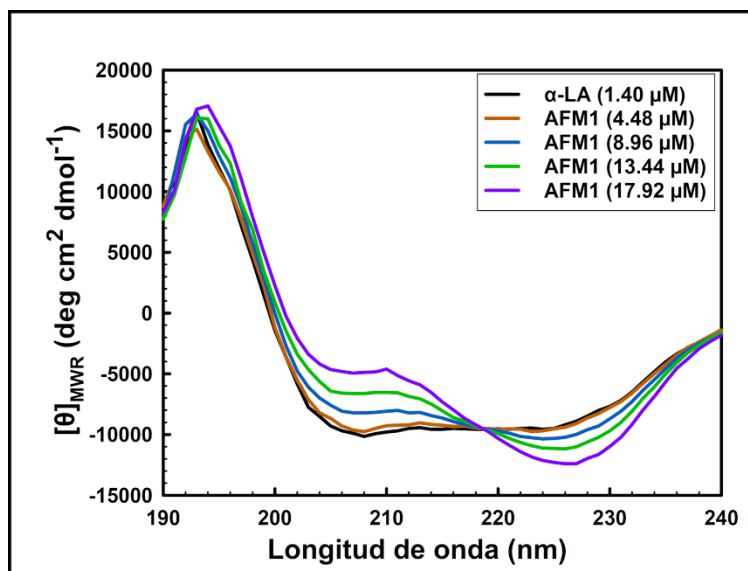


Figura 8-6. Espectros de DC de la titulación de α -LA (línea negra) con diferentes concentraciones de AFM1 (líneas de colores) a 298 K.

Cuadro 8-2. Cambios de las estructuras secundarias cuando se adicionan diferentes concentraciones de AFM1 a una solución de α -LA.

AFM1 (μ M)	α -hélices (%)	Hojas β (%)	Asas (%)	Random coil (%)	NRMSD*
0	35	16	15	34	0.043
4.48	34	17	14	34	0.042
8.96	38	14	14	34	0.034
13.44	39	16	13	31	0.025
17.92	40	19	12	30	0.017

*Error relativo calculado por el algoritmo CDSSRT.

8.6 ACOPLAMIENTO MOLECULAR

El acoplamiento molecular es una herramienta de modelado computacional que se utiliza para predecir las formas más estables de los complejos proteína-ligando y proporciona una idea de la naturaleza de unión de estas interacciones. Además, una vez que se conoce la estructura cristalográfica de la proteína, se puede determinar el sitio

potencial de unión del ligando a la proteína. La Figura 8-7 muestra la estructura terciaria de la α -LA, que se compone de dos regiones hidrofóbicas (Chrysina *et al.*, 2000). En primer lugar, se realizó el acoplamiento molecular con AFM1 en toda la superficie de la proteína, es decir una búsqueda a ciegas y se encontraron dos sitios de unión potenciales: en la caja hidrofóbica y el grupo aromático I. Luego, se recalculó el acoplamiento molecular localizado en cada sitio de unión para determinar la mínima ΔG_u en la formación del complejo α -La-AFM1.

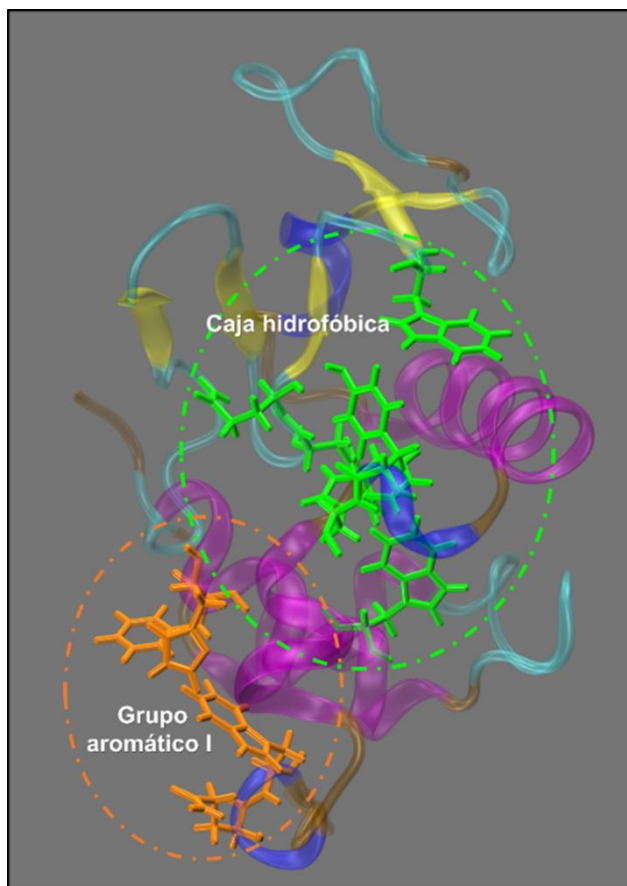


Figura 8-7. Estructura terciaria de la α -LA. Estructuras secundarias: α -hélices (magenta); hélices 3_{10} (azul); hojas β (amarillo); asas (cyan) y *random coil* (café). Regiones hidrofóbicas: caja hidrofóbica (línea punteada verde) y grupo aromático I (línea punteada naranja).

8.6.1 complejo formado en la región de la caja hidrofóbica

Como se muestra en la Figura 8-8A, las interacciones hidrofóbicas entre la proteína y la AFM1 son formadas con los aminoácidos apolares; Ile59, Val99, Trp60 y Tyr103. Los dos últimos son reportados por Chrysina *et al.* (2000) y pertenecen a la región de la caja

hidrofóbica. Adicionalmente, se identificó la formación de tres puentes de hidrógeno, los cuales contribuyen a la estabilidad del complejo. Como se puede ver en la Figura 8-8B dos están formados con la asparagina (Asn) 56 y uno con el ácido glutámico (Glu) 49, con una distancia de unión de 1.855, 2.013 y 2.001 Å, respectivamente. Por otra parte, como se puede observar en la Figura 8-7, la región de la caja hidrofóbica está conformada principalmente por estructuras α -hélices y hojas β , y de acuerdo con los resultados de DC (sección 8.5) los mayores cambios son en ese tipo de estructuras, por lo que se puede sugerir que esta región es la más probable para la formación del complejo α -LA-AFM1.

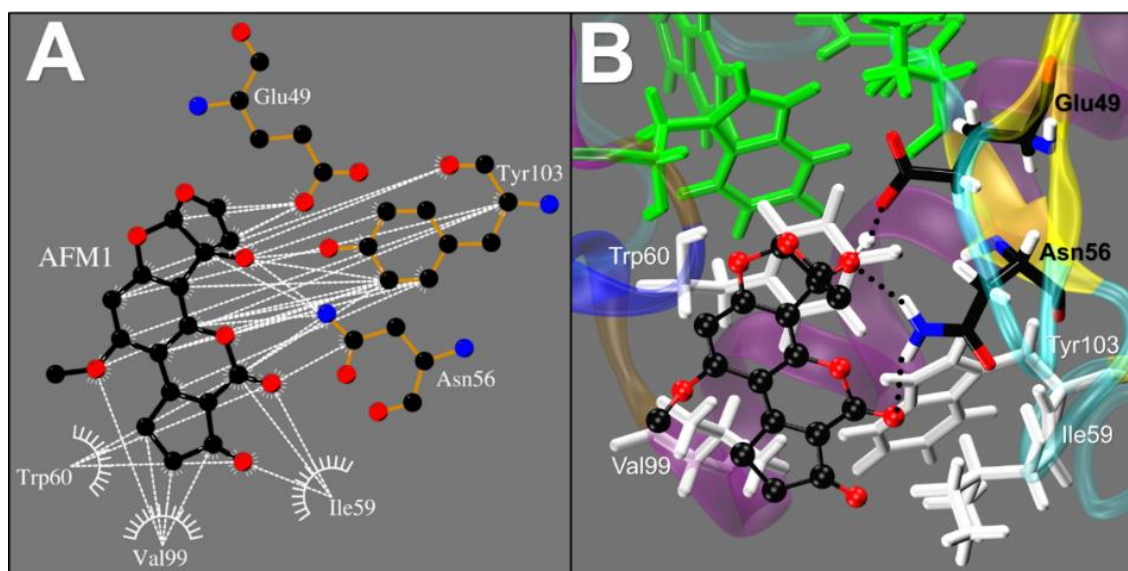


Figura 8-8. Representaciones gráficas de las interacciones de la AFM1 con la α -LA en la región de la caja hidrofóbica. **(A)** Diagrama de Lig Plot de las interacciones hidrofóbicas (líneas de puntos blancas) de AFM1 con los aminoácidos de la caja hidrofóbica. **(B)** Imagen estereoscópica de los puentes de hidrógeno (líneas de puntos negros) formados con la AFM1 y los aminoácidos de la caja hidrofóbica.

Además, los reportes de Delavari *et al.* (2017) y Mohammadi & Moeni (2015a, 2015b) indican que la interacción de la α -LA con los compuestos estudiados fue del tipo hidrofóbico y con formación de puentes de hidrógeno con aminoácidos que pertenecen a esta región.

La ΔG_u obtenida para formación del complejo α -LA-AFM1 en la caja hidrofóbica fue de $-26.07 \text{ kJ mol}^{-1}$, siendo similar a lo obtenido con el método experimental (sección 8.4.2.3). Al comparar los valores de la ΔG_u obtenidos de la interacción de la α -LA con otros



compuestos reportados previamente por diversos autores (Cuadro 8-3) son consistentes con el obtenido en este trabajo.

Cuadro 8-3. Valores de la ΔG_u obtenidos por acoplamiento molecular de la interacción de la α -La con diferentes compuestos.

Ligando	ΔG_u (kJ mol ⁻¹)	Referencia
AFM1	-26.07	Este trabajo
Kaempferol	-25.27	Mohammadi & Moeeni 2015a
Trans-resveratrol	-26.44	Mohammadi & Moeeni 2015b
Genisteína	-22.13	Mohammadi & Moeeni 2015a
Vitamina D ₃	-31.42	Delavari <i>et al.</i> 2015

ΔG_u : energía libre de unión

8.6.2 Complejo formado en la región del grupo aromático I

En la Figura 8-9A se presenta las interacciones hidrofóbicas en la región del grupo aromático I de la α -LA con la AFM1. En este caso los aminoácidos aromáticos (Tyr36, Phe31 y Trp118) y los polares (Thr4, Lys5, Cys6 y Cys120) participan en la formación del complejo. Adicionalmente para esta región se observó la formación de un puente de hidrógeno con la lisina (Lys) 5 a 2.197 Å (Figura 8-9B). Mohammadi & Moeeni (2015b) reportaron que la curcumina al interactuar con la α -LA en la región del grupo aromático I tiene una ΔG_u de -21.00 kJ mol⁻¹, siendo muy cercana a la obtenida para la AFM1 en este trabajo (-26.28 kJ mol⁻¹).

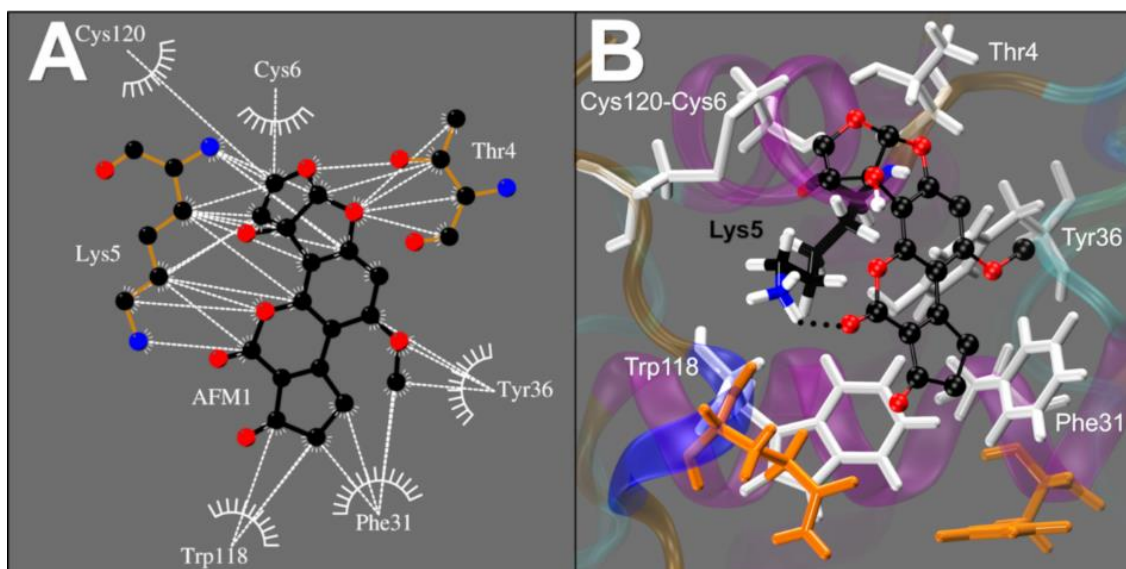


Figura 8-9. Representaciones gráficas de las interacciones de la AFM1 con la α -LA en la región del grupo aromático I. **(A)** Diagrama de Lig Plot de interacciones hidrofóbicas (líneas de puntos blancas) de AFM1 con los aminoácidos del grupo aromático I. **(B)** Imagen estereoscópica de los puentes de hidrógeno (líneas de puntos negros) formados con la AFM1 y los aminoácidos del grupo aromático I.

8.7 CONCLUSIONES

En este capítulo se evaluó la interacción entre la α -LA y la AFM1 utilizando diferentes métodos espectroscópicos complementados con estudios de acoplamiento molecular. Tal enfoque permitió determinar los valores experimentales de los parámetros de unión del complejo α -LA-AFM1 y se modelaron los sitios de unión potenciales en la superficie de la proteína. Los estudios por espectroscopía de fluorescencia mostraron que la reducción de la intensidad de fluorescencia de la α -LA debido a la adición de AFM1 fue mediante un mecanismo estático, lo que es indicativo de la formación del complejo. El valor estequiométrico de los n reveló la presencia de un solo sitio de unión entre la α -LA y la AFM1. Asimismo, con los datos espectroscópicos y los valores de la ΔH y la ΔS mostraron que la interacción entre la α -LA y la micotoxina es principalmente de naturaleza hidrofóbica ya que se observaron cambios en el microambiente de los aminoácidos aromáticos. Por otro lado, los estudios de DC demostraron un cambio en la proporción de estructuras secundarias de la α -LA al adicionar la AFM1 con un aumento de estructuras α -hélices y hojas β . Dichos cambios conformacionales podrían proporcionar una mayor estabilidad proteica mientras se formaba el complejo α -LA-AFM1.

Finalmente, los estudios de acoplamiento molecular ayudaron a predecir los dos posibles sitios de unión de la α -LA: la caja hidrófoba o el grupo aromático I. Además, se observó que el complejo se estabiliza mediante interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno formados a través de aminoácidos aromáticos y polares, respectivamente. Estos residuos están presentes en la caja hidrofóbica de la proteína, así como en el grupo aromático I. Asimismo, los resultados de DC y del acoplamiento molecular sugirieron que el sitio de unión más probable era la caja hidrofóbica. Dado que se encontró que el sitio de unión de la micotoxina es el mismo que en otras biomoléculas, se puede asumir que la α -LA bovina puede actuar como un transportador de la AFM1.

8.8 BIBLIOGRAFÍA

Al-Hanish, A., Stanic-Vucinic, D., Mihailovic, J., Prodic, I., Minic, S., Stojadinovic, M., ... Cirkovic Velickovic, T. (2016). Noncovalent interactions of bovine α -lactalbumin with green tea polyphenol, epigallocatechin-3-gallate. *Food Hydrocolloids*, 61, 241–250. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.05.012>

Anandakrishnan, R., Aguilar, B., & Onufriev, A. (2012). H++ 3.0: Automating pK prediction and the preparation of biomolecular structures for atomistic molecular modeling and simulations. *Nucleic Acids Research*, 40(W1), 537–541. <https://doi.org/10.1093/nar/gks375>

Bagheri, M., & Fatemi, M. (2018). Fluorescence spectroscopy, molecular docking, and molecular dynamic simulation studies of HSA-Aflatoxin B1 and G1 interactions. *Journal of Luminescence*, 202(February), 345–353. <https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2018.05.066>

Barbiroli, A., Bonomi, F., Benedetti, S., Mannino, S., Monti, L., Cattaneo, T., & Iametti, S. (2007). Binding of aflatoxin M1 to different protein fractions in ovine and caprine milk. *Journal of dairy science*, 90(2), 532–540. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(07\)71536-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(07)71536-9)

Campagnollo, F., Ganey, K., Mousavi, A., Portela, B., Cruz, A., Granato, D., ... Sant, A. (2016). The occurrence and effect of unit operations for dairy products processing on the fate of aflatoxin M1: A review. *Food Control*, 68, 310–329. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.04.007>

Chavarría, G., Molina, A., Leiva, A., Méndez, G., Wong-González, E., Cortés-Muñoz, M., ... Granados-Chinchilla, F. (2017). Distribution, stability, and protein interactions of aflatoxin



M1 in fresh cheese. *Food Control*, 73, 581–586.

<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.09.005>

Chrysin, E., Brew, K., & Acharya, K. (2000). Crystal structures of Apo- and holo-bovine α -lactalbumin at 2.2-Å resolution reveal an effect of calcium on inter-lobe interactions. *Journal of Biological Chemistry*, 275(47), 37021–37029. <https://doi.org/10.1074/jbc.M004752200>

Creppy, E. (2002). Update of survey, regulation, and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicology Letters*, 127(1–3), 19–28. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(01\)00479-9](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(01)00479-9)

Delavari, B., Saboury, A., Atri, M., Ghasemi, A., Bigdeli, B., Khammari, A., ... Goliaei, B. (2015). Alpha-lactalbumin: A new carrier for vitamin D3 food enrichment. *Food Hydrocolloids*, 45, 124–131. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.10.017>

Harris, D. (2010). Applications of Spectrophotometry. En *Quantitative Chemical Analysis* (8th ed., pp. 424–425). New York: Clancy Marshall.

Hernández Camarillo, E., Ramirez-Martinez, A., Carvajal-Moreno, M., Vargas-Ortíz, M., Wesolek, N., Del Carmen Rodriguez Jimenes, G., ... Robles-Olvera, V. (2018). Assessment of Aflatoxin M1 and M2 exposure risk through Oaxaca cheese consumption in southeastern Mexico. *International Journal of Environmental Health Research*, 28(2), 202–213. <https://doi.org/10.1080/09603123.2018.1453054>

Humphrey, W., Dalke, A., & Schulten, K. (1996). VMD: Visual Molecular Dynamics. *Journal of Molecular Graphics*, 14(1), 33–38. [https://doi.org/10.1016/0263-7855\(96\)00018-5](https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5)

Iqbal, S., Asi, M., & Ariño, A. (2013). Aflatoxins. En S. Maloy & K. Hughes (Eds.), *Brenner's Encyclopedia of Genetics* (2nd ed., Vol. 1, pp. 43–47). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.00022-X>

Iqbal, S., Jinap, S., Pirouz, A., & Ahmad Faizal, A. (2015). Aflatoxin M1 in milk and dairy products, occurrence, and recent challenges: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 46(1), 110–119. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.08.005>

Jing, M., Song, W., & Liu, R. (2016). Binding of copper to lysozyme: Spectroscopic, isothermal titration calorimetry and molecular docking studies. *Spectrochimica Acta - Part*



A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 164, 103–109.
<https://doi.org/10.1016/j.saa.2016.04.008>

Kronman, M., & Andreotti, R. (1964). Inter- and Intramolecular Interactions of α -Lactalbumin. I. The Apparent Heterogeneity at Acid pH. *Biochemistry*, 3(8), 1145–1151.
<https://doi.org/10.1021/bi00896a024>

Lakowicz, J. (2006a). Fluorophores. En *Principles of fluorescence spectroscopy* (pp. 63–95). <https://doi.org/doi.org/10.1007/978-0-387-46312-4>

Lakowicz, J. (2006b). Introduction to fluorescence. En *Principles of fluorescence spectroscopy* (Third, pp. 1–25). <https://doi.org/doi.org/10.1007/978-0-387-46312-4>

Laskowski, R., & Swindells, M. (2011). LigPlot+: Multiple ligand-protein interaction diagrams for drug discovery. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 51(10), 2778–2786.
<https://doi.org/10.1021/ci200227u>

Lees, J., Miles, Wien, F., & Wallace, B. (2006). A reference database for circular dichroism spectroscopy covering fold and secondary structure space. *Bioinformatics*, 22(16), 1955–1962. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl327>

Livney, Y. (2010). Milk proteins as vehicles for bioactives. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 15(1–2), 73–83. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2009.11.002>

López, C., Ramos, L., Ramadán, S., Bulacio, L., & Perez, J. (2001). Distribution of aflatoxin M1 in cheese obtained from milk artificially contaminated. *International Journal of Food Microbiology*, 64(1–2), 211–215. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00444-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00444-X)

Lu, N., Sui, Y., Ding, Y., Tian, R., Li, L., & Liu, F. (2018). Adsorption of human serum albumin on functionalized single-walled carbon nanotubes reduced cytotoxicity. *Chemico-Biological Interactions*, 295(December 2017), 64–72. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.03.015>

Manetta, A., Giammarco, M., Giuseppe, L., Fusaro, I., Gramenzi, A., Formigoni, A., ... Lambertini, L. (2009). Distribution of aflatoxin M1 during grana padano cheese production from naturally contaminated milk. *Food Chemistry*, 113(2), 595–599.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.07.091>



Mohammadi, F., & Moeeni, M. (2015a). Analysis of binding interaction of genistein and kaempferol with bovine α -lactalbumin. *Journal of Functional Foods*, 12, 458–467. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.12.012>

Mohammadi, F., & Moeeni, M. (2015b). Study on the interactions of trans-resveratrol and curcumin with bovine α -lactalbumin by spectroscopic analysis and molecular docking. *Materials Science and Engineering: C*, 50, 358–366. <https://doi.org/dx.doi.org/10.1016/j.msec.2015.02.007>

Morris, G., Goodsell, D., Halliday, R., Huey, R., Hart, W., Belew, R., & Olson, A. (1998). Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *Journal of Computational Chemistry*, 19(14), 1639–1662. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-987X\(19981115\)19:14<1639:AID-JCC10>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-987X(19981115)19:14<1639:AID-JCC10>3.0.CO;2-B)

Morris, G., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M., Belew, R., Goodsell, D., & Olson, A. (2009). AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of Computational Chemistry*, 30(16), 2785–2791. <https://doi.org/10.1002/jcc.21256.AutoDock4>

Motawee, M., & McMahon, D. (2009). Fate of aflatoxin M1 during manufacture and storage of feta cheese. *Journal of Food Science*, 74(5), 42–45. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01158.x>

Ranjbar, S., Shokoohinia, Y., Ghobadi, S., Bijari, N., Gholamzadeh, S., Moradi, N., ... Khodarahmi, R. (2013). Studies of the interaction between isoimperatorin and human serum albumin by multispectroscopic method: Identification of possible binding site of the compound using esterase activity of the protein. *The Scientific World Journal*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/305081>

Ross, P., & Subramanian, S. (1981). Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability. *Biochemistry*, 20, 3096–3102. <https://doi.org/doi.org/10.1021/bi00514a017>

Sadeghi-kaji, S., Shareghi, B., Saboury, A., & Farhadian, S. (2019). Spectroscopic and molecular docking studies on the interaction between spermidine and pancreatic elastase. *International Journal of Biological Macromolecules*, 131, 473–483. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.03.084>



Shahlaei, M., Rahimi, B., Nowroozi, A., Ashrafi-Kooshk, M. R., Sadrjavadi, K., & Khodarahmi, R. (2015). Exploring binding properties of sertraline with human serum albumin: Combination of spectroscopic and molecular modeling studies. *Chemico-Biological Interactions*, 242, 235–246. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2015.10.006>

Shi, J., Wang, Q., Pan, D., Liu, T., & Jiang, M. (2017). Characterization of interactions of simvastatin, pravastatin, fluvastatin, and pitavastatin with bovine serum albumin: multiple spectroscopic and molecular docking. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 35(7), 1529–1546. <https://doi.org/10.1080/07391102.2016.1188416>

Suryawanshi, V., Walekar, L., Gore, A., Anbhule, P., & Kolekar, G. (2016). Spectroscopic analysis on the binding interaction of biologically active pyrimidine derivative with bovine serum albumin. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(1), 56–63. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.07.001>

Wang, B., Pan, D., Zhou, K., Lou, Y., & Shi, J. (2019). Multi-spectroscopic approaches and molecular simulation research of the intermolecular interaction between the angiotensin-converting enzyme inhibitor (ACE inhibitor) benazepril and bovine serum albumin (BSA). *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 212, 15–24. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2018.12.040>

Wang, Q., Huang, C., Jiang, M., Zhu, Y., Wang, J., Chen, J., & Shi, J. (2016). Binding interaction of atorvastatin with bovine serum albumin: Spectroscopic methods and molecular docking. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 156, 155–163. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2015.12.003>

Whitmore, L., & Wallace, B. (2004). DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data. *Nucleic Acids Research*, 32(WEB SERVER ISS.), 668–673. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh371>

Whitmore, L., & Wallace, B. (2008). Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: Methods and reference databases. *Biopolymers*, 89(5), 392–400. <https://doi.org/10.1002/bip.20853>

Zhang, H., Yu, D., Sun, J., Guo, H., Ding, Q., Liu, R., & Ren, F. (2014). Interaction of milk whey protein with common phenolic acids. *Journal of Molecular Structure*, 1058, 228–233. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2013.11.009>



Zhang, Y., Zhou, K., Lou, Y., Pan, D., & Shi, J. (2017). Investigation of the binding interaction between estazolam and bovine serum albumin: Multi-spectroscopic methods and molecular docking technique. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 35(16), 3605–3614. <https://doi.org/10.1080/07391102.2016.1264889>



9 EVALUACIÓN DE LA INTERACCIÓN DE LA AFLATOXINA M1 CON LA β -LACTOGLOBULINA BOVINA A DIFERENTES PH POR ACOPLAMIENTO MOLECULAR

9.1 RESUMEN

El objetivo de este capítulo fue evaluar la interacción de la AFM1 con cuatro modelos estructurales de la β -lactoglobulina (β -LG) obtenidos a los pH de 2.0, 6.5, 7.4 y 8.2 por medio de la herramienta de acoplamiento molecular en los tres sitios de unión de la proteína: el Cáliz, Sitio C y la interfaz del dímero, este último solo se estudió en los pH de 6.5 y 7.4, debido a que la proteína solo se encuentra en este ensamble entre los pH de 2.5 a 7.5. Al comparar los modelos estructurales a los diferentes pH de la proteína, se observó que en el Cáliz a pH 2.0 y 6.5 el loop EF se encuentra en conformación cerrada y la superficie de la cavidad del Cáliz es más estrecha entre los residuos Leu87-Leu39 en comparación a los pH 7.4 y 8.2 donde el loop EF está abierto. En la región del Sitio C a pH 2.0 se observó una cavidad hidrofóbica la cual va desapareciendo conforme se aumenta el pH, además en esta región hay una mayor afinidad por compuestos hidrofílicos como la lactosa. A pesar de estos cambios estructurales la AFM1 tuvo la capacidad de unirse con las cuatro estructuras de la proteína evaluadas. Finalmente, se determinó que los complejos formados al pH de 6.5 no presentaron diferencias en la ΔG_u de -29.71, -28.70 y -28.03 kJ mol⁻¹ en el Cáliz, Sitio C e interfaz del dímero, respectivamente. Concluyendo que la AFM1 presenta una mayor afinidad con la β -LG a pH 6.5, el cual es cercano al pH fisiológico de la leche.

9.2 INTRODUCCIÓN

La herramienta de acoplamiento molecular está diseñada para modelar la forma en que interacciona un ligando como la aflatoxina M1 (AFM1) con una proteína con base a la complementariedad de las moléculas. La conformación óptima se podrá predecir mediante el cálculo de la energía libre de unión (ΔG_u) además de predecir la afinidad de unión mediante la constante de unión (K_u). Sin embargo, si solo se basará en buscar el acoplamiento perfecto entre la proteína y el ligando como se observa en la Figura 9-1A, no se estaría simulando un proceso real, ya que las moléculas en un sistema *in vivo* tienen movimiento. Para los programas de acoplamiento molecular sería un gasto computacional muy alto el poder considerar flexibles a la proteína y el ligando. Sin embargo, en *AutoDock* (AD) se considera la flexibilidad del ligando. Como se ve en la Figura 9-1B, cuando el ligando se posiciona en el sitio de unión, cambia de conformación hasta encontrar la complementariedad con la proteína (Fan *et al.*, 2019).

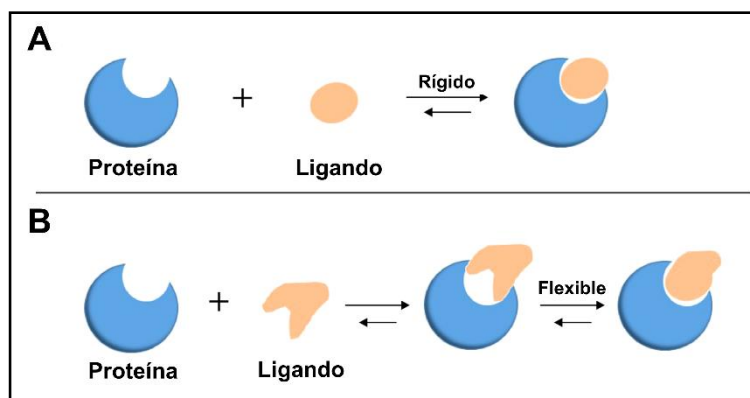


Figura 9-1. Procesos del acoplamiento molecular. **(A)** Basado en la complementariedad de las moléculas. **(B)** Permitiendo la flexibilidad del ligando (Fan *et al.*, 2019).

El PDB contiene más de 130 mil estructuras cristalográficas de proteínas de las cuales el 90% fueron obtenidas por difracción de rayos X (DRX) y un 9% por resonancia magnética nuclear (RMN) (Burley *et al.*, 2017). Las estructuras obtenidas por DRX con una resolución menor a los 3 Å son consideradas de una alta resolución (PDB RCSB, s/f-a, s/f-b). En RMN la estructura como se obtienen a partir de una solución. El archivo del PDB contiene un conjunto de estructuras de la proteína ya que está en constante movimiento, así como una estructura promedio (PDB RCSB, s/f-a). Para la elección del cristal de RMN se debe consultar el reporte de validación de la estructura, donde comparan el modelo con datos experimentales y determinan la calidad del cristal.

La β -lactoglobulina (β -LG) es la principal proteína globular presente en el suero de leche y se encuentra en forma de dímero en un intervalo de pH entre 2.5 a 7.5 (Xiang & Melton, 2018). En la Figura 9-2A se observa que la proteína está formada principalmente por nueve hojas β antiparalelas (A-I) y entre las hojas B-H se forma el Cáliz, además el Sitio C se ubica entre una α -hélice cercana al grupo carboxilo terminal (C-terminal). Estos son los principales sitios de interacción para ácidos grasos y polifenoles (Domínguez-Ramírez *et al.*, 2013; Oancea *et al.*, 2018; Rovoli *et al.*, 2018; Xiang & Melton, 2018). También, se ha encontrado que en la interfaz del dímero (Figura 9-2B) hay interacción con compuestos como el resveratrol, vitamina D₃ y la lactosa (Domínguez-Ramírez *et al.*, 2013). Asimismo, se ha reportado que la β -LG presenta una serie de transiciones estructurales inducidas por el cambio del pH entre 2.0 y 8.0. A un pH de 7.0 presenta la transición de Tanford, la cual implica un cambio de conformación del loop flexible formado entre las hojas β E-F, donde este adquiere una conformación abierta debido a que el Glu89 es desprotonado lo que permite la accesibilidad de los compuestos a la cavidad del Cáliz (Sakurai & Goto, 2007).

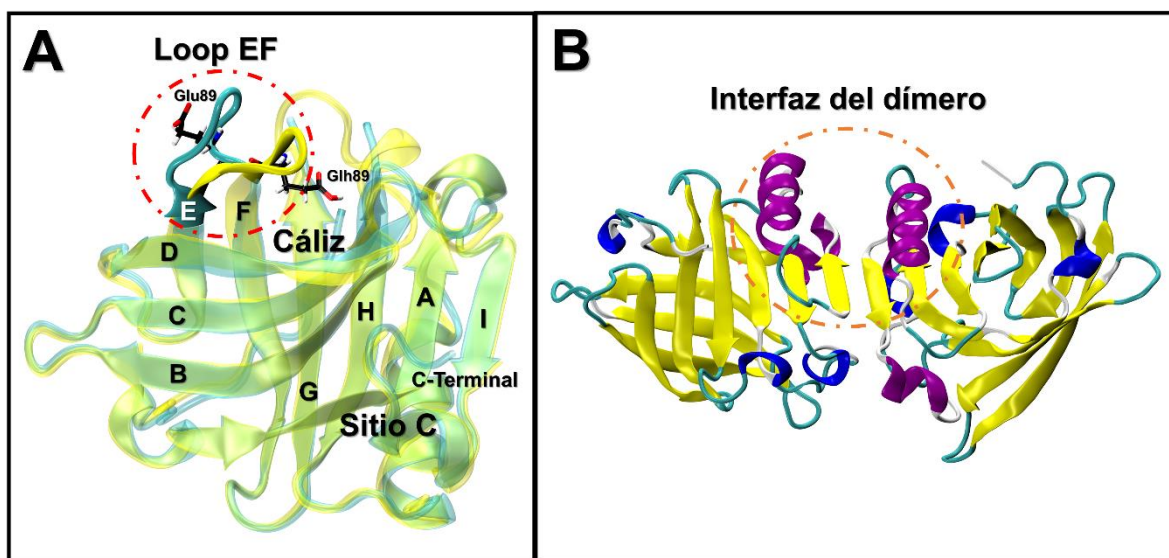


Figura 9-2. Regiones de interacción de compuestos en la β -LG **(A)** Estructura cristalográfica de la β -LG a pH 6.5 (amarillo) donde se observa en la región del Cáliz el loop EF cerrado (círculo línea punteada roja) y el ácido glutámico protonado (Glu89); el cristal a pH 7.4 (cyan) con el loop EF abierto y con el Glu89 desprotonado. **(B)** Representación del dímero de la β -LG. Estructuras secundarias: α -hélices (morado); hojas β plegadas (amarillo); hélices 3_{10} (azul); *random coil* (blanco); asas (cyan).

En los últimos años se han realizado estudios sobre la distribución de la AFM1 durante la elaboración de quesos, así como la evaluación de la afinidad que tiene la



micotoxina por las proteínas de la leche (Barbiroli *et al.*, 2007; Brackett & Marth, 1982; Chavarría *et al.*, 2017; Jiménez-Pérez *et al.*, 2020; López *et al.*, 2001; Manetta *et al.*, 2009; Motawee & McMahon, 2009). Sin embargo, existen pocos estudios de acoplamiento molecular que reporten la interacción de las aflatoxinas con alguna proteína (Bagheri & Fatemi, 2018; Bren *et al.*, 2014; Jiménez-Pérez *et al.*, 2020; Poór *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2017).

El objetivo de este capítulo fue evaluar la interacción de la AFM1 con cristales de la β -LG reportados en PDB a diferentes pH empleando *AD*, para determinar los parámetros de unión: K_u y ΔG_u .

9.3 METODOLOGÍA

9.3.1 Obtención de estructuras cristalográficas

Se buscaron todos los modelos estructurales de la β -LG reportadas en el PDB. Una vez identificadas se realizó una selección de acuerdo con la resolución y pH de cristalización para evaluar posibles cambios estructurales.

9.3.1.1 Comparación de las estructuras cristalográficas

Se realizó la comparación de los modelos estructurales de la β -LG a diferentes pH. Con uso de la herramienta *MatchMaker* del programa *UCSF Chimera* v.1.14 se sobrepusieron las estructuras mediante un alineamiento de las secuencias de aminoácidos con el algoritmo *Needleman-Wunsch*. El mejor alineamiento de las cadenas se determinó con base a la desviación estándar a partir de los carbonos alfa para cada residuo ente el cristal referencia y el modelo (RMSD-ca) calculado con la matriz de *BLOSUM-62* (Meng *et al.*, 2006).

9.3.2 Acoplamiento molecular

Se adicionaron los átomos de hidrógeno faltantes en los modelos estructurales de acuerdo con los valores del pKa de los aminoácidos titulables calculados en el servidor *PlayMolecule* mediante la herramienta *ProteinPrepare* (Martínez-Rosell *et al.*, 2017) con base al pH de cristalización reportados de cada estructura.

La predicción de la forma de unión de la AFM1 con los diferentes modelos de la β -LG se realizó utilizando el programa *AutoDock* 4.2. Las determinaciones de los puntos rotables



de la micotoxina y la delimitación del espacio de búsqueda (*grid*) para cada región de la proteína se realizó empleando la herramienta *AutoDockTools* (Morris *et al.*, 2009).

El *grid* se ubicó con base a los residuos que pertenecen a los sitios de unión del Cáliz, Sitio C y la interfaz del dímero previamente reportados (Domínguez-Ramírez *et al.*, 2013; Oancea *et al.*, 2018; Rovoli *et al.*, 2018; Xiang & Melton, 2018). Las dimensiones del *grid* en puntos para el Cáliz, Sitio C e interfaz del dímero fueron las siguientes (x, y, z): (80, 80, 80), (60, 60, 60) y (90, 90, 50), respectivamente. Considerando un espaciado de 0.375 Å entre cada punto.

La K_u y ΔG_u de cada complejo β -LG-AFM1 en los diferentes sitios de unión se calcularon utilizando el *Algoritmo Genético de Lamarckian* (Morris *et al.*, 1998). En resumen, el número de corridas del algoritmo genético fue de 100 y se consideró un tamaño de población inicial de 150 genes con un máximo de 2×10^3 generaciones y 25×10^6 evaluaciones de energía. Las imágenes de los complejos de la β -LG-AFM1 y los esquemas de las interacciones se obtuvieron utilizando los programas *VMD* v1.9.3 (Humphrey *et al.*, 1996), *PyMol* v2.4.0 (Schrödinger LLC, 2015) y *BIOVIA Discovery Studio Visualizer* v20.1.0.19295.

9.4 RESULTADOS

9.4.1 Modelos estructurales de la β -LG

En el PDB se encontraron 74 modelos estructurales de β -LG, de los cuales dos (Código PDB: 1CJ5 y 1DV9) fueron obtenidos por RMN a un pH de 2.0. Además, se seleccionaron tres cristales de DRX a diferentes pH con una resolución menor a 3 Å (Cuadro 9.1).

Cuadro 9-1. Estructuras cristalográficas de la β -LG obtenidos a diferentes pH de cristalización mediante DRX.

Código PDB	pH cristalización	Resolución del cristal (Å)	Referencia
1BEB	6.5	1.80	Brownlow <i>et al.</i> (1997)
4GNY	7.4	1.64	Gutiérrez-Magdaleno <i>et al.</i> (2013)
2BLG	8.2	2.46	Qin <i>et al.</i> (1998)

9.4.1.1 Comparación de los modelos estructurales

De acuerdo con el reporte de validación de los dos modelos de RMN de la β -LG, el que presentó la mejor calidad fue el PDB 1DV9. Por lo tanto, esta se tomó como referencia para compararlo con los cristales obtenidos por DRX. En el Cuadro 9-2, se reportan los valores del RMSD-ca obtenidos al comparar cada cristal de DRX con el de RMN, y se puede ver que la estructura a pH de 2.0 es muy diferente en comparación con los cristales a pH de 6.5, 7.4 y 8.2. Además, se observa que a partir del pH 6.5 la estructura de la β -LG no tienen grandes cambios conformacionales en comparación con los cristales a pH 7.4 y 8.2, asimismo, hay muy poca diferencia entre estas dos últimas estructuras. Con lo que se concluye que la variación del pH induce a cambios estructurales en la proteína.

Cuadro 9-2. Diferencias entre las estructuras cristalografías de la β -LG obtenidas a diferentes pH con base al RMSD-ca.

Cristal de referencia (PDB)	pH	RMSD-ca (Å)			
		1DV9	1BEB	4GNY	2BLG
1DV9	2.0	0.000	2.592	2.675	2.782
1BEB	6.5		0.000	0.554	0.543
4GNY	7.4			0.000	0.391
2BLG	8.2				0.000

RMSD-ca: Desviación estándar entre los carbonos alfa de los residuos

En la Figura 9-3 se presentan los cambios estructurales de acuerdo con el pH de cristalización. Como se observa en la Figura 9-3A, en los modelos a pH 2.0 y 6.5 el Glu89 está protonado y el loop EF se encuentra en su conformación cerrada. Mientras que a pH 7.4 y 8.2 el loop EF está en su forma abierta con el Glu89 desprotonado (Figura 9-3B). Con estos resultados se confirma que a un pH mayor a 7.0, la proteína tuvo la transición de Tanford generando la apertura del loop EF y dejando la posibilidad de que la AFM1 pueda ingresar a la cavidad del Cáliz, coincidiendo con lo reportado previamente por Sakurai & Goto (2007). Además, en la región del Sitio C se observan cambios conformacionales principalmente en la estructura de *random coil* del modelo a pH 2.0 (Figura 9-3A) en comparación con los otros cristales.

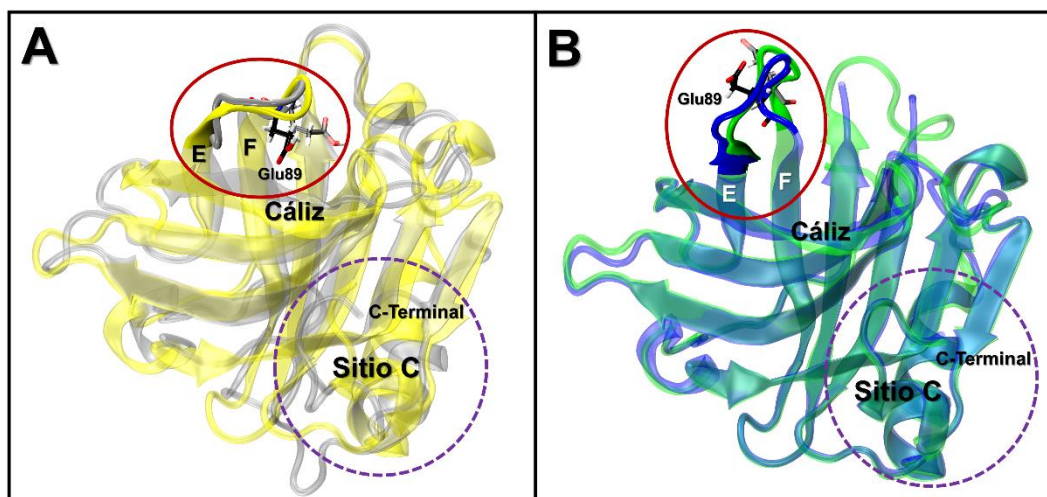


Figura 9-3. Efecto del pH en la conformación del loop EF (ovalo línea roja) de la región del Cáliz de la β -LG. **(A)** Conformación cerrada con estructuras a pH 2.0 (gris) y 6.5 (amarillo). **(B)** Conformación abierta con estructuras a pH 7.4 (azul) y 8.2 (verde). Región del Sitio C delimitado por ovalo con línea punteada violeta.

En la Figura 9-4 se presentan los modelos estructurales de la β -LG a diferente pH. Como se puede ver, la longitud de la cavidad del Cáliz entre los residuos Leu87-Leu39 e Ile79-Ser116 varían en función del pH. En el Cuadro 9-3 se presentan las distancias que hay entre los residuos que delimitan la cavidad, observando que hay una menor distancia entre la Leu87-Leu39 en los modelos a pH 2.0 y 6.5 en comparación con los de pH 7.4 y 8.2. Con base a estos resultados es evidente que hay una menor área superficial en la entrada a la cavidad del Cáliz, por lo que a pH menores a 7.4 la AFM1 no podrá ingresar. Por otro lado, también se puede observar que la región del Sitio C a un pH 2.0 presenta una menor área superficial (Figura 9-4A), esto debido a que el área superficial global de la proteína va aumentando conforme el pH se incrementa (Cuadro 9-3).

Cuadro 9-3. Longitud de la cavidad del Cáliz delimitada entre los residuos Leu87-Leu39 e Ile71-Ser116, así como el área superficial de la β -LG a los diferentes pH.

Código PDB	pH	Distancia (Å)		Área superficial global (Å ²)
		Leu87-Leu39	Ile71-Ser116	
1DV9	2.0	8.21	15.06	16.336x10 ³
1BEB	6.5	6.75	16.85	17.697x10 ³
4GNY	7.4	16.74	18.94	18.022x10 ³
2BLG	8.2	16.61	17.80	18.739x10 ³

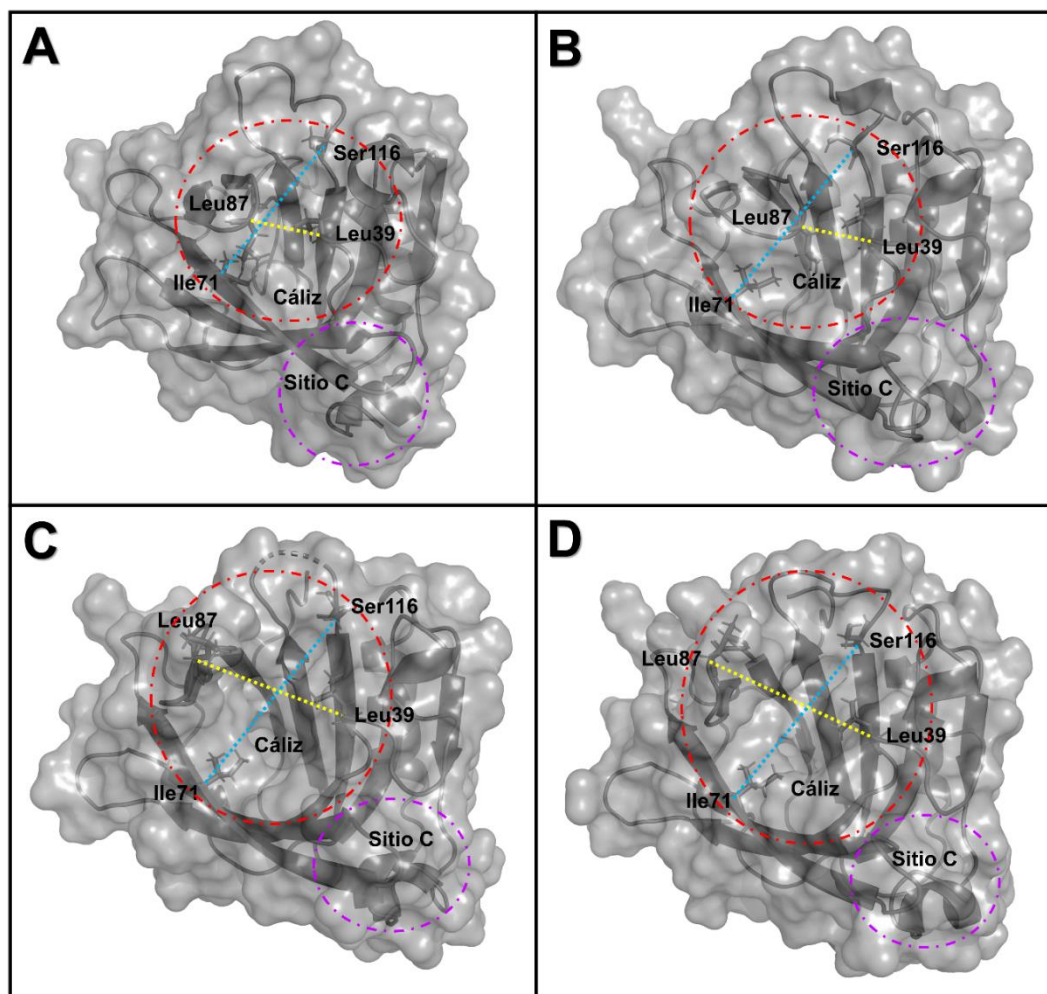


Figura 9-4. Modelos estructurales de la β -LG obtenidas a diferentes pH. Región del Cáliz indicado por línea punteada roja; Sitio C por línea punteada violeta. Distancia entre la Leu87-Leu39 (línea punteada amarilla); Ile71-Ser116 (línea punteada azul). **(A)** pH de 2.0. **(B)** pH de 6.5. **(C)** pH de 7.4. **(D)** de 8.2.



9.4.2 Acoplamiento molecular

Basados en los análisis de los cambios conformacionales de la β -LG debido al pH, es muy probable que haya efectos en la interacción de la AFM1 con los diferentes modelos estructurales de la proteína.

9.4.2.1 Interacciones de la AFM1 en la región del Cáliz

La formación de complejos en la región del Cáliz es la más reportada, especialmente para ácidos grasos y polifenoles. Por lo cual se realizó la evaluación de la interacción de la AFM1 en esta región. Asimismo, se ha observado que, si la conformación del loop EF se encuentra cerrada, esto puede impedir el paso de la micotoxina a la cavidad del Cáliz.

9.4.2.1.1 Interacciones de la AFM1 con el loop EF cerrado

En la Figura 9-5 se presentan los resultados obtenidos del acoplamiento molecular de la AFM1 con los modelos de la β -LG a pH 2.0 y 6.5. Como se puede ver, cuando el loop EF está en conformación cerrada no permitió que la AFM1 se uniera en la cavidad del Cáliz, confirmando que el área de la cavidad del Cáliz es más estrecha (mencionado en la sección 9.4.1.1). Mientras que, en la Figura 9-5A, en el modelo de pH 2, se observa la formación del complejo β -LG-AFM1 se ubicó en la parte externa del Cáliz, cerca del Sitio C. Además, en la Figura 9-5B se puede ver que se presentan interacciones hidrofóbicas del tipo Alkyl con los residuos Cys66 y Leu57, así como la formación de puentes de hidrógeno (P-H) con el Glu45, Gln59 y Gln159. Mientras que en la estructura a pH 6.5 (Figura 9-5C), el complejo se formó cerca del loop EF. Las interacciones hidrofóbicas del tipo Alkyl y Amida-Pi apilada, así como la formación de P-H convencionales y del tipo Carbono-Hidrógeno (C-H) fueron las que contribuyeron a la formación del complejo β -LG-AFM1 (Figura 9-5D).

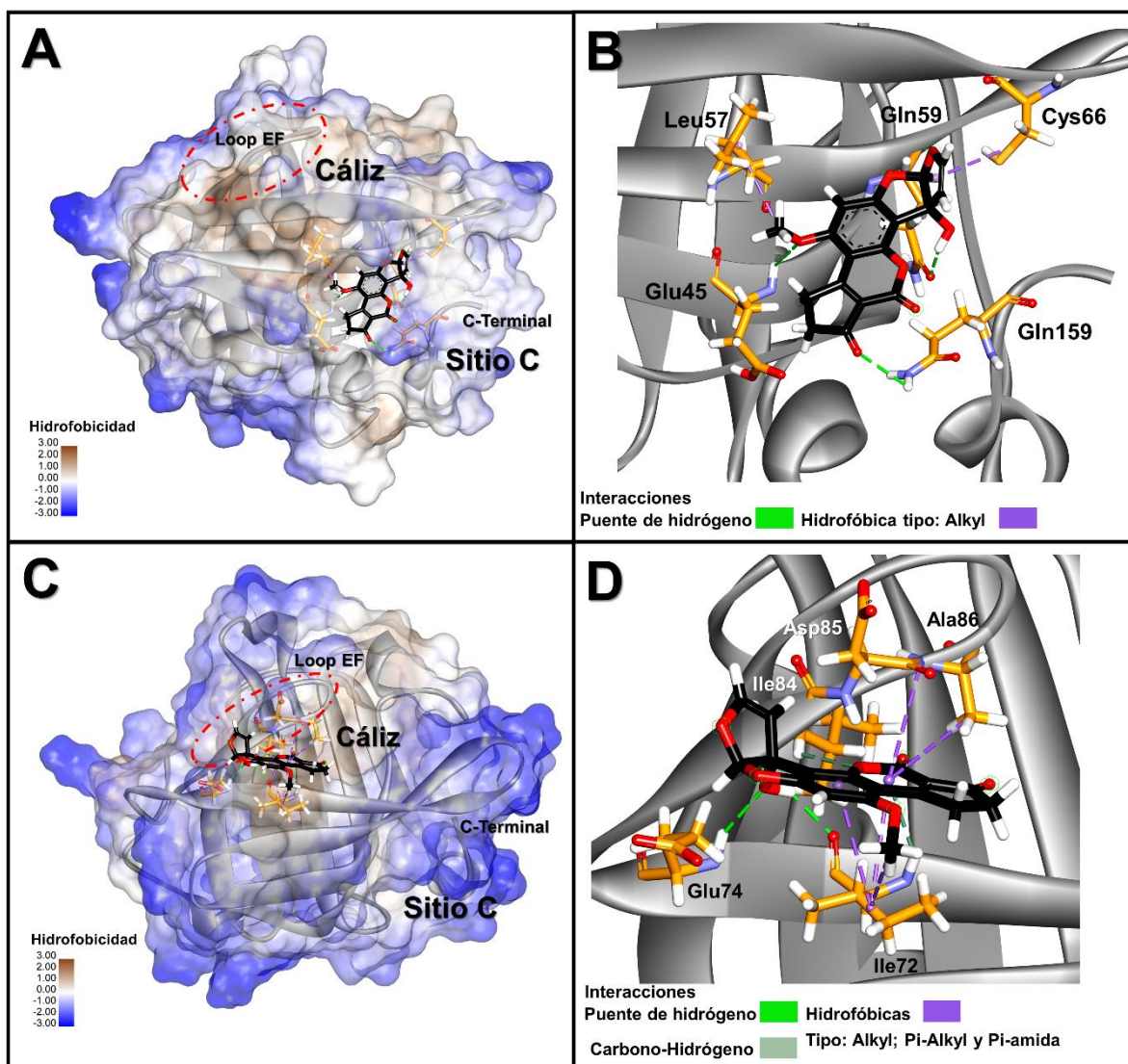


Figura 9-5. Modelos estructurales de la β -LG a diferente pH. **(A)** Complejo formado fuera de la región del Cáliz con el modelo a pH 2.0. **(B)** Tipo de interacciones que contribuyen a la formación del complejo a pH 2.0. **(C)** Complejo formado cerca del LF que forma parte del Cáliz con el modelo a pH 6.5. **(D)** Tipo de interacciones que contribuyen a la formación del complejo a pH 6.5.

Finalmente, no hay reportes de la interacción de compuestos con la β -LG por debajo de pH 7.5. Sin embargo, con base a los parámetros de unión de la AFM1 con los modelos de la β -LG a pH 2.0 y 6.5 (Cuadro 9-4) cuando el loop EF se encuentre cerrado, se puede ver que no fue impedimento para que la AFM1 se uniera a la proteína. Además, la ΔG_u obtenida a pH 6.5 es similar a la reportada en el Capítulo 8 (Secc. 8.6) sobre la interacción de la AFM1 con la α -LA ($\Delta G_u = -26.07 \text{ kJ mol}^{-1}$).

Cuadro 9-4. Parámetros de unión obtenidos de la interacción de la AFM1 con los modelos de la β -LG a un pH de 2.0 y 6.5 en la región del Cáliz.

Código PDB	pH	K_u (M^{-1})	ΔG_u ($kJ\ mol^{-1}$)
1DV9	2.0	3.47×10^4	-26.11
1BEB	6.5	1.60×10^5	-29.71

K_u : Constante de unión; ΔG_u : Energía libre de unión.

9.4.2.1.2 Interacciones de la AFM1 con el LF abierto

Los resultados sobre la formación del complejo β -LG-AFM1 en la cavidad del Cáliz cuando el loop EF se encuentra de forma abierta con los cristales a pH 7.4 y 8.2 son presentados en la Figuras 9-6. Encontrando que la AFM1 se unió en la región del Cáliz en ambos pH. En la Figura 9-6A se puede ver que la micotoxina formó el complejo con la β -LG a pH de 7.4 en una región cercana a la obtenida en el modelo a pH 6.5 (Figura 9-5C). Además, en la Figura 9-6B se observan la formación de P-H e interacciones hidrofóbicas del tipo Pi-Alkyl. Por otro lado, con el modelo a pH 8.2 la AFM1 se unió en la cavidad del Cáliz (Figura 9-6C). Asimismo, como se ve en la Figura 9-6D, presenta mayores interacciones hidrofóbicas del tipo Alkyl y Pi-Alkyl y la formación de P-H convencionales, así como del tipo C-H. En los complejos formados β -LG-AFM1 a los pH de 7.4 y 8.2 presentaron interacciones con los residuos cercanos a la Ile71 que se tomó como referencia para determinar la longitud del Cáliz (Figura 9-4). Asimismo, los residuos que interaccionan con la AFM1 para los dos pH (Figuras 9-6B y D) coinciden con los reportados por diversos autores que forman parte de la región del Cáliz (Domínguez-Ramírez *et al.*, 2013; Oancea *et al.*, 2018; Rovoli *et al.*, 2018; Xiang & Melton, 2018). Finalmente, la K_u y la ΔG_u obtenidas para estos pH son similares como se puede ver en el Cuadro 9-5. Con lo que se puede concluir que no hay diferencia en la afinidad de la micotoxina a estos pH.

Cuadro 9-5. Parámetros de unión obtenidos de la interacción de la AFM1 con los modelos de la β -LG a un pH de 7.4 y 8.2 en la región del Cáliz.

Código PDB	pH	K_u (M^{-1})	ΔG_u ($kJ\ mol^{-1}$)
4GNY	7.4	1.46×10^4	-23.77
2BLG	8.2	2.04×10^4	-24.60

K_u : Constante de unión; ΔG_u : Energía libre de unión.

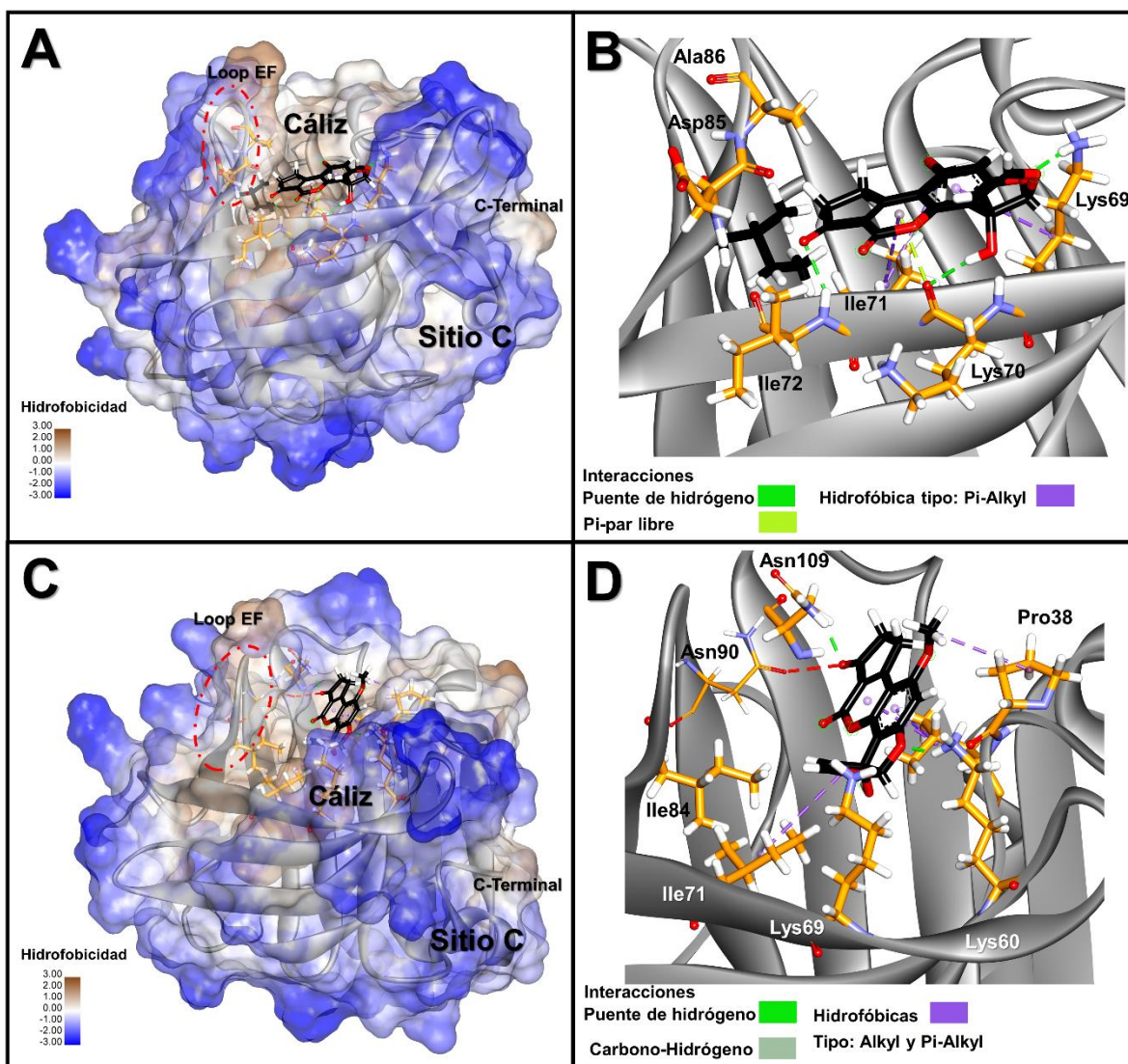


Figura 9-6. Moldeos estructurales de la β -LG a diferente pH. **(A)** Complejo formado en la región del Cáliz con el cristal a pH 7.4. **(B)** Representación con superficie que muestra cómo se encuentra abierta la cavidad del Cáliz. **(C)** Complejo formado en la cavidad de la región del Cáliz del cristal a pH 8.2. **(D)** Representación con superficie que muestra cómo se une la AFM1 en la cavidad del Cáliz.

Además, se ha reportado que la β -LG pertenece a la familia de las lipocalinas, y que en la cavidad del Cáliz se unen principalmente ácidos grasos (Gutiérrez-Magdaleno *et al.*, 2013). Al comparar los parámetros de unión de la AFM1 con el modelo a pH de 7.4 con los reportados para otros compuestos al mismo pH (Cuadro 9-6), se puede ver que la β -LG presenta una mayor afinidad de unión con la AFM1 en comparación con el ácido cáprico. Además, Loch *et al.* (2018) realizaron una mutación en de los residuos Leu39 e Ile56

sustituyéndolos por una Ala y Phe, respectivamente. Esto para aumentar el área de la cavidad del Cáliz. A pesar de esto, se puede ver que la afinidad por la AFM1 es mayor que lo reportado para la clorpromazina. Con base a estos resultados se puede concluir que la micotoxina es capaz de competir por la unión en la región del Cáliz con ácidos grasos.

Cuadro 9-6. Parámetros de unión de diferentes compuestos con la β -LG a un pH de 7.4 en la región del Cáliz.

Compuesto	K_u (M^{-1})	ΔG_u ($kJ\ mol^{-1}$)	Referencia
AFM1	1.46×10^4	-23.77	Este trabajo
Clorpromazina	8.10×10^3	-22.00	Loch <i>et al.</i> (2018)
Sulfato de dodecilo	5.20×10^5	-32.63	Gutiérrez-Magdaleno <i>et al.</i> (2013)
Ácido cáprico	6.00×10^3	N/R	Loch <i>et al.</i> (2011)

N/R: No Reportado; K_u : Constante de unión; ΔG_u : Energía libre de unión.

9.4.2.2 Efecto del pH en la formación del complejo β -LG-AFM1 en la región del Sitio C

Como se pudo ver en los resultados de la formación del complejo β -LG-AFM1 en la región del Cáliz, en particular con el modelo a pH 2.0, se observó que la micotoxina se une cerca de la región del Sitio C. Por lo cual es necesario realizar el análisis de la interacción en esta región.

De acuerdo con los resultados presentados en la Figura 9-7, la región donde interaccionó la AFM1 en el Sitio C se encuentra en la parte posterior tomando como referencia la entrada a la cavidad del Cáliz. Como se puede ver para el modelo a pH 2.0 (Figura 9-7A) se forma una cavidad con un carácter hidrofóbico y de acuerdo con la Figura 9-7B las principales interacciones que contribuyen a la formación del complejo son hidrofóbicas del tipo Alkyl y Pi-Alkil. En comparación con el modelo a pH 6.5 (Figura 9-7C) la micotoxina interacciona en la superficie del Sitio C. Asimismo, con esta estructura solo se formaron P-H convencionales y del tipo C-H. Asimismo, en el Cuadro 9-7 se presentan los parámetros de unión obtenidos para los complejos β -LG-AFM1 formados con los modelos a pH 2.0 y 6.5, como se puede ver a pH 6.5 la β -LG presenta una mayor afinidad por la micotoxina, lo cual se puede atribuir al hecho de que a este pH no presenta interacciones hidrofóbicas y la unión solo es debida a la formación de P-H convencionales y los del tipo C-H, los cuales contribuyen a una mayor estabilidad del complejo.

Cuadro 9-7. Parámetros de unión obtenidos de la interacción de la AFM1 con los cristales de la β -LG a un pH de 2.0 y 6.5 en la región del Sitio C.

Código PDB	pH	K_u (M^{-1})	ΔG_u ($kJ\ mol^{-1}$)
1DV9	2.0	6.65×10^4	-27.53
1BEB	6.5	1.07×10^5	-28.70

K_u : Constante de unión; ΔG_u : Energía libre de unión.

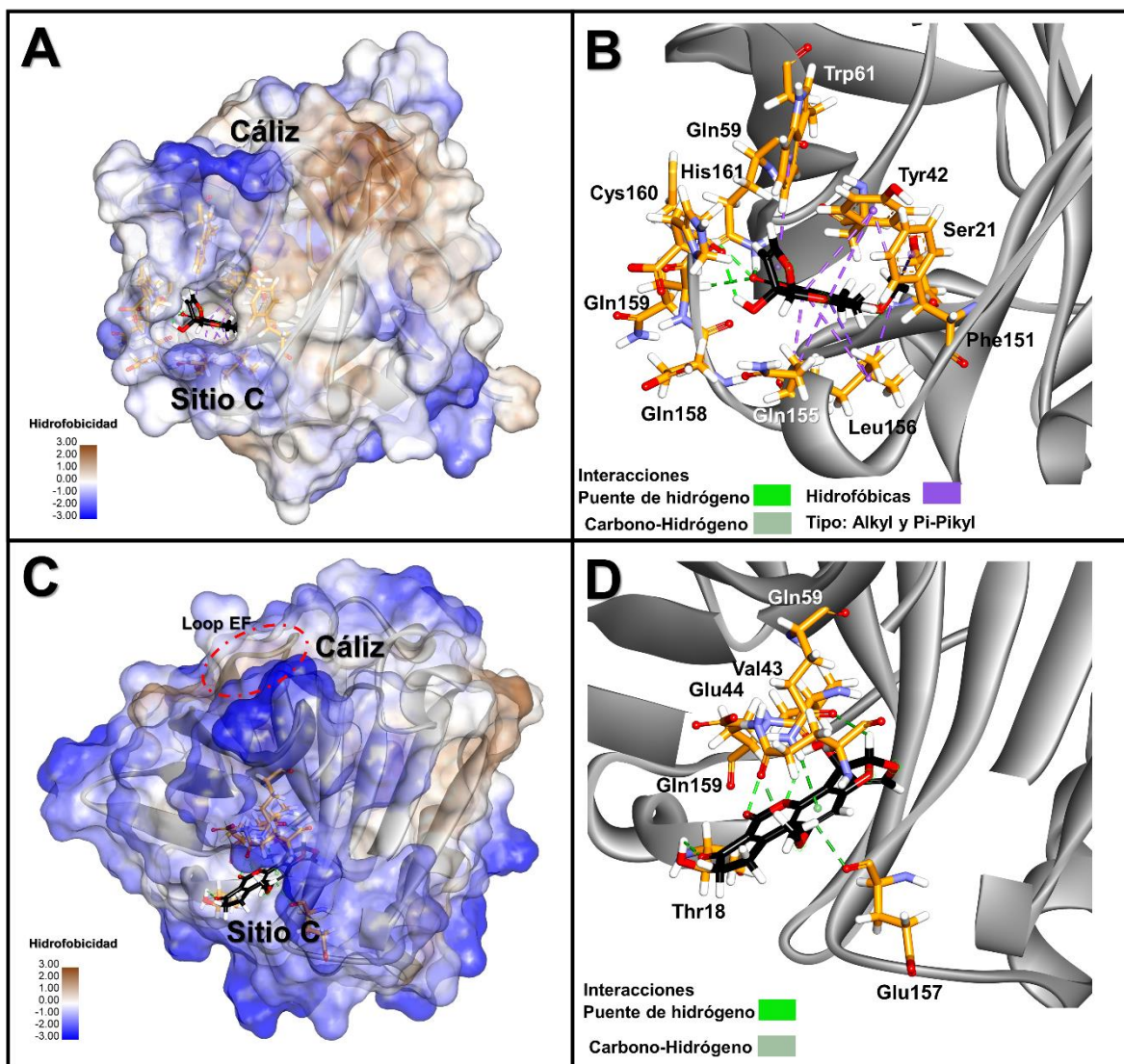


Figura 9-7. Modelos estructurales de la β -LG a pH de 2.0 y 6.5. **(A)** Complejo formado en la cavidad hidrofóbica del Sitio C con el modelo a pH 2.0. **(B)** Tipo de interacciones que contribuyen a la formación del complejo a pH 2.0. **(C)** Complejo formado en la superficie del Sitio C con el modelo a pH 6.5. **(D)** Tipo de interacciones que contribuyen a la formación del complejo a pH 6.5.



Como se pudo ver a un pH de 2.0 se forma una cavidad hidrofóbica pero conforme se aumenta el pH esta desaparece. Esto se puede confirmar al observar los resultados de la interacción de la AFM1 con los modelos de la β -LG a los pH de 7.4 y 8.2 presentados en las Figuras 9-8A y C. Como se ve en las Figuras 9-8B y D hay menos residuos que interaccionan con la AFM1 en comparación con los obtenidos con los modelos a pH 2.0 y 6.5 (Figuras 9-7B y D), además que no hay interacciones hidrofóbicas. Con base a estos resultados, la afinidad de la AFM1 va disminuyendo conforme aumenta el pH, esto se confirma con los parámetros de unión determinados para estos dos modelos reportados en el Cuadro 9-8. Finalmente, Domínguez-Ramírez *et al.* (2013) evaluaron la interacción de la lactosa con el PDB 2BLG, y reportaron una ΔG_u de $-26.78 \text{ kJ mol}^{-1}$, por lo que podemos decir que la β -LG tiene mayor afinidad por la lactosa en comparación con la AFM1. Asimismo, como se puede ver en los resultados de la interacción de la micotoxina en el Sitio C, conforme se aumenta el pH no se forman interacciones hidrofóbicas, con lo que se puede concluir que la β -LG presenta una mayor afinidad por compuestos hidrofílicos en esta región.

Cuadro 9-8. Parámetros de unión obtenidos de la interacción de la AFM1 con los modelos de la β -LG a un pH de 7.4 y 8.2 en la región del Sitio C.

Código PDB	pH	K_u (M^{-1})	ΔG_u (kJ mol^{-1})
4GNY	7.4	9.03×10^4	-28.28
2BLG	8.2	1.11×10^3	-17.36

K_u : Constante de unión; ΔG_u : Energía libre de unión.

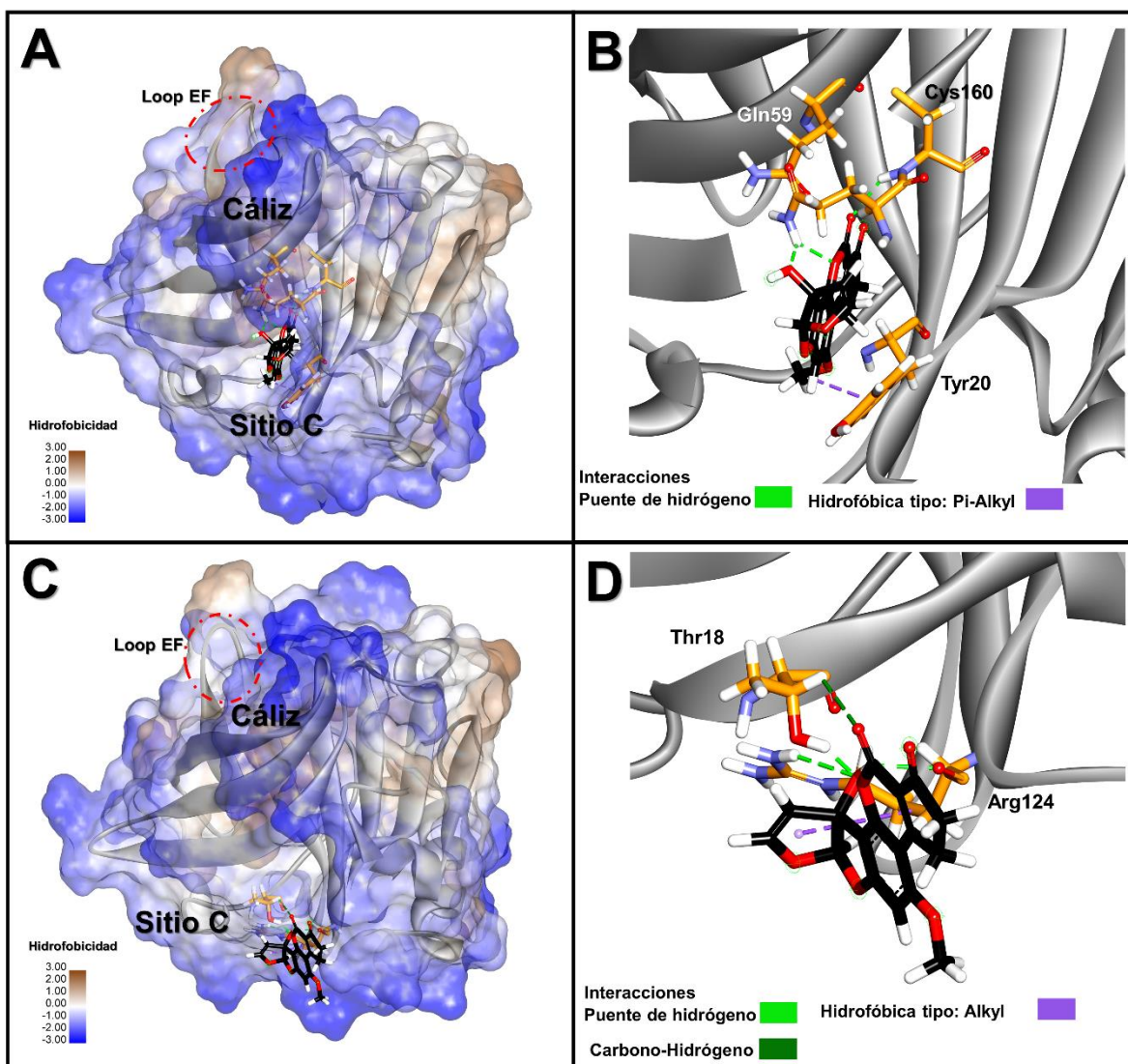


Figura 9-8. Modelos estructurales de la β -LG a pH de 7.4 y 8.2. **(A)** Complejo formado en la superficie del Sitio C con el modelo a pH 7.4. **(B)** Tipo de interacciones que contribuyen a la formación del complejo a pH 7.4. **(C)** Complejo formado en la superficie del Sitio C con el modelo a pH 8.2. **(D)** Tipo de interacciones que contribuyen a la formación del complejo a pH 8.2.

9.4.2.3 Interacciones de la AFM1 en la interfaz del dímero

Debido a que se sabe que la β -LG se encuentra en forma de dímero a pH de 2.5 a 7.5, se realizó la evaluación de la interacción de la micotoxina en esta región con los modelos estructurales a pH 6.5 y 7.4.

En la Figura 9-9A se puede ver la formación del complejo β -LG-AFM1 con el dímero a un pH de 6.5, el cual ubico en el centro de la interfaz entre las dos α -hélices. Además, se

observa que las interacciones hidrofóbicas son las que tienen un aporte mayoritario en la formación del complejo (Figura 9-9B).

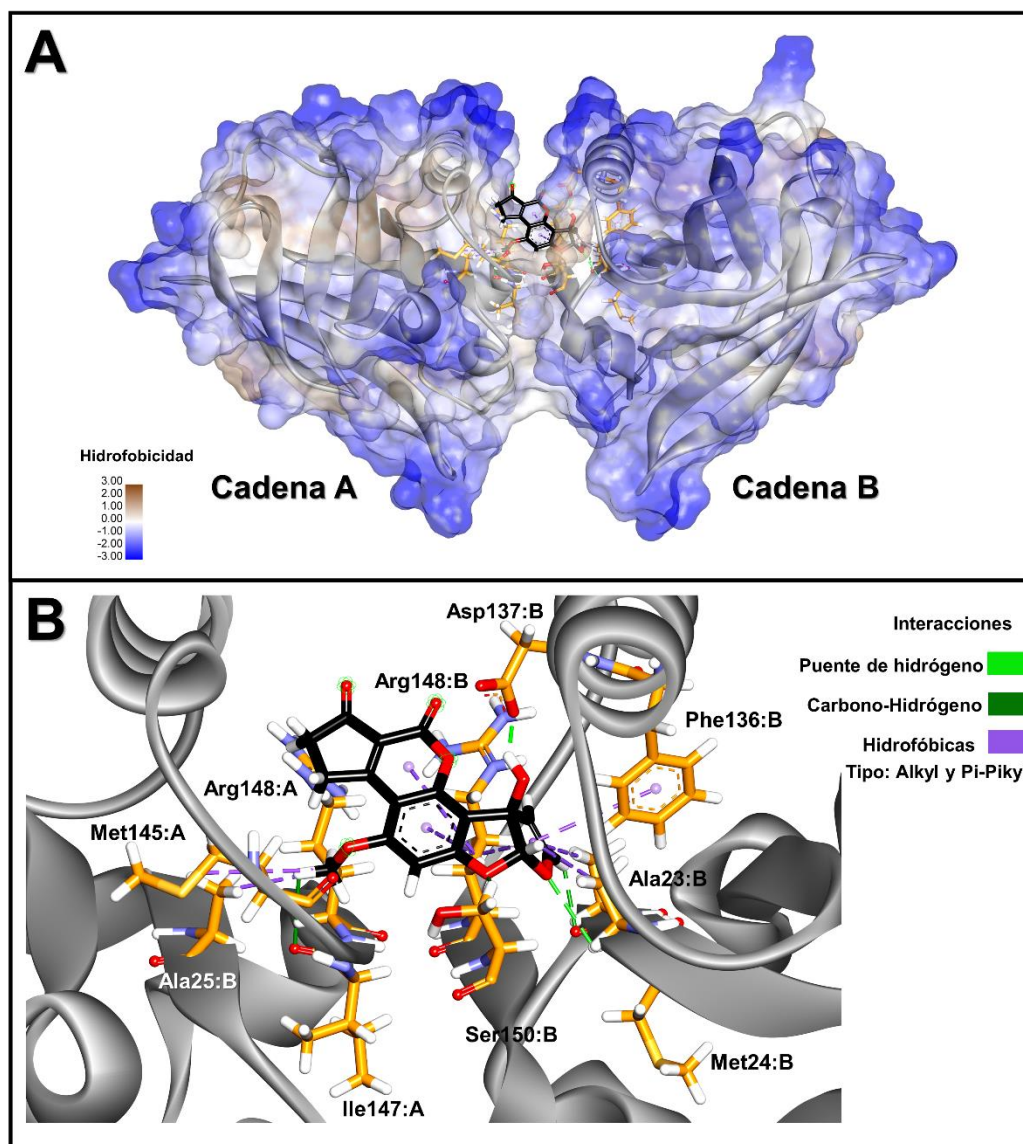


Figura 9-9. Modelo estructural del dímero de la β -LG a pH de 6.5. **(A)** Complejo formado en la interfaz del dímero. **(B)** Tipo de interacciones que contribuyen a la formación del complejo a pH 6.5.

Por otro lado, en la Figura 9-10A se puede ver que la AFM1 se une en un extremo de la interfaz del dímero a un pH de 7.4. Además, se puede observar en la Figura 9-10B que los residuos que interacción para formar el complejo son menos en comparación con el de pH 6.5 (Figura 9-9B).

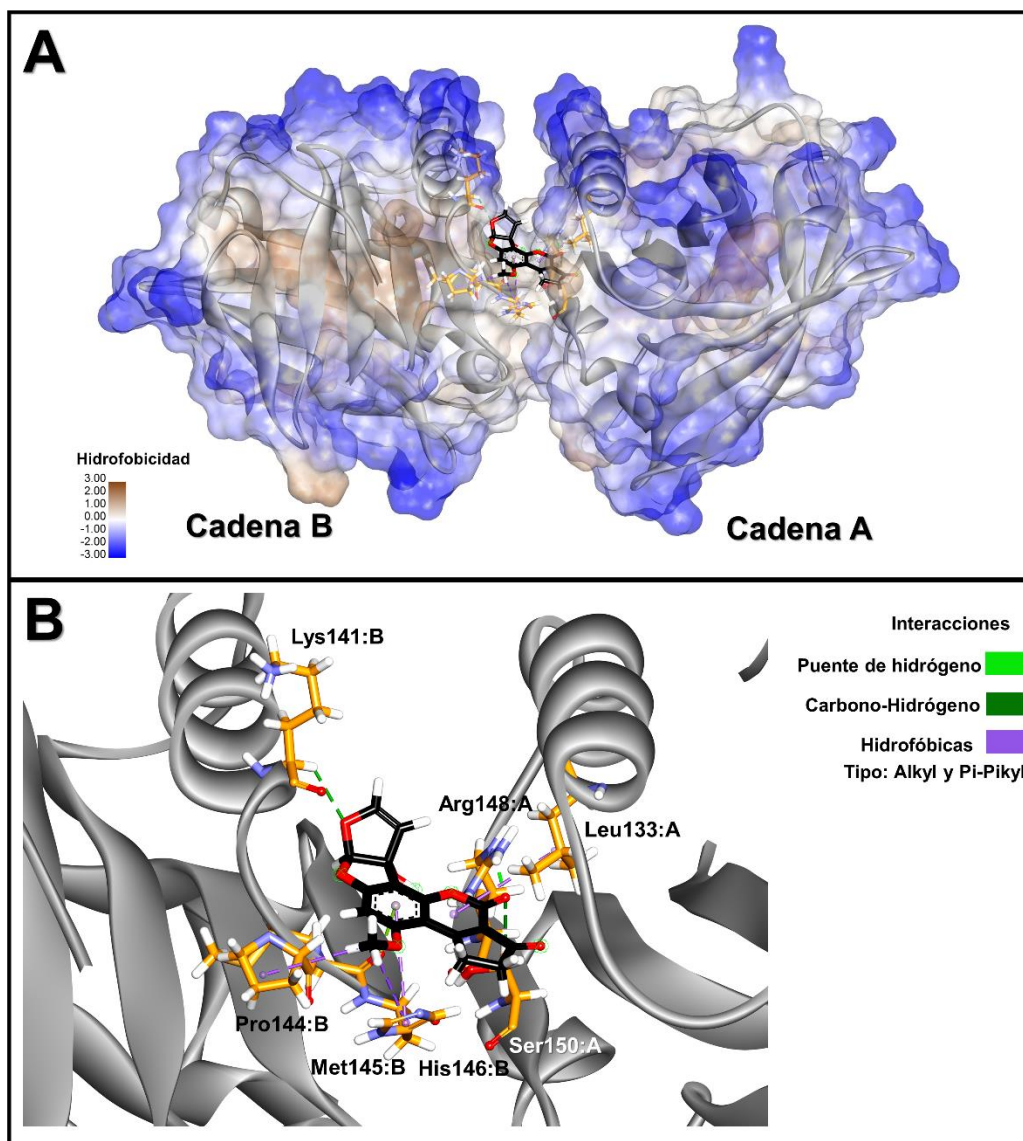


Figura 9-10. Modelo estructural del dímero de la β -LG a pH de 7.4. **(A)** Complejo formado en la interfaz del dímero. **(B)** Tipo de interacciones que contribuyen a la formación del complejo a pH 7.4.

Finalmente, los parámetros de unión obtenidos para los dímeros se reportan en el Cuadro 9-8, observando que son similares a pesar de que haya más residuos interaccionando con el dímero a pH de 6.5. Adicionalmente, en el trabajo de Domínguez-Ramírez *et al.* (2013) evaluaron la interacción de la lactosa en la interfaz del dímero del a pH de 8.2 en el cual biológicamente la β -LG no está en forma de dímero, tuvieron que formarlo con apoyo de un programa computacional. Reportando que la vitamina D₃ y la lactosa se unen a la interfaz con una ΔG_u de -33.47 y 26.78 kJ mol⁻¹, respectivamente. Al comparar estos resultados con los de este trabajo (Cuadro 9-8) se puede ver que la lactosa



tiene una ΔG_u similar a la del dímero a pH de 7.4 y en el caso de la Vitamina D₃ esta es superior a la de los cristales evaluados en este trabajo.

Cuadro 9-9. Parámetros de unión obtenidos de la interacción de la AFM1 con los dímeros de la β -LG a un pH de 6.5 y 7.4 en la región del Sitio C.

Código PDB	pH	K_u (M ⁻¹)	ΔG_u (kJ mol ⁻¹)
1BEB	6.5	8.18×10^4	-28.03
4GNY	7.4	4.83×10^4	-26.74

K_u : Constante de unión; ΔG_u : Energía libre de unión.

9.5 CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos en este capítulo, se comprobó que la AFM1 se puede unir a la β -LG a pesar de los cambios conformacionales que sufre por la variación del pH. En la región del Cáliz se observó que la AFM1 presenta una mayor K_u y ΔG_u con el modelo estructural a pH 6.5, a pesar de que a este pH el loop EF se encuentra cerrado.

En el caso del Sitio C, se determinó que esta región forma una cavidad hidrofóbica a un pH de 2.0 y conforme se aumenta el pH va adquiriendo una naturaleza más hidrofílica. Asimismo, a pH 6.5 se presentó la mayor afinidad de la proteína por la AFM1. Por último, cuando la proteína está en forma de dímero la afinidad por la AFM1 no se ve afectada por el cambio de pH a pesar de que la ubicación donde se forma el complejo se diferente.

Con base a los resultados obtenidos, es muy probable que en la leche la AFM1 este formando complejos con la β -LG en los tres sitios de unión reportados, debido a que el pH fisiológico de la leche es cercano a 6.5.

Por otro lado, es muy probable que, durante el proceso de coagulación ácida para la elaboración de queso, se cierre el loop EF en el Cáliz y al mismo tiempo se forme la cavidad hidrofóbica en la región del Sitio C por lo que aún se podría formar el complejo β -LG-AFM1. Esta capacidad de la proteína de formar el complejo a pesar de los cambios en el pH puede explicar la variabilidad de la concentración de la AFM1 durante la producción de los quesos u otros derivados de la leche.



9.6 BIBLIOGRAFÍA

- Bagheri, M. y Fatemi, M., 2018. Fluorescence spectroscopy, molecular docking and molecular dynamic simulation studies of HSA-Aflatoxin B1 and G1 interactions. *Journal of Luminescence Elsevier B.V.*, 202: 345–353.
- Barbiroli, A., Bonomi, F., Benedetti, S., Mannino, S., Monti, L., Cattaneo, T. y Iametti, S., 2007. Binding of aflatoxin M1 to different protein fractions in ovine and caprine milk. *Journal of dairy science Elsevier*, 90: 532–40.
- Brackett, R. y Marth, E., 1982. Association of aflatoxin M1 with casein. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung* 174: 439–441.
- Bren, U., Fuchs, J. y Oostenbrink, C., 2014. Cooperative Binding of Aflatoxin B 1 by Cytochrome P450 3A4: A Computational Study. *Chemical Research in Toxicology* 27: 2136–2147.
- Brownlow, S., Morais Cabral, J., Cooper, R., Flower, D., Yewdall, S., Polikarpov, I., North, A. y Sawyer, L., 1997. Bovine-lactoglobulin at 1.8 Å resolution-still an enigmatic lipocalin. *Structure* 5: 481–495.
- Burley, S., Berman, H., Kleywegt, G., Markley, J., Nakamura, H. y Velankar, S., 2017. Protein Data Bank (PDB): The Single Global Macromolecular Structure Archive. En: Wlodawer, A., Dauter, Z. y Jaskolski, M. (eds.) *Protein Crystallography. Methods in Molecular Biology*. Humana Press, New York, NY., , pp. 627–641.
- Chavarría, G., Molina, A., Leiva, A., Méndez, G., Wong-González, E., Cortés-Muñoz, M., Rodríguez, C. y Granados-Chinchilla, F., 2017. Distribution, stability, and protein interactions of aflatoxin M1 in fresh cheese. *Food Control* 73: 581–586.
- Considine, T. y Flanagan, J., 2009. Interaction between milk proteins and micronutrients. En: Thompson, A., Boland, M. y Singh, H. (eds.) *Milk proteins: from expression to food*. Elsevier, New Zeland, , pp. 377–407.
- Domínguez-Ramírez, L., Del Moral-Ramírez, E., Cortes-Hernández, P., García-Garibay, M. y Jiménez-Guzmán, J., 2013. β -lactoglobulin's conformational requirements for ligand binding at the calyx and the dimer interphase: A flexible docking study. *PLoS ONE* 8: 1–13.
- Fan, J., Fu, A. y Zhang, L., 2019. Progress in molecular docking. *Quantitative Biology* 7: 83–89.
- Gaillard, T., 2018. Evaluation of AutoDock and AutoDock Vina on the CASF-2013 Benchmark. *Journal of Chemical Information and Modeling* 58: 1697–1706.
- Gutiérrez-Magdaleno, G., Bello, M., Portillo-Téllez, M., Rodríguez-Romero, A. y García-Hernández, E., 2013. Ligand binding and self-association cooperativity of β -lactoglobulin. *Journal of Molecular Recognition* 26: 67–75.
- Humphrey, W., Dalke, A. y Schulten, K., 1996. VMD: Visual Molecular Dynamics. *Journal of Molecular Graphics* 14: 33–38.



International Agency for Research on Cancer, (IARC), 2012. Aflatoxins. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, 100F. , pp. 225–248.

Jiménez-Pérez, C., Tello-Solís, S., Gómez-Castro, C., Alatorre-Santamaría, S., Gómez-Ruiz, L., Rodríguez-Serrano, G., Cruz-borbolla, J., García-Garibay, M. y Cruz Guerrero, A., 2020a. Spectroscopic studies and molecular modelling of the aflatoxin M1-bovine α -lactalbumin complex formation. *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology Elsevier B.V*, 209: 111957.

Jiménez-Pérez, C., Tello-Solís, S.R., Gómez-Castro, C.Z., Alatorre-Santamaría, S., Gómez-Ruiz, L., Rodríguez-Serrano, G., Cruz-Borbolla, J., García-Garibay, M. y Cruz-Guerrero, A., 2020b. Spectroscopic studies and molecular modelling of the aflatoxin M1-bovine α -lactalbumin complex formation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 209: 111957.

Livney, Y., 2010. Milk proteins as vehicles for bioactives. *Current Opinion in Colloid and Interface Science Elsevier Ltd*, 15: 73–83.

Loch, J., Bonarek, P., Tworzydło, M., Łazińska, I., Szydłowska, J., Lipowska, J., Rzęsikowska, K. y Lewiński, K., 2018. The engineered β -lactoglobulin with complementarity to the chlorpromazine chiral conformers. *International Journal of Biological Macromolecules* 114: 85–96.

Loch, J., Polit, A., Görecki, A., Bonarek, P., Kurpiewska, K., Dziejicka-Wasylewska, M. y Lewiński, K., 2011. Two modes of fatty acid binding to bovine β -lactoglobulin-crystallographic and spectroscopic studies. *Journal of Molecular Recognition* 24: 341–349.

López, C., Ramos, L., Ramadán, S., Bulacio, L. y Perez, J., 2001. Distribution of aflatoxin M1 in cheese obtained from milk artificially contaminated. *International Journal of Food Microbiology* 64: 211–215.

Manetta, A., Giammarco, M., Giuseppe, L., Fusaro, I., Gramenzi, A., Formigoni, A., Vignola, G. y Lambertini, L., 2009. Distribution of aflatoxin M1 during grana padano cheese production from naturally contaminated milk. *Food Chemistry Elsevier Ltd*, 113: 595–599.

Martínez-Rosell, G., Giorgino, T. y De Fabritiis, G., 2017. PlayMolecule ProteinPrepare: A Web Application for Protein Preparation for Molecular Dynamics Simulations. *Journal of Chemical Information and Modeling* 57: 1511–1516.

Meng, E., Pettersen, E., Couch, G., Huang, C. y Ferrin, T., 2006. Tools for integrated sequence-structure analysis with UCSF Chimera. *BMC Bioinformatics* 7: 1–10.

Morris, G., Goodsell, D., Halliday, R., Huey, R., Hart, W., Belew, R. y Olson, A., 1998. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *Journal of Computational Chemistry* 19: 1639–1662.

Morris, G., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M., Belew, R., Goodsell, D. y Oson, A., 2009. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of Computational Chemistry* 30: 2785–2791.



Motawee, M. y McMahon, D., 2009. Fate of aflatoxin M1 during manufacture and storage of feta cheese. *Journal of Food Science* 74: 42–45.

Nguyen, N., Nguyen, T., Pham, T.N., Huy, N., Bay, M., Pham, M., Nam, P., Vu, V. y Ngo, S., 2020. Autodock Vina adopts more accurate binding poses but Autodock4 forms better binding affinity. *Journal of Chemical Information and Modeling* 60: 204–211.

Oancea, A., Aprodu, I., Râpeanu, G., Bahrim, G. y Stanciuc, N., 2018. The binding mechanism of anthocyanins from sour cherries (*Prunus cerasus* L) skins to bovine β -lactoglobulin: A fluorescence and in silico-based approach. *International Journal of Food Properties Taylor & Francis*, 20: S3096–S3111.

PDB RCSB, ., s/f. Methods for determining atomic structures. Disponible en: <https://pdb101.rcsb.org/learn/guide-to-understanding-pdb-data/methods-for-determining-structure>.

PDB RCSB, s/f. Resolution. Disponible en: <https://pdb101.rcsb.org/learn/guide-to-understanding-pdb-data/resolution>.

Poór, M., Bálint, M., Hetényi, C., Gődér, B., Kunsági-Máté, S., Kőszegi, T. y Lemli, B., 2017. Investigation of non-covalent interactions of aflatoxins (B1, B2, G1, G2, and M1) with serum albumin. *Toxins* 9: 1–12.

Qin, B., Bewley, M., Creamer, L., Baker, H., Baker, E. y Jameson, G., 1998. Structural basis of the tanford transition of bovine β -lactoglobulin. *Biochemistry* 37: 14014–14023.

Rovoli, M., Thireou, T., Choiset, Y., Haertlé, T., Sawyer, L., Eliopoulos, E. y Kontopidis, G., 2018. Thermodynamic, crystallographic and computational studies of non-mammalian fatty acid binding to bovine β -Lactoglobulin. *International Journal of Biological Macromolecules Elsevier B.V.*, 118: 296–303.

Sakurai, K. y Goto, Y., 2007. Principal component analysis of the pH-dependent conformational transitions of bovine beta-lactoglobulin monitored by heteronuclear NMR. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 15346–51.

Schrödinger LLC, ., 2015. The PyMOL molecular graphics system. Schrödinger, LLC.

Vieira, T. y Sousa, S., 2019. Comparing AutoDock and Vina in ligand/decoy discrimination for virtual screening. *Applied Sciences (Switzerland)* 9, doi:10.3390/app9214538.

Wang, Y., Liu, J., Zhang, L., He, X. y Zhang, J., 2017. Computational search for aflatoxin binding proteins. *Chemical Physics Letters* 685: 1–8.

Xiang, L. y Melton, L., 2018. Interactions of β -lactoglobulin with small molecules. *Encyclopedia of Food Chemistry Elsevier*, 2: 560–565.

10 CONCLUSIONES GENERALES

Debido a los riesgos a la salud que conlleva la presencia de la AFM1 en la leche y sus derivados, se realizó una revisión bibliográfica para conocer la situación del contenido de la micotoxina en los productos lácteos elaborados y consumidos en México. Encontrando que hay pocas investigaciones al respecto en los últimos 20 años. Además, hay deficiencias en la normativa mexicana, ya que ésta solo estipula un límite del contenido de AFM1 en la leche y no hay limitaciones para sus derivados, en particular para el queso. En la revisión se encontró que hay estudios que determinaron la presencia de la AFM1 en muestras de quesos tipo panela y oaxaca con niveles por encima de lo permitido en la norma mexicana para leche.

Por otro lado, ya que hay evidencias de que la AFM1 se concentra en los quesos que son elaborados con leche contaminada, se realizó la evaluación de la interacción de la AFM1 con la α -LA bovina por métodos espectroscópicos y acoplamiento molecular. Determinando que la forma de interacción de la micotoxina es principalmente por interacciones hidrofóbicas en las regiones de la caja hidrofóbica y el grupo aromático I de la proteína. Asimismo, por los estudios de DC se observó que hay un posible ordenamiento de las estructuras secundarias de la proteína por lo que el complejo α -LA-AFM1 puede estabilizarse. Con base a lo observado por los métodos espectroscópicos y el acoplamiento molecular es muy probable que la α -LA sea un vehículo para la AFM1.

Además, como se sabe que las proteínas sufren cambios conformacionales debido a la variación del pH y que, durante la producción de quesos, puede haber una disminución del pH para precipitar a las proteínas. Se evaluó el efecto del pH en la interacción de la AFM1 con diferentes modelos estructurales de la β -LG a pH de 2.0, 6.5, 7.4 y 8.4 mediante la herramienta de acoplamiento molecular en tres sitios de unión: el Cáliz, Sitio C y la interfaz del dímero. Encontrando que a pesar de que la proteína si presenta cambios en su estructura la AFM1 es capaz de formar complejos en todos los pH evaluados. Observando que al pH de 6.5 la ΔG_b es similar en los tres sitios de unión.

Con base a los resultados obtenidos en este trabajo, se puede concluir que las proteínas α -LA y β -LG son capaces de interaccionar y transportar la AFM1 cuando está presente en la leche, debido a que se obtuvieron los mayores parámetros de interacción a un pH de 6.5, el cual está cercano al pH fisiológico de la leche. Asimismo, al estudiar la afinidad de la β -LG por la AFM1 al variar el pH se observó que esta disminuye conforme se



aumenta el pH por lo que estos cambios pueden explicar la variabilidad de la concentración de la micotoxina en la cuajada y el suero de leche durante la elaboración de queso.



11 PERSPECTIVAS

A partir de los resultados obtenidos en esta tesis doctoral, los experimentos que se proponen para continuar evaluando la interacción de las proteínas de la leche con la AFM1 son:

Evaluar la estabilidad de los complejos α -LA-AFM1 y β -LG-AFM1 obtenidos por acoplamiento molecular a diferentes temperaturas mediante dinámicas moleculares para determinar su estabilidad.

Obtener los parámetros termodinámicos de la interacción de la AFM1 con la β -LG por espectroscopía de fluorescencia y dicroísmo circular a los pH modelados por acoplamiento molecular.

Mediante dicroísmo circular determinar los cambios estructurales de la β -LG debido al efecto de la variación del pH, así como durante la adición de diferentes concentraciones de la AFM1.

Realizar los mismos estudios experimentales y computacionales con las dos proteínas evaluadas en esta tesis, pero con la aflatoxina B1, debido a que en la revisión bibliográfica se encontró dicha micotoxina está en la leche y quesos producidos en México.

12 ANEXO I

12.1 OPTIMIZACIÓN GEOMÉTRICA DE LA AFM1

La estructura 3D de AFM1 (CID 15558498) se obtuvo de la base de datos PubChem. La optimización geométrica se llevó a cabo utilizando la teoría funcional de densidad (DFT) con el intercambio y correlación funcional de Perdew *et al.* (1996) y el conjunto de bases para todos los átomos del orbital 6-311 ++ G ** utilizando el programa *Gaussian 09 Rev. A.02* (Frisch *et al.*, 2016). Es importante señalar que el cálculo de las segundas derivadas se realizó para corroborar que existe un mínimo en la superficie de energía potencial. Los mapas de potencial electrostático se calcularon con el programa *Multiwfn*, versión 3.4 (Lu & Chen, 2012).

12.2 MAPAS DEL POTENCIAL ELECTROSTÁTICO DE AFM1

El mapa del potencial electrostático obtenido de AFM1 optimizado siguiendo la metodología DFT se muestra en la Figura 11-2, observándose que la región con mayor distribución de carga negativa (puntos mínimos) se encuentra en los grupos carbonilo del anillo cumarínico y el ciclo de pentanona con valores de $-234,42 \text{ kJ mol}^{-1}$. Para la región con mayor distribución de carga positiva, está presente el punto máximo ($172,84 \text{ kJ mol}^{-1}$) en la región del grupo hidroxilo del anillo difurano.

12.3 SELECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LA ESTRUCTURA CRISTALOGRÁFICA DE LA PROTEÍNA

Usando *Chimera 1.12 UCSF* (Pettersen *et al.*, 2004), se analizaron dos estructuras cristalinas de α -LA en su forma holo (con el ion calcio): la estructura nativa PDB ID 1F6S (Chrysina *et al.*, 2000) y el PDB ID 1HFZ recombinante (Pike *et al.*, 1996). La unidad biológicamente activa de ambas estructuras se alineó con *MatchMaker*, considerando las secuencias de aminoácidos utilizando el algoritmo *Needleman-Wunsch* y la matriz *BLOSUM62* (Meng *et al.*, 2006) para determinar el porcentaje de identidad y elegir la estructura a utilizar para realizar el cálculo de acoplamiento. El agua cristalizada se eliminó de las estructuras cristalinas seleccionadas, que se almacenaron en forma holo y apo (sin el ión calcio).

12.4 COMPARACIÓN DE CRISTALES DE α -LACTOALBÚMINA

No hubo diferencia en las estructuras terciarias de los cristales de las proteínas nativas (1F6R) y recombinantes (1HFZ) (Figura 11-3). El análisis de las secuencias y estructuras terciarias con *Chimera 1.12 UCSF* (Meng *et al.*, 2006) mostró un 99.19% de identidad y un valor bajo de la desviación cuadrática media (RMSD) para carbonos alfa (0.97 Å). Con base en estos resultados, llegamos a la conclusión de que no habría diferencias significativas entre las dos estructuras cristalinas. Por lo tanto, decidimos ocupar la estructura de la proteína bovina nativa para el acoplamiento molecular.

Cuadro 12-1. Constante de extinción (K_{sv}), cantidad de la constante de velocidad de extinción (k_q), energía libre de unión (ΔG_b), constante de unión (K_b) y sitios de unión (n) obtenidos de la interacción de α -La con AFM1 a diferentes temperaturas por fluorescencia espectroscopía.

Temperatura (K)	parámetros Stern-Volmer		K_u (M^{-1})	n	ΔG_u ($kJ\ mol^{-1}$)
	K_{sv} (M^{-1})	k_q ($M^{-1}\ s^{-1}$)			
298	5.90×10^3	2.27×10^{12}	2.12×10^3	1.32	-19.17
303	4.95×10^3	1.92×10^{12}	4.95×10^3	1.17	-21.06
308	2.88×10^3	1.11×10^{12}	7.20×10^3	1.09	-22.95

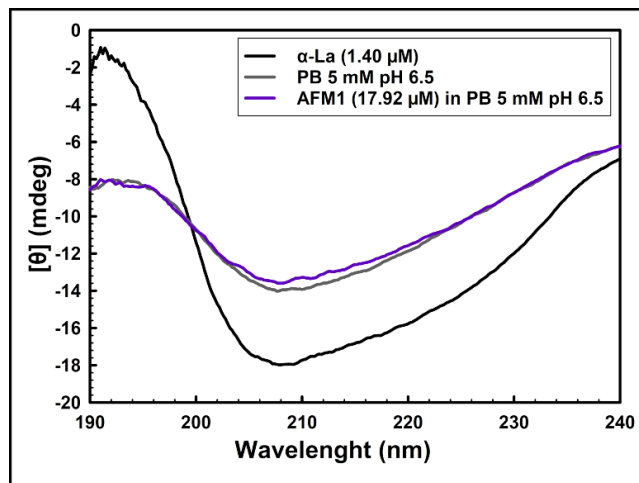


Figura 12-1. Espectros DC UV lejanos de α -LA (línea negra); BP solución 5 mM a pH 6.5 (línea gris) y AFM1 (17.92 μ M) en BP (línea púrpura) a 298 K.

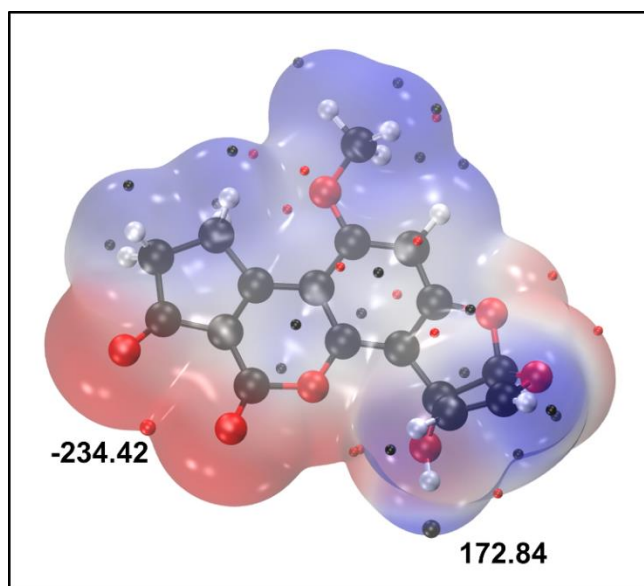


Figura 12-2. Mapas de potencial electrostático de AFM1. Superficie de mayor densidad de electrones (rojo) (Isovalor = 0.001).

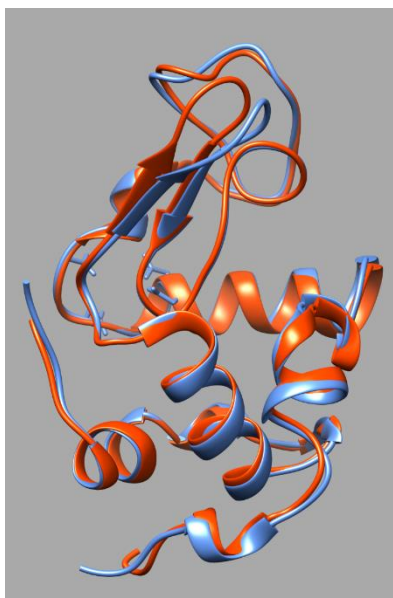


Figura 12-3. Comparación de las estructuras terciarias de los cristales de α -LA; cristal nativo (1F6R: naranja) y cristal recombinante (1HFZ: azul).

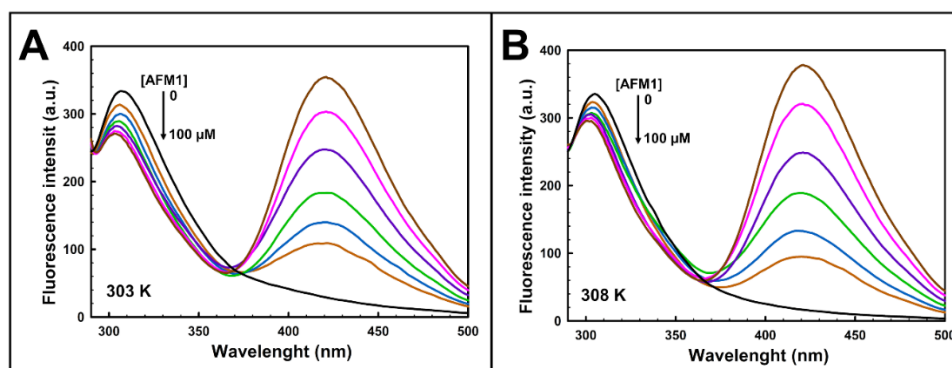


Figura 12-4. Espectros de fluorescencia de α -La titulada con diferentes concentraciones de AFM1 (0-100 μ M) a dos temperaturas **(A)** 303 K y **(B)** 308 K. La longitud de onda de excitación fue de 280 nm.

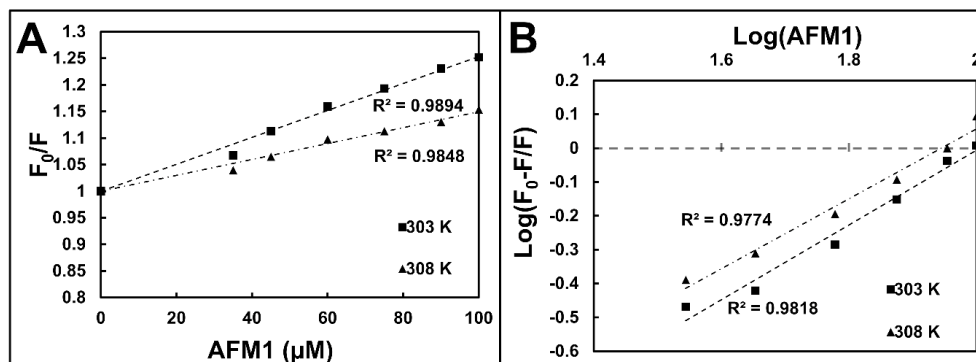


Figura 12-5. (A) Gráfico de Stern-Volmer para la extinción de la fluorescencia de α -La por AFM1 a 303 y 308 K. **(B)** Gráfico de Stern-Volmer modificado para el complejo α -La-AFM1 a 303 y 308 K.

12.5 BIBLIOGRAFÍA

Chrysina, E., Brew, K., & Acharya, K. (2000). Crystal structures of Apo- and holo-bovine α -lactalbumin at 2.2-Å resolution reveal an effect of calcium on inter-lobe interactions. *Journal of Biological Chemistry*, 275(47), 37021–37029. <https://doi.org/10.1074/jbc.M004752200>

Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E., Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V. M., B.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Caricato, M.; Li, X.; Hratchian, H., P.; Izmaylov, A. F.; Bloino, J.; Zheng, G.; Sonnenberg, J. L.; Hada, M., Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M. N., T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Vreven, T.; Montgomery, J. A., J., ... Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cioslowski, J.; Fox, D. J. (2016). *Gaussian 09 Revision A.02*. Wallingford, CT.

Lu, T., & Chen, F. (2012). Multiwfn: A multifunctional wavefunction analyzer. *Journal of Computational Chemistry*, 33(5), 580–592. <https://doi.org/10.1002/jcc.22885>

Meng, E., Pettersen, E., Couch, G., Huang, C., & Ferrin, T. (2006). Tools for integrated sequence-structure analysis with UCSF Chimera. *BMC Bioinformatics*, 7, 1–10. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-7-339>

Perdew, J., Burke, K., & Ernzerhof, M. (1996). Generalized Gradient Approximation Made Simple. *Physical review letters*, 77(18), 3865–3868. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.77.3865>



Pettersen, E., Goddard, T., Huang, C., Couch, G., Greenblatt, D., Meng, E., & Ferrin, T. (2004). UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*, 25(13), 1605–1612. <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>

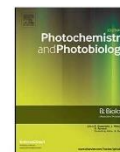
Pike, A., Brew, K., & Acharya, K. (1996). Crystal structures of guinea-pig, goat and bovine α -lactalbumin highlight the enhanced conformational flexibility of regions that are significant for its action in lactose synthase. *Structure*, 4(6), 691–703. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(96\)00075-5](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(96)00075-5)



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jphotobiol



Spectroscopic studies and molecular modelling of the aflatoxin M1-bovine α -lactalbumin complex formation



Carlos Jiménez-Pérez^a, Salvador R. Tello-Solís^b, Carlos Z. Gómez-Castro^d, Sergio Alatorre-Santamaría^a, Lorena Gómez-Ruiz^a, Gabriela Rodríguez-Serrano^a, Julián Cruz-Borbolla^d, Mariano García-Garibay^{a,c}, Alma Cruz-Guerrero^{a,*}

^a Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixco 186, Col. Vicentina, México 09340, Mexico

^b Departamento de Química, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixco 186, Col. Vicentina, México 09340, Mexico

^c Departamento de Ciencias de la Alimentación, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Lerma, Av. Hidalgo Poniente 46, Col. La Estación, Lerma de Villada, Edo. de México 52006, Mexico

^d Área Académica de Química, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Carretera Pachuca-Tulancingo Km 4.5, Pachuca, Hidalgo 42184, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:
 α -lactalbumin
 Aflatoxin M1
 Fluorescence spectroscopy
 Circular dichroism
 Molecular docking

ABSTRACT

Since the high incidence of aflatoxin M1 (AFM1) in milk and dairy products poses a serious risk to human health, this work aimed to investigate the complex formation between bovine α -lactalbumin (α -La) and AFM1 using different spectroscopic methods coupled with molecular docking studies. Fluorescence spectroscopy measurements demonstrated the AFM1 addition considerably reduced the α -La fluorescence intensity through a static quenching mechanism. The results indicated on the endothermic character of the reaction, and the hydrophobic interaction played a major role in the binding between AFM1 and α -La. The binding site stoichiometric value ($n = 1.32$) and a binding constant of $2.12 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ were calculated according to the Stern-Volmer equation. The thermodynamic parameters ΔH , ΔS and ΔG_b were determined at $93.58 \text{ kJ mol}^{-1}$, $0.378 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ and $-19.17 \pm 0.96 \text{ kJ mol}^{-1}$, respectively. In addition, far-UV circular dichroism studies revealed alterations in the α -La secondary structures when the α -La-AFM1 complex was formed. An increased content of the α -helix structures (from 35 to 40%) and the β -sheets (from 16 to 19%) were observed. Furthermore, protein-ligand docking modelling demonstrated AFM1 could bind to the hydrophobic regions of α -La protein. Overall, the gathered results confirmed the α -La-AFM1 complex formation.

1. Introduction

Aflatoxins are a group of mycotoxins produced mainly by filamentous fungi such as *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* [1]. Consumption of foods and beverages contaminated with these toxins, in particular with aflatoxin B1 (AFB1), poses a serious threat to public health since the latter is a well-documented class 1 carcinogen [1,2]. Fig. 1 shows the chemical structure of aflatoxin M1 (AFM1), which is an AFB1 metabolite. When cows are fed with the AFB1 contaminated feed, toxic AFM1 is produced in the animal liver and is further excreted into milk and urine [1]. Due to the high incidence of AFM1 in milk and dairy products, it is a matter of great importance to investigate and develop suitable prevention measures [2,3]. It has been reported the AFM1 concentration in cheese could be significantly higher than that in milk from which it is produced [4]. In addition, AFM1 content in cheese varies depending on cheese type, milk origin and manufacture process

[5]. In terms of the AFM1 distribution in curd and whey during cheese production process, there are no conclusive reports. Some authors claimed the higher content of the mycotoxin in curd [4,6], while the others determined the highest concentration of mycotoxin in whey [7,8]. On the other hand, Chavarría et al. [8] performed a comparative study of the purified milk proteins, among which α -lactalbumin (α -La) was found to exhibit a higher affinity towards AFM1 than casein, retaining 87.7 and 80.6% of mycotoxin, respectively. In another study, Barbiroli et al. [9] compared the AFM1 affinity towards the main protein fractions in ewe and goat milk during cheese production. It was established that AFM1 preferably bound to whey proteins (56–75%) in ewe milk, while a higher preference for caseins was observed in goat milk (53–62%).

The bovine α -La protein is characterized by two hydrophobic regions that were proved to play a role in protein-ligand interaction and transportation of bioactive compounds [10,11]. Among tested

* Corresponding author.
 E-mail address: aec@xanum.uam.mx (A. Cruz-Guerrero).

<https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2020.111957>
 Received 2 April 2020; Received in revised form 8 June 2020
 Available online 10 July 2020
 1011-1344/ © 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

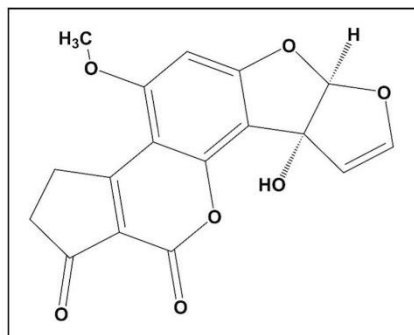


Fig. 1. Chemical structure of the aflatoxin M1 from PubChem (CID 1558498).

biomolecules were coumaric acid, ferulic acid [12], vitamin D₃ [13], genistein, kaempferol [14], trans-resveratrol, curcumin [15] and epigallocatechin-3-gallate [16]. Recently, protein-ligand docking studies revealed the location of the binding site for bioactive compounds in the hydrophobic box and aromatic group I of α -La [13–16]. Additionally, thermodynamic parameters for the α -La interaction with different compounds were determined using fluorescence spectroscopy [12–16]. Given the variability of the AFM1 content in milk and dairy products, the focus of this work was placed on studying the α -La-AFM1 complex formation using experimental (spectroscopic methods) and computational tools (molecular docking). Such combined approach allowed determining thermodynamic parameters of this interaction and gaining an insight into potential binding sites of the mycotoxin to α -La protein.

2. Materials and Methods

2.1. Materials

Absolute ethanol and α -La from bovine milk type I were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). AFM1 was purchased from Enzo Life Sciences, Inc. (New York, NY, USA). Potassium phosphate monobasic and potassium phosphate dibasic were obtained from J. T. Baker (Mexico State, Mexico). Experiments were carried out at pH 6.5 to simulate the physiological pH of milk. α -La solutions were prepared in 50 mM phosphate buffer (PB) at pH 6.5 for fluorescence spectroscopy, and 5 mM PB at pH 6.5 for UV-visible spectrophotometry (UV-vis) and circular dichroism (CD). A lower concentration of α -La used in UV-vis and CD experiments in comparison to fluorescence spectroscopy, aimed to avoid a possible protein aggregation. The exact concentration of protein was determined using an extinction coefficient $A_{1\text{cm}}^{1\%} = 20.1$ at 280 nm, as previously reported by Kronman & Andreotti [17]. AFM1 solutions were prepared in absolute ethanol at 3 mM for fluorescence spectroscopy and at 608 μM for UV-vis spectrophotometry and CD. A lower concentration of AFM1 implies fewer residues that affect the environment. All solutions were prepared daily and utilized instantly. All experiments were carried out in Mexico City at atmospheric pressure of 0.77 atm.

2.2. UV-vis Spectrophotometry

The UV-vis measurements were performed on a Shimadzu UV-1800 spectrophotometer (Tokyo, Japan) equipped with a Shimadzu temperature control TCC-20A (Tokyo, Japan). Briefly, 3.3 mL of the α -La solution (1.40 μM) were titrated with the 25 μL aliquots of AFM1 stock solution (608 μM) until reaching a final volume of 3.4 mL in a quartz cell with 1 cm pathlength. The obtained AFM1 concentrations were in a

range of 4.48 to 17.92 μM . At the end of the titration, the [AFM1]/[α -La] molar ratio was 12.8. Each titration aliquot was mixed manually and incubated for 3 min with magnetic stirring in a temperature-controlled cell holder to maintain a constant temperature. The UV-vis absorption spectra were recorded at 298 K over a wavelength range of 190–450 nm. All spectra were corrected using a PB spectrum (5 mM, pH 6.5) as a baseline.

2.3. Fluorescence Spectroscopy

Fluorescence measurements were performed on a fluorescence spectrophotometer PC1 from ISS (Champaign, IL, USA) equipped with a water-jacketed temperature control cell holder. Briefly, 2.9 mL of the α -La solution (10 μM) were titrated with the following volumes of the AFM1 stock solution (3 mM): 35, 10, 15, 15, 15 and 10 μL , until reaching a final volume of 3.0 mL in a fluorescence cell. The obtained AFM1 concentrations were in a range of 35 to 100 μM . At the end of the titration, the [AFM1]/[α -La] molar ratio was 10. Each aliquot of titration was performed as described in the UV-vis spectrophotometry. The excitation wavelength was set at 280 nm, and the emission spectra were recorded over a wavelength range of 290–500 nm. Both the excitation and emission slits widths were adjusted to 0.5 mm. The assays were carried out at 298, 303 and 308 K. All spectra were corrected using a PB spectrum (50 mM, pH 6.5) as a baseline.

2.4. Circular Dichroism

The effects of mycotoxin on the α -La secondary structures were monitored using a Jasco J-715 spectropolarimeter (Tokyo, Japan) equipped with a Peltier temperature control cell holder. CD values were reported as a mean residue ellipticity ($[\theta]_{\text{MWR}}$), which was calculated using a mean residue weight of 110 Da. The titration of α -La (3.3 mL, 1.40 μM) with different aliquots of AFM1 (608 μM) was carried out in a quartz cell with 1 cm pathlength at 298 K. At the end of titration, the [AFM1]/[α -La] molar ratio was determined at 12.8. Each aliquot of titration was performed as described in the UV-vis spectrophotometry. The far-UV CD spectra were recorded over a wavelength range of 190–240 nm. All spectra were corrected using a spectrum of AFM1 in PB (5 mM, pH 6.5) as a baseline. No differences were observed for the PB spectra without and with AFM1 (Fig. S1, supplementary material). It should be noted that the spectropolarimeter performs five CD measurements which average value comprises the final spectrum. In order to estimate the percentage of secondary structures, the CD data were analyzed by the *CDSSTR algorithm* using the reference data set *SP175* [18] which includes more protein structural types available in *DICHTHROWEB* [19].

2.5. Molecular Docking

Selection process of the α -La crystalline structure and optimization of the AFM1 structure are described in the supplementary material (Sections 1–4; Fig. S2 and S3).

The α -La-AFM1 interaction was modelled using *AutoDock 4.2* [20]. The structures of mycotoxin and protein were obtained using *AutoDockTools* with standardized parameters. Missing hydrogen atoms in the crystallographic structure of α -La were added according to the pK_a values of titratable amino acids calculated by *H++* [21] at pH 6.5.

The most favorable structure of the α -La-AFM1 complex, defined by its lowest binding free energy (ΔG_b), was obtained using a blind docking procedure in which the whole protein structure is involved. The ΔG_b value was determined using the *Lamarckian Genetic Algorithm* [22]. In brief, the number of genetic algorithms was adjusted to 100, and initial population size of 150 genes with a maximum of 2×10^3 generations and 25×10^5 energy evaluations were considered. The grid size was $84 \times 92 \times 126 \text{ \AA}$ with 0.375 \AA spacing and centered at the protein's

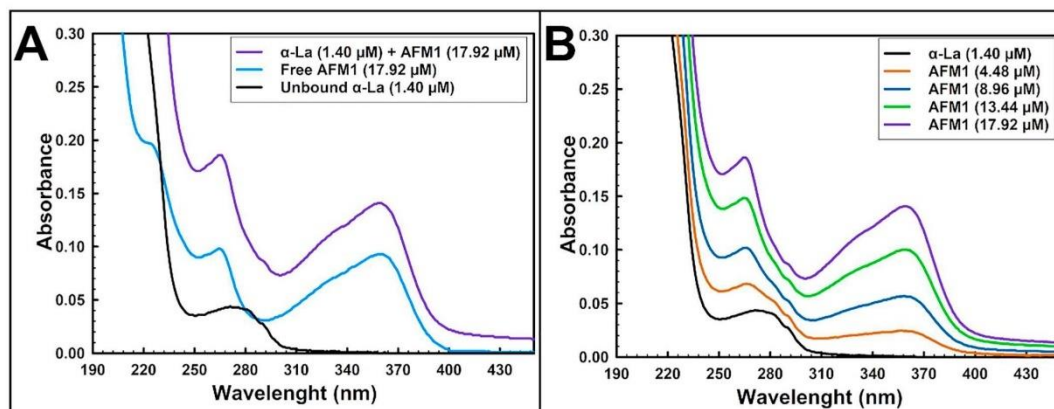


Fig. 2. (A) UV-vis absorption spectra of unbound α -La at 1.40 μ M (black line); free AFM1 (17.92 μ M) in PB (blue line) and titration point of α -La (1.40 μ M) with AFM1 (17.92 μ M) (purple line) at 298 K. (B) UV-vis absorption spectra of α -La at 1.40 μ M (black line) titrated with increasing concentrations of AFM1 in the range from 4.48 to 17.92 μ M (colored lines) at 298 K. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

geometric center. The images of α -La complexed with AFM1 and the hydrophobic interaction schemes were obtained using the VMD program [23] and LigPlot + [24], respectively.

3. Results and Discussion

3.1. UV-vis Spectrophotometry

UV-vis absorption spectroscopy was used to explore the structural changes of the α -La protein in the presence of ligand since such alterations would indicate on the complex formation [25,26]. Fig. 2A shows the UV-vis absorption spectra of the unbound α -La (black line) with the maximum absorption band at 280 nm, while free AFM1 in PB (blue line) is characterized by three major absorption maxima at 226, 265 and 356 nm and three absorption minima at 219, 252 and 290 nm. When α -La was titrated with 17.92 μ M mycotoxin (purple line) an increased absorption intensity for maxima at 265 and 356 nm was observed, while peak at 226 nm disappeared in comparison to free AFM1 spectra. Similarly, absorption intensity of the minima at 252 and 290 nm was higher during the titration than that recorded for the free ligand. Finally, the absorption minimum at 290 nm was red-shifted by 10 nm. The observed alternations of the UV-vis spectra around 280 nm could be explained by the microenvironmental changes near aromatic amino acids, such as Trp, Tyr and Phe, as previously reported by Jing et al. [27], indicating AFM1 could decrease the hydrophobicity around these residues. In addition, no changes in the UV-vis absorption spectra were observed during the titration course with increasing concentrations of mycotoxin as shown in Fig. 2B.

3.2. Fluorescence Spectroscopy

The main source of fluorescence in proteins are aromatic amino acids Trp, Tyr, and Phe. It was observed for several proteins that presence of aromatic residues was directly correlated with the observed fluorescence intensity. For this reason, the fluorescence spectroscopy is one of the most commonly used techniques to study protein-ligand complex formation, as well as it serves to determine the complex binding parameters [25,28].

3.2.1. Intrinsic Fluorescence Measurements

Since the inner filter effect (IFE) was observed in the ultraviolet

absorption spectra at excitation and emission wavelengths, when AFM1 was added to the α -La solution (Fig. 2B), the Eq. (1) [29] was used to correct the intensity of the fluorescence spectra during the α -La titration with AFM1:

$$F_{cor} = F_{obs} \times 10^{(A_{exc} - A_{em})/2} \quad (1)$$

where F_{cor} is the corrected fluorescence intensity and F_{obs} is the observed fluorescence intensity in the experiment, A_{exc} and A_{em} are the ultraviolet absorbances of all components at excitation and emission wavelength, respectively.

The fluorescence spectra recorded for α -La titrated with the increasing concentrations of AFM1 at 298 K are shown in Fig. 3A. The unbound protein has a maximum emission at 310 nm (black line). Reduction of α -La fluorescence intensity was observed upon the addition of AFM1, which is indicative for the apparent interaction with the mycotoxin. Moreover, the presence of isosbestic point at 370 nm is another evidence that interaction only involved AFM1 and α -La species, and stoichiometry of the reaction remained unchanged at 1:1 ratio when the α -La-AFM1 complex was formed. [30]. Likewise, no difference in the fluorescence spectra recorded for α -La titrated with AFM1 at 303 and 308 K were observed in comparison to the one at 298 K (supplementary material Fig. S4). The obtained results are consistent with the previous reports of Mohammadi & Moeeni [15] and Bagheri & Fatemi [31] who obtained similar fluorescence spectra for α -La-trans-resveratrol complex and human serum albumin-AFB1 complex, respectively. Finally, the presence of second emission band with maximum at 420 nm observed in Fig. 3A corresponds to AFM1 which was corroborated by PB titration with AFM1, as shown in Fig. 3B. Furthermore, upon the addition of AFM1 to the α -La solution (Fig. 3A) the decreased intensity of free AFM1 was observed at 420 nm in comparison to that observed in Fig. 3B.

3.2.2. Fluorescence Quenching Mechanism

Quenching of protein fluorescence occurs when proteins interact with other molecules called quenchers. Three quenching mechanisms have been described so far: dynamic quenching (collisional process), static quenching (formation of the complex), and a combination of both which causes a collisional process and complex formation with the same quencher. These mechanisms can be distinguished by the correlation between quenching constant (K_{sv}) and temperature. For dynamic quenching, the K_{sv} value increases in the elevated temperatures because

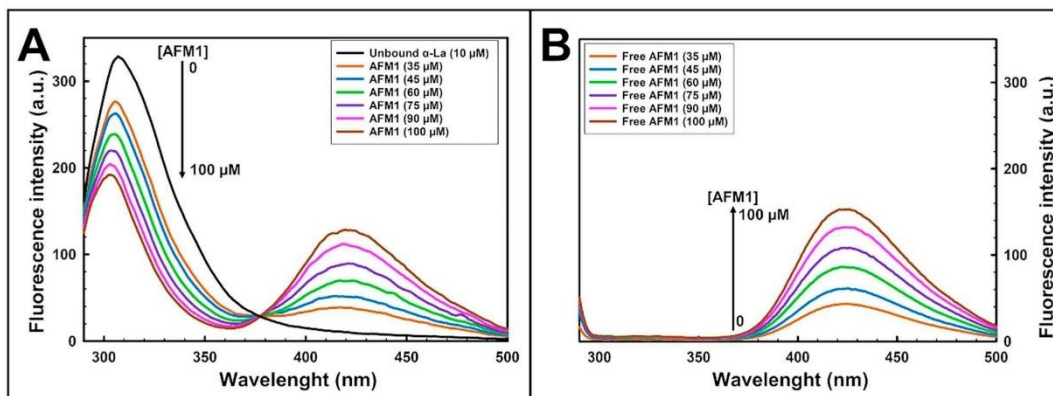


Fig. 3. (A) Fluorescence spectra of α -La at 10 μ M (black line) titrated with different concentrations of AFM1 (35 to 100 μ M) at 298 K. (B) Fluorescence spectra of PB 50 mM titrated with different concentrations of AFM1 (35 to 100 μ M) at 298 K. The excitation wavelength was 280 nm.

of larger diffusion distances reached by the quencher. On the contrary, in case of static quenching, K_{sv} decreases with rising temperature which negatively affects the complex stability. The quenching mechanism can be described by the well-known Stern-Volmer equation (Eq. (2)) [32–36]:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{sv}[Q] = 1 + k_q\tau_0[Q] \quad (2)$$

where F_0 and F are the fluorescence intensities of protein in the absence and presence of quencher, respectively; K_{sv} is the quenching constant; τ_0 is the middle lifetime of quencher; $[Q]$ is the quencher concentration; and k_q is the amount of the quenching rate constant [25]. If k_q is greater than $2 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, the quenching mechanism is static, and if it is lower, the mechanism is dynamic [13].

Based on the data from Fig. 4A, it was determined that K_{sv} is equal to $(5.90 \pm 0.42) \times 10^3 \text{ M}^{-1}$. To calculate k_q , τ_0 value for α -La (2.6 ns) was used following Delavari et al. [13]. Since the obtained k_q value was $(2.27 \pm 0.17) \times 10^{12} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, it could be concluded the quenching mechanism of α -La-AFM1 interaction was static, and the complex between α -La and AFM1 was formed. The calculated K_{sv} and k_q values at 303 and 308 K are reported in Table S1 of supplementary material.

3.2.3. Determination of Binding Parameters

A possible mechanism of the α -La-AFM1 complex formation can be expressed as shown in Eq. (3):



The binding constant (K_b) in the equilibrium reaction (Eq. (3)) can be expressed according to Eq. (4):

$$K_b = \frac{[\alpha - \text{La} - \text{AFM1}]}{[\alpha - \text{La}][\text{AFM1}]} \quad (4)$$

When the quenching mechanism is static, the modified Stern-Volmer equation (Eq. (5)) can be used to determine K_b and the number of binding sites (n) [12,14,15].

$$\log \left(\frac{F_0 - F}{F} \right) = \log K_b + n \log [\text{AFM1}] \quad (5)$$

Based on data shown in Fig. 4B, it was possible to determine n and K_b values. Since the calculated n value was of 1.32 ± 0.07 , it meant that the complex was formed at 1:1 ratio between protein and ligand (Eq. (3)). As demonstrated in Table 1, since $K_b > 1$, the formation of the α -La-AFM1 complex was favored in accordance to the equilibrium reaction in Eq. (4). Using Eq. (6), ΔG_b was calculated and the formation of the complex could be confirmed since $\Delta G_b < 0$ (Table 1).

$$\Delta G_b = -RT \ln K_b \quad (6)$$

Table 1 summarizes the thermodynamic binding parameters (ΔG_b , K_b and n) determined for different α -La complexes with compounds which show structural resemblance to AFM1. It can be observed that K_b and ΔG_b values reported by Delavari et al. [13] and Mohammadi &

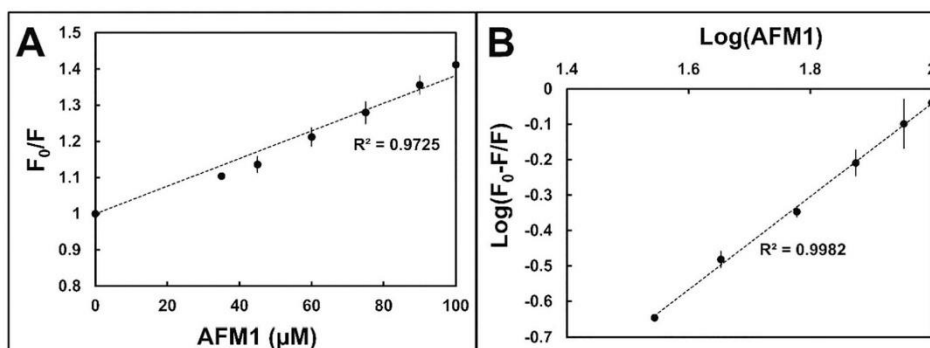


Fig. 4. (A) Stern-Volmer plot for the fluorescence quenching of α -La by AFM1 at 298 K. (B) Modified Stern-Volmer plot for the α -La-AFM1 complex at 298 K.

Table 1
 ΔG_b , K_b and n obtained for the α -La interaction with different test compounds by fluorescence spectroscopy.

Compound	ΔG_b (kJ mol ⁻¹)	K_b (M ⁻¹)	N	Reference
AFM1	-19.17 ± 0.96	(2.12 ± 0.59) × 10 ³	1.32 ± 0.07	This work
Kaempferol	-38.77 ± 1.05	(1.44 ± 0.59) × 10 ⁶	1.29 ± 0.04	[14]
Genistein	-35.69 ± 0.54	(0.59 ± 1.36) × 10 ⁶	1.23 ± 0.19	
Curcumin	-35.48 ± 1.09	(1.47 ± 0.66) × 10 ⁶	1.20 ± 0.17	[15]
Trans-resveratrol	-37.15 ± 1.21	(6.32 ± 3.10) × 10 ⁶	1.16 ± 0.04	
Vitamin D ₃	-33.47 ± 0.00	(0.70 ± 0.49) × 10 ⁶	1.30 ± 0.01	[13]

ΔG_b : binding free energy; K_b : binding constant; n : binding sites.

Moeeni [14,15] were of three orders of magnitude and two-fold greater than the values determined in this work, respectively. The results indicate that AFM1 has lower affinity towards α -La in comparison to other bioactive compounds reported in Table 1. This could explain the variability of AFM1 content in cheeses previously reported by different studies [3,5,37]. Regarding the number of binding sites, it was found that only one ligand molecule is bound to the protein when the complex is formed, which is consistent with the results reported for other compounds as shown in Table 1. Finally, it can also be concluded that α -La can act as AFM1 carrier in whey during cheese manufacturing process.

3.3. Nature of Interaction

The nature of the interaction between α -La and AFM1 was established by determining changes of enthalpy (ΔH) and entropy (ΔS) values [38,39] using the van't Hoff equation (Eq. (7)):

$$\ln K_b = -\frac{\Delta H}{R} \frac{1}{T} + \frac{\Delta S}{R} \quad (7)$$

In this work, the K_b values were evaluated at three different temperatures (supplementary material Fig. S5 and Table S1) to be further used to construct the van't Hoff plot as previously reported by Suryawanshi et al. [39]. Based on the data from Fig. 5, the determined ΔH and ΔS values were 93.58 kJ mol⁻¹ and 0.378 kJ mol⁻¹ K⁻¹, respectively. Due to the positive sign of these parameters, the protein-ligand interaction was concluded to have hydrophobic character, as previously described by Suryawanshi et al. [39]. Additionally, Delavari et al. [13] reported the α -La-vitamin D₃ complex was also formed through hydrophobic bonding.

3.4. Circular Dichroism

CD spectroscopy is a sensitive method to examine the effects of

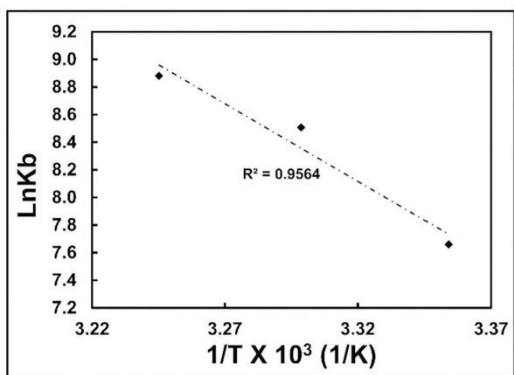


Fig. 5. van't Hoff plot for the binding constants (K_b) at 298, 303 and 308 K calculated by fluorescence quenching of α -La by AFM1.

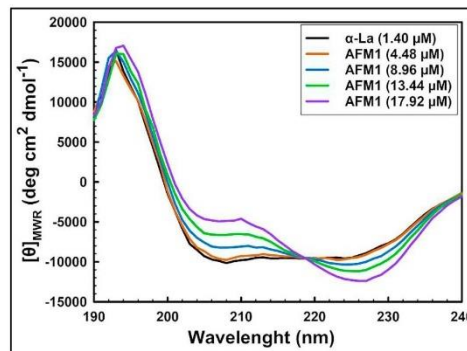


Fig. 6. Far-UV-CD spectra of α -La (1.40 μ M) titrated with different concentrations of AFM1 (4.48 to 17.92 μ M) at 298 K.

Table 2
 Changes in the secondary structures of α -La when adding different concentrations of AFM1.

AFM1 (μ M)	α -helix (%)	β -sheet (%)	Turns (%)	Random coil (%)	NRMSD ^a
0	35	16	15	34	0.043
4.48	34	17	14	34	0.042
8.96	38	14	14	34	0.034
13.44	39	16	13	31	0.025
17.92	40	19	12	30	0.017

^a Relative error calculated by the CDSSTR algorithm.

ligands on the possible conformational changes in the secondary structures of proteins in solution [40]. Far-UV-CD spectra recorded for the titration of α -La with AFM1 at 298 K are shown in Fig. 6. It can be observed changes in the CD spectra in response to different concentrations of AFM1 added to the protein solution. Table 2 shows the percentage content of secondary structures at each point of the α -La titration with the AFM1 calculated with the CDSSTR algorithm. According to Whitmore et al. [41], normalized root mean square deviation (NRMSD) is a fit parameter. If the value is greater than 0.1, the experimental secondary structures do not correspond to the structures of the algorithm database. As can be seen in Table 2, the NRMSD values obtained in this work are below 0.1, meaning the α -La secondary structures were fit correctly. The results obtained for the α -helix content in α -La were consistent with those reported by Delavari et al. [13]. Furthermore, Far-UV circular dichroism studies also confirmed that AFM1 alters the α -La secondary structures when the complex is formed. The major changes were observed in the α -helix structures (from 35 to 40%) and the β -sheets (from 16 to 19%) which corresponds to the increase by 12.5% and 15.8% of the α -helix and β -sheet structures, respectively. In contrast, turns and random coil secondary structures

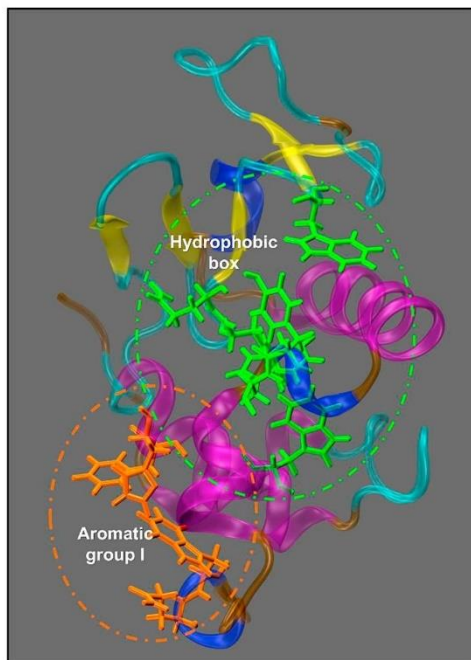


Fig. 7. Tertiary structure of α -La. Secondary structures: α -helix (magenta); 3_{10} helix (blue); β -sheet (yellow); turn (cyan) and random coil (brown). Hydrophobic regions: hydrophobic box (green) and aromatic group I (orange). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

decreased by 20% and 12%, respectively. In order to exclude the possible effect of absolute ethanol on α -La secondary structures, the appropriate blank experiment was carried out (data not shown).

3.5. Molecular Docking

Molecular docking is a computational modelling tool used to predict *in silico* the most stable ligand-protein complex structures and provide the insight into the binding character of these interactions. Moreover, once the crystallographic structure of the protein is known, the potential ligand binding site can be determined. Fig. 7 shows the tertiary structure of α -La, which is composed of two hydrophobic regions [10]. In the first step, the blind docking with AFM1 was performed and two potential binding sites were found: in the hydrophobic box and the aromatic group I. Then, a localized docking search was recalculated at each site and the most favorable α -La-AFM1 complex (minimum ΔG_b) was selected.

3.5.1. Complex Formed in the Region of the Hydrophobic Box

As shown in Fig. 8A, the hydrophobic interactions between the protein and AFM1 were formed by non-polar amino acids, namely Ile59, Val99, Trp60, and Tyr103. The last two belong to the hydrophobic box region previously reported by Chrysin et al. [10] In addition, three hydrogen bonds were identified which would contribute to the complex stabilization: two of them were formed with Asn56 and one with Glu49, with bond lengths of 1.855, 2.013 and 2.001 Å, respectively (Fig. 8B). Interestingly, as it can be observed in Fig. 8 the hydrophobic box consists of α -helix and β -sheet structures, which according to the CD results (Section 3.4) were regions of the increased structural ordering suggesting it could be the AFM1 binding site.

Delavari et al. [13] and Mohammadi & Moeeni [14,15] claimed that interactions of α -La with test biomolecules were of hydrophobic nature with additional hydrogen bonds formed through the amino acid residues belonging to the hydrophobic box.

The calculated ΔG_b value of the AFM1 binding into the protein hydrophobic box determined in the present study ($-26.07 \text{ kJ mol}^{-1}$) was similar to the one obtained experimentally (Section 3.2.3). Likewise, the ΔG_b values previously reported for the α -La interaction with other test compounds in hydrophobic box (Table 3) are consistent with those obtained in this work.

3.5.2. Complex Formed in the Region of the Aromatic Group I

Fig. 9A illustrates the hydrophobic interactions between the α -La

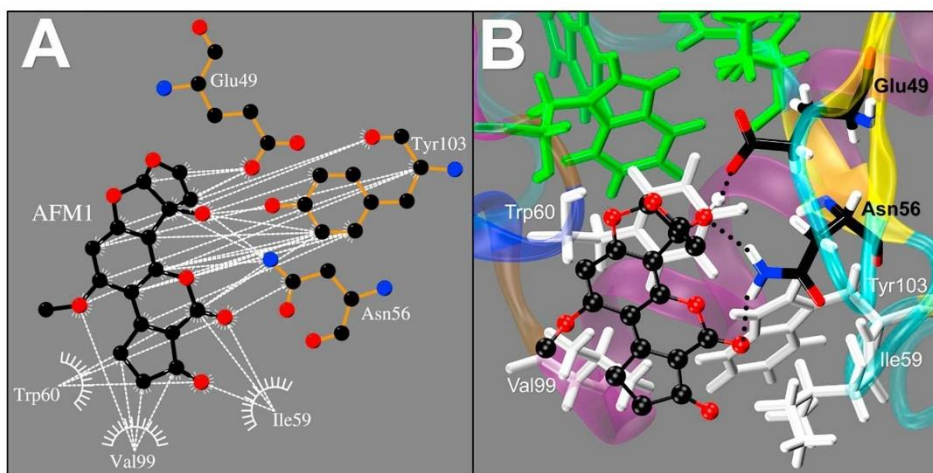


Fig. 8. Graphical representations of the interactions of the AFM1 with the α -La in the hydrophobic box region. (A) Lig Plot diagram of hydrophobic interactions (white dotted lines) of AFM1 with the amino acids of the hydrophobic box. (B) Stereo image presentation of the hydrogen bonds (black dotted lines) formed with AFM1 and the amino acids of the hydrophobic box.

Table 3
 ΔG_b values obtained for different test compounds interacting with the hydrophobic box of α -La protein by molecular docking studies.

Ligand	ΔG_b (kJ mol ⁻¹)	Reference
AFM1	-26.07	This work
Kaempferol	-25.27	[14]
Trans-resveratrol	-26.44	[15]
Genistein	-22.13	[14]
Vitamin D ₃	-31.42	[13]

ΔG_b : binding free energy.

aromatic group I and AFM1. In this case, several aromatic (Tyr36, Phe31, Trp118) and polar residues (Thr 4, Lys5, Cys6, and Cys120) were identified to participate in complex formation with mycotoxin. Additionally, it was observed the formation of one hydrogen bond with Lys5 at 2.197 Å (Fig. 9B). In previous studies, Mohammadi & Moeeni [15] reported ΔG_b value of -21.00 kJ mol⁻¹ for curcumin interaction with the α -La aromatic group I which is close to the one obtained in this work (-26.28 kJ mol⁻¹).

When comparing experimental (fluorescence spectroscopy) and theoretical results (molecular docking) obtained in this study, it is obvious that some discrepancies exist. The model obtained by molecular docking overestimates the strength of α -La-AFM1 interaction by assuming the presence of hydrogen bonds and higher number of binding sites. However, the ΔG_b values assessed by both methods are very similar. Complementary character of the experimental and computational approaches is clearly beneficial, especially when approximation of the region on the protein surface interacting with ligand is achieved via molecular docking studies.

4. Conclusions

In the present study, the interaction between α -La and AFM1 has been investigated using different spectroscopic techniques complemented with molecular docking studies. Such approach allowed determining experimental values of the protein-ligand binding parameters and modelled the potential binding sites on the protein surface. Mechanistic studies performed by fluorescence spectroscopy showed

that reduction of the α -La fluorescence intensity with AFM1 occurred via static quenching, which is indicative for a complex formation. The obtained stoichiometric n value revealed the presence of only one binding site between α -La and AFM1. Additionally, CD studies demonstrated a shift in the ratio of α -La secondary structures upon the addition of AFM1. Such conformational changes could provide increased protein stability while the α -La-AFM1 complex was formed. Furthermore, with the spectroscopic data and the ΔH and ΔS values showed that the interaction between protein and mycotoxin is mainly hydrophobic since changes in the microenvironment of aromatic amino acids were observed. Finally, protein-ligand docking studies helped to predict the two possible α -La binding sites: hydrophobic box and the aromatic group I. The complex structure was found to be stabilized by hydrophobic interactions and hydrogen bonds formed through aromatic and polar amino acid residues, respectively, that are present in the protein hydrophobic box, as well as in the aromatic group I. However, CD and molecular docking results suggested the most likely binding site was the hydrophobic box. Since binding site of the mycotoxin was found to be the same as for other biomolecules, it can be postulated that bovine α -La may act as an AFM1 toxin carrier. The future work in our research group would focus on comparing the affinity of AFM1 to other milk proteins in order to assess the distribution of the mycotoxin among milk components in different dairy products.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgment

This work was supported by the National Council for Science and Technology (CONACyT-Mexico) (grant number CB-2015/256467). Carlos Jiménez-Pérez acknowledges financial support by CONACyT (scholarship 592514).

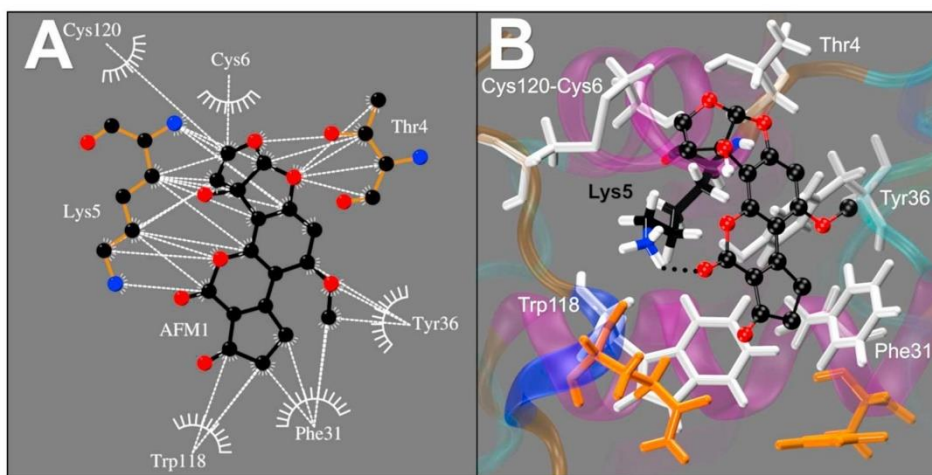


Fig. 9. Graphical representations of the interactions of the AFM1 with the α -La in the aromatic group I region. (A) Lig Plot diagram of hydrophobic interactions (white dotted lines) of AFM1 with the amino acids of the aromatic group I. (B) Stereo image presentation of the hydrogen bonds (black dotted lines) formed with AFM1 and the amino acids of the aromatic group I.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2020.111957>.

References

[1] S. Iqbal, M. Asi, A. Ariño, Aflatoxins, in: S. Maloy, K. Hughes (Eds.), *Brenner's Encycl. Genet*, 2nd ed., Academic Press, San Diego, 2013, pp. 43–47, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.00022-X>.

[2] E. Creppy, Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe, *Toxicol. Lett.* 127 (2002) 19–28, [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(01\)00479-9](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(01)00479-9).

[3] S. Iqbal, S. Jinap, A. Pirouz, A. Ahmad Faizal, Aflatoxin M1 in milk and dairy products: occurrence and recent challenges: a review, *Trends Food Sci. Technol.* 46 (2015) 110–119, <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.08.005>.

[4] A. Manetta, M. Giammarco, L. Giuseppe, I. Fusaro, A. Gramenzi, A. Formigoni, G. Vignola, L. Lambertini, Distribution of aflatoxin M1 during Grana Padano cheese production from naturally contaminated milk, *Food Chem.* 113 (2009) 595–599, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.07.091>.

[5] F. Campagnolo, K. Ganey, A. Mousavi, B. Portela, A. Cruz, D. Granato, C. Corassin, C. Augusto, F. Oliveira, A. Sant, The occurrence and effect of unit operations for dairy products processing on the fate of a fl atoxin M 1 : a review, *Food Control* 68 (2016) 310–329, <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.04.007>.

[6] M. Motawee, D. McMahon, Fate of aflatoxin M1 during manufacture and storage of feta cheese, *J. Food Sci.* 74 (2009) 42–45, <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01158.x>.

[7] C. López, L. Ramos, S. Ramadan, L. Bulacio, J. Perez, Distribution of aflatoxin M1 in cheese obtained from milk artificially contaminated, *Int. J. Food Microbiol.* 64 (2001) 211–215, [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00444-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00444-X).

[8] G. Chavarría, A. Molina, A. Leiva, G. Méndez, E. Wong-González, M. Cortés-Muñoz, C. Rodríguez, F. Granados-Chinchilla, Distribution, stability, and protein interactions of aflatoxin M1 in fresh cheese, *Food Control* 73 (2017) 581–586, <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.09.005>.

[9] A. Barbiroli, F. Bonomi, S. Benedetti, S. Mannino, L. Monti, T. Cattaneo, S. Iametti, Binding of aflatoxin M1 to different protein fractions in ovine and caprine milk, *J. Dairy Sci.* 90 (2007) 532–540, [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(07\)71536-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(07)71536-9).

[10] E. Chrysin, K. Brew, K. Acharya, Crystal structures of Apo- and holo-bovine α -lactalbumin at 2.2-Å resolution reveal an effect of calcium on inter-lobe interactions, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 37021–37029, <https://doi.org/10.1074/jbc.M004752200>.

[11] Y. Livney, Milk proteins as vehicles for bioactives, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 15 (2010) 73–83, <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2009.11.002>.

[12] H. Zhang, D. Yu, J. Sun, H. Guo, Q. Ding, R. Liu, F. Ren, Interaction of milk whey protein with common phenolic acids, *J. Mol. Struct.* 1058 (2014) 228–233, <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2013.11.009>.

[13] B. Delavari, A. Saboury, M. Atri, A. Ghasemi, B. Bigdeli, A. Khammari, P. Maghami, A. Moosavi-Movahedi, T. Haertlé, B. Goliaei, Alpha-lactalbumin: a new carrier for vitamin D3 food enrichment, *Food Hydrocoll.* 45 (2015) 124–131, <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.10.017>.

[14] F. Mohammadi, M. Moeni, Analysis of binding interaction of genistein and kaempferol with bovine α -lactalbumin, *J. Funct. Foods* 12 (2015) 458–467, <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.12.012>.

[15] F. Mohammadi, M. Moeni, Study on the interactions of trans-resveratrol and curcumin with bovine α -lactalbumin by spectroscopic analysis and molecular docking, *Mater. Sci. Eng. C* 50 (2015) 358–366, <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.02.007>.

[16] A. Al-Hanish, D. Stanic-Vucinic, J. Mihailovic, I. Prodic, S. Minic, M. Stojadinovic, M. Radibratovic, M. Milecic, T. Cirkovic Velickovic, Noncovalent interactions of bovine α -lactalbumin with green tea polyphenol, epigallocatechin-3-gallate, *Food Hydrocoll.* 61 (2016) 241–250, <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.05.012>.

[17] M. Kronman, R. Andreotti, Inter- and intramolecular interactions of α -lactalbumin. I. the apparent heterogeneity at acid pH, *Biochemistry.* 3 (1964) 1145–1151, <https://doi.org/10.1021/bi00896a024>.

[18] J. Lees, F. Miles, B. Wien, Wallace, a reference database for circular dichroism spectroscopy covering fold and secondary structure space, *Bioinformatics.* 22 (2006) 1955–1962, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl327>.

[19] L. Whitmore, B. Wallace, Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: methods and reference databases, *Biopolymers.* 89 (2008) 392–400, <https://doi.org/10.1002/bip.20853>.

[20] G. Morris, R. Huey, W. Lindstrom, M. Sanner, R. Belew, D. Goodsell, A. Olson, AutoDock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility, *J. Comput. Chem.* 30 (2009) 2785–2791, <https://doi.org/10.1002/jcc.21256>.

[21] R. Anandakrishnan, B. Aguilar, A. Onufriev, H + + 3.0: automating pK prediction and the preparation of biomolecular structures for atomistic molecular modeling and simulations, *Nucleic Acids Res.* 40 (2012) 537–541, <https://doi.org/10.1093/nar/gks375>.

[22] G. Morris, D. Goodsell, R. Halliday, R. Huey, W. Hart, R. Belew, A. Olson, Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function, *J. Comput. Chem.* 19 (1998) 1639–1662, [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-987X\(199811\)19:14<1639::AID-JCC10>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-987X(199811)19:14<1639::AID-JCC10>3.0.CO;2-B).

[23] W. Humphrey, A. Dalke, K. Schulten, VMD: visual molecular dynamics, *J. Mol. Graph.* 14 (1996) 33–38, [https://doi.org/10.1016/0263-7855\(96\)00018-5](https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5).

[24] R. Laskowski, M. Swindells, LigPlot + : multiple ligand-protein interaction diagrams for drug discovery, *J. Chem. Inf. Model.* 51 (2011) 2778–2786, <https://doi.org/10.1021/ci200227u>.

[25] S. Sadeghi-kaji, B. Shareghi, A. Saboury, S. Farhadian, Spectroscopic and molecular docking studies on the interaction between spermidine and pancreatic elastase, *Int. J. Biol. Macromol.* 131 (2019) 473–483, <https://doi.org/10.1016/j.jbiomac.2019.03.084>.

[26] S. Ranjbar, Y. Shokoohinia, S. Ghobadi, N. Bijari, S. Gholamzadeh, N. Moradi, M. Ashrafi-Kooshk, A. Aghaei, R. Khodarahmi, Studies of the interaction between isomeratorin and human serum albumin by multispectroscopic method: identification of possible binding site of the compound using esterase activity of the protein, *Sci. World J.* 2013 (2013), <https://doi.org/10.1155/2013/305081>.

[27] M. Jing, W. Song, R. Liu, Binding of copper to lysozyme: spectroscopic, isothermal titration calorimetry and molecular docking studies, *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 164 (2016) 103–109, <https://doi.org/10.1016/j.saa.2016.04.008>.

[28] J. Lakowicz, Fluorophores, *Princ. Fluoresc. Spectrosc.* 2006, pp. 63–95, <https://doi.org/10.1007/978-0-387-46312-4>.

[29] J. Shi, Q. Wang, D. Pan, T. Liu, M. Jiang, Characterization of interactions of simvastatin, pravastatin, fluvastatin, and pitavastatin with bovine serum albumin: multiple spectroscopic and molecular docking, *J. Biomol. Struct. Dyn.* 35 (2017) 1529–1546, <https://doi.org/10.1080/07391102.2016.1188416>.

[30] D. Harris, Applications of spectrophotometry, *Quant. Chem. Anal.* 8th ed., Clancy Marshall, New York, 2010, pp. 424–425.

[31] M. Bagheri, M. Fatemi, Fluorescence spectroscopy, molecular docking and molecular dynamic simulation studies of HSA-aflatoxin B1 and G1 interactions, *J. Lumin.* 202 (2018) 345–353, <https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2018.05.066>.

[32] J. Lakowicz, Introduction to fluorescence, *Princ. Fluoresc. Spectrosc.* Third, Springer, 2006, pp. 1–25, <https://doi.org/10.1007/978-0-387-46312-4>.

[33] N. Lu, Y. Sui, Y. Ding, R. Tian, L. Li, F. Liu, Adsorption of human serum albumin on functionalized single-walled carbon nanotubes reduced cytotoxicity, *Chem. Biol. Interact.* 295 (2018) 64–72, <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.03.015>.

[34] Q. Wang, C. Huang, M. Jiang, Y. Zhu, J. Wang, J. Chen, J. Shi, Binding interaction of atorvastatin with bovine serum albumin: spectroscopic methods and molecular docking, *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 156 (2016) 155–163, <https://doi.org/10.1016/j.saa.2015.12.003>.

[35] B. Wang, D. Pan, K. Zhou, Y. Lou, J. Shi, Multi-spectroscopic approaches and molecular simulation research of the intermolecular interaction between the angiotensin-converting enzyme inhibitor (ACE inhibitor) benazepril and bovine serum albumin (BSA), *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 212 (2019) 15–24, <https://doi.org/10.1016/j.saa.2018.12.040>.

[36] Y. Zhang, K. Zhou, Y. Lou, D. Pan, J. Shi, Investigation of the binding interaction between estazolam and bovine serum albumin: multi-spectroscopic methods and molecular docking technique, *J. Biomol. Struct. Dyn.* 35 (2017) 3605–3614, <https://doi.org/10.1080/07391102.2016.1264889>.

[37] E. Hernández Camarillo, A. Ramirez-Martinez, M. Carvajal-Moreno, M. Vargas-Ortiz, N. Wesolek, G. Del Carmen Rodriguez Jimenes, M. Ángel Garcia Alvarado, A. Roudot, M. Antonio Salgado Cervantes, V. Robles-Olvera, Assessment of Aflatoxin M1 and M2 exposure risk through Oaxaca cheese consumption in southeastern Mexico, *Int. J. Environ. Health Res.* 28 (2018) 202–213, <https://doi.org/10.1080/09603123.2018.1453054>.

[38] P. Ross, S. Subramanian, Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability, *Biochemistry* 20 (1981) 3096–3102, <https://doi.org/10.1021/bi00514a017>.

[39] V. Suryawanshi, L. Walekar, A. Gore, P. Anbhule, G. Kolekar, Spectroscopic analysis on the binding interaction of biologically active pyrimidine derivative with bovine serum albumin, *J. Pharm. Anal.* 6 (2016) 56–63, <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2015.07.001>.

[40] M. Shahlaei, B. Rahimi, A. Nowroozi, M.R. Ashrafi-Kooshk, K. Sadrjavadi, R. Khodarahmi, Exploring binding properties of sertraline with human serum albumin: combination of spectroscopic and molecular modeling studies, *Chem. Biol. Interact.* 242 (2015) 235–246, <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2015.10.006>.

[41] L. Whitmore, B. Wallace, DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data, *Nucleic Acids Res.* 32 (2004) 668–673, <https://doi.org/10.1093/nar/gkh371>.