



ECOTOXICOLOGIA

Estudi dels efectes de l'aflatoxina B₁

Autora: Sofia Valverde Valera

Curs: 2n Batxillerat Científic

Tutora: Marian Querol

Seminari: Biologia i Geologia

Any: 2014 – 2015

Centre: INS Baldiri Guilera

ÍNDIX

1.RESUM	3
2.INTRODUCCIÓ I JUSTIFICACIÓ	4
2.1 EL CUC <i>EISENIA FOETIDA</i>	5
2.1.1 CARACTERÍSTIQUES DE L'ESPÈCIE	6
2.1.2 CRIA DE L'ESPÈCIE	9
2.2 SUBSTÀNCIA TESTADA I ORGANISMES PRODUCTORS	10
2.2.1 <i>ASPERGILLUS</i>	10
2.2.2 DISTRIBUCIÓ D' <i>ASPERGILLUS</i>	11
2.2.3 CLASSIFICACIÓ DE LES AFLATOXINES	11
2.2.4 OBTENCIÓ DE L'AFLATOXINA UTILITZADA	12
2.2.5 CARACTERÍSTIQUES DE L'AFLATOXINA B ₁	12
2.2.6 AFLATOXINES EN EL MENJAR	13
3. MATERIAL I MÈTODES	14
3.1 TEST DE TOXICITAT AGUDA	14
3.1.1 EQUIPAMENT	14
3.1.2 SELECCIÓ D'INDIVIDUS	14
3.1.3 CÀLCUL DE LES CONCENTRACIONS	15
3.1.4 PREPARACIÓ DE L'ASSAIG	16
3.1.5 OBSERVACIONS	16
3.2 COMET ASSAY	17
3.2.1 PROCEDIMENT	17
4.RESULTATS	22
4.1 TEST DE TOXICITAT AGUDA	22
4.2 COMET ASSAY	23
5. DISCUSSIÓ I CONCLUSIONS	25

6.AGRAÏMENTS	27
7.BIBLIOGRAFIA.....	28
8. WEBGRAFIA	29
9. ANNEXOS	31
9.1 TAULA DE RESULTATS DEL COMET ASSAY	31

1.RESUM

En aquesta memòria s'exposa el treball realitzat a la Unitat de Toxicologia Experimental i Ecotoxicologia (UTOX) del Parc Científic de Barcelona (PCB), amb la col·laboració de l'investigador David Ramos López. L'objectiu fonamental d'aquest treball és saber si l'*aflatoxina B₁*, produïda pel fong *Aspergillus flavus*, afecta els cucs de l'espècie *Eisenia foetida*.

Per tal de realitzar l'estudi, es van fer dos experiments. Primerament, es van sotmetre els cucs a un test de toxicitat aguda. Posteriorment, es va fer un *Comet Assay* amb cèl·lules d'alguns cucs que van sobreviure a l'anterior test de toxicitat, per tal de poder detectar un possible dany produït a l'ADN.

Els dos experiments van revelar l'afectació dels cucs per l'aflatoxina B₁. Al test de toxicitat aguda, per la mortalitat progressiva als respectius tractaments: mentre que al tractament amb dosi més baixa va morir només un individu a la dosi més alta d'aflatoxina B₁ van morir set individus de deu.

Mitjançant el *Comet Assay* es van reconèixer danys a les cèl·lules a través del microscopi d'epifluorescència. Aquests danys es van fer més evidents a les cèl·lules dels individus tractats amb dosis més altes de l'aflatoxina B₁.

2. INTRODUCCIÓ I JUSTIFICACIÓ

Des de ben petita he tingut molt d'interès per la investigació científica i més concretament per la recerca biomèdica.

L'oportunitat desitjada de dur a terme el Treball de Recerca en un centre d'investigació de nivell, es va plantejar quan els meus professors de l'INS Baldiri Guilera ens van informar del Programa "Recerca a Secundària" del Parc Científic de Barcelona (PCB). Llavors, vaig conèixer l'oferta d'àrees temàtiques dels investigadors que fan de tutors i vaig decantar-me immediatament per la línia de toxicologia i ecotoxicologia, que dóna suport als estudis de toxicitat sistèmica i genotoxicitat (alteracions de l'ADN) de productes químics *in vitro* i als assajos de toxicologia i ecotoxicologia ambiental.

Fa anys que tinc coneixement de l'existència de les aflatoxines, suposo que a través dels estudis micològics del meu pare i del meu germà, tots dos biòlegs. Les aflatoxines són micotoxines produïdes per diverses espècies de floridures, del gènere *Aspergillus*, especialment. El seu potencial toxicològic i carcinogènic és ben conegut, i la ubiqüitat dels fongs productors les fa molt importants en les indústries de conservació de cereals, llavors i fruits secs o deshidratats.

Però va ser recentment, en analitzar l'oferta d'àrees temàtiques del PCB, quan vaig tenir la primera notícia de la utilització habitual de l'*Eisenia foetida*, el cuc de terra vermell californià, com a animal d'experimentació en la Unitat de Toxicologia i Ecotoxicologia d'aquest centre d'investigació. Llavors, va ser també quan va sorgir l'idea d'experimentar l'efecte tòxic de l'aflatoxina B₁ sobre l'*Eisenia*. Malgrat la sensibilitat demostrada de l'anèl·lid a diferents agents químics i contaminants, la nostra hipòtesi de treball inicial apuntava cap a la possibilitat que el cuc hagués desenvolupat alguna mena de resistència a les toxines alliberades pels fongs, pel fet que aquests es troben habitualment al medi i substrat que li serveix d'aliment.

En aquest sentit, al nostre projecte inicial, es proposava el desenvolupament d'*Eisenia foetida*, sobre un substrat en el que s'hagués cultivat prèviament l'*Aspergillus flavus*, fong productor de l'aflatoxina B₁. Però el meu tutor al PCB, David Ramos López, va proposar la utilització directa de la aflatoxina B₁ subministrada per una empresa comercial de reactius químics, procediment que ens estalviava la manipulació i el cultiu del fong i ens permetria tenir una referència molt més precisa de la quantitat del tòxic utilitzada en cada tractament.

Finalment es va posar en marxa un procés experimental que va comportar la realització d'un test de toxicitat aguda i un *Comet Assay*, amb dos objectius fonamentals:

1. Comprovar si l'aflatoxina B₁ té efectes tòxics sistèmics i genotòxics sobre el cuc *Eisenia foetida*.

2. Determinar la dosi letal i efectiva, en el cas que l'aflatoxina B₁ tingué efectes tòxics sobre l'*Eisenia foetida*.

Als següents apartats d'aquesta memòria, s'expliquen els detalls de l'experiència realitzada al PCB, els materials utilitzats, els resultats obtinguts i les conclusions que s'han pogut extreure. També s'han inclòs en aquesta introducció algunes informacions relacionades amb la biologia del cuc *Eisenia foetida* i dels fongs del gènere *Aspergillus*, a més de les característiques físiques i químiques de l'aflatoxina B₁. Aquestes informacions creiem que poden ajudar a entendre el procés experimental desenvolupat i a valorar l'abast o importància que poden tenir les aflatoxines en els sistemes naturals i en diferents processos que poden afectar la mateixa salut humana.

2.1 EL CUC *EISENIA FOETIDA*

L'espècie seleccionada per fer aquest treball és ***Eisenia foetida***, coneguda popularment com cuc vermell californià. És l'espècie acceptada en les normatives europees per l'avaluació de productes químics.

El proveïdor d'aquesta espècie a la Unitat de Toxicologia Experimental i Ecotoxicologia (UTOX-PCB) és *Lombriastur*, empresa asturiana dedicada a la lombricultura des del 1987 que proveeix humus de cuc de terra (Asturhumus), el cuc *Eisenia foetida* i astursubstrat.



Fig.1: Logo Lombriastur

Els cucs de terra emprats en els treballs de toxicologia han de tenir les següents característiques:

- Individus adults amb almenys dos mesos d'edat amb clitel desenvolupat (estructura reproductora que s'aprecia entre els somites 32 i 37 dels espècimens madurs).
- Pes entre 3 i 6 g (mitjana de 10 cucs).
- Individus d'edat semblant provinents d'un cultiu sincronitzat.

Aquest espècie és triada per les seves apropiades característiques, que d'entre altres són:

- Susceptibilitat als productes químics.
- Adaptació a un ampli rang de temperatures, que va des dels 15°C fins als 25°C.
- Taxa de reproducció alta.
- Regim d'alimentació molt variat, mancat de requeriments específics, que permet la cria en un ampli rang de residus orgànics. .
- Longevitat.
- Baixa tendència a la migració.
- No és vector de malalties.
- Capacitat de viure en poblacions denses, de 40.000 o 50.000 individus

per m².

Totes aquestes característiques la fan una espècie idònia per als requisits d'aquest treball i generalment per a altres projectes normalitzats a la UTOX-PCB.

2.1.1 CARACTERÍSTIQUES DE L'ESPÈCIE

2.1.1.1 CLASSIFICACIÓ

Els cucs de terra són anèl·lids pertanyents a la subclasse dels *Oligochaeta*, ordre *Haplotaixidae* i a diverses famílies. L'espècie utilitzada forma part de la família *Lumbricidae*. Aquesta família té actualment 42 gèneres i 670 espècies, aproximadament, la majoria de poc interès científic.

Alguns taxonomistes subdivideixen els cucs de terra en dos subgrups, els que presenten un color vermell i els que són de color gris marró. A banda del color, també hi ha altres trets que fan més fàcil la identificació. En el cas de l'espècie *Eisenia foetida*, són característiques les bandes transversals vermelloses dels segments.

Eisenia foetida, forma part del subgrup de cucs de color vermell, i és anomenada comunament "cuc de terra vermell californià", per haver-se descrit a Califòrnia, a principis dels anys cinquanta. És considerada com un híbrid per alguns autors, tot i que d'altres no el consideren un híbrid, sinó el cuc de terra més cultivat del món i per tant resultant d'una intensa selecció artificial (Arbona y Morales, 1999).



Fig.2: Imatges d'*Eisenia foetida*

2.1.1.2 TRETS EXTERNS DE L'ESPÈCIE

El cos és cilíndric i allargat, acabat en un extrem rom. No té cap definit. El cos del cuc de terra madur té entre 115 i 200 segments o anells, anomenats somites, separats per solcs transversals. Cadascuna d'aquestes divisions que s'observen externament es corresponen amb altres divisions internes o segments, produïts per metamerització. Molts d'ells són idèntics, però en alguns punts es poden trobar somites diferenciats, relacionats amb funcions

especials.

La boca es troba al primer somita, i presenta un lòbul carnós que sobresurt davant d'ella, el prostomi, on es troben grups de cèl·lules sensorials que poden percebre el grau d'acidesa o alcalinitat del substrat així com els estímuls lluminosos. L'anus es troba a l'últim somita. També es pot reconèixer el clitel, glàndula reproductora que es desenvolupa entre els somites 32 i 37 dels individus adults en la majoria de cucs de terra.

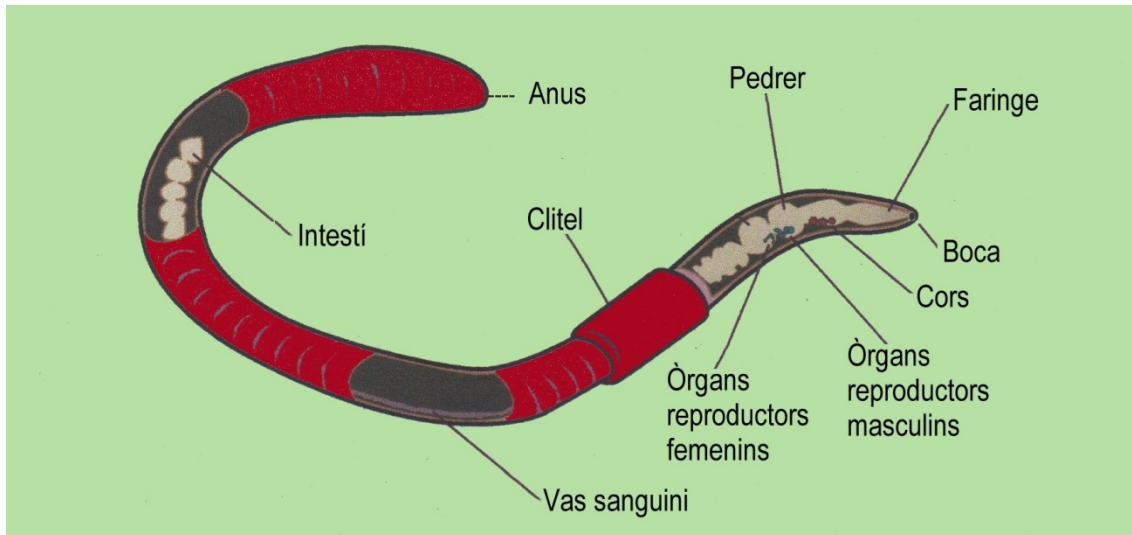


Fig. 3: Trets externs d'*Eisenia foetida*

2.1.1.3 TRETOS INTERNOS

Si s'obre longitudinalment la paret del cos per la línia dorsal mitjana, s'observen dos tubs concèntrics: la paret externa del cos i el tub digestiu. L'espai entre ambdós és el celoma. Aquesta cavitat conté un líquid celomàtic aquós amb amebòcits lliures i incoloros. Petits porus existents als septes permeten el pas d'aquest líquid d'un somita a un altre, afavorit pels moviments del cos.

2.1.1.4 SISTEMA DIGESTIU

El sistema digestiu dels cucs de terra travessa tot el cos, longitudinalment. Està compost per boca, faringe, esòfag, glàndules calcíferes, pap, pedrer (de parets musculars gruixudes), intestí (amb constriccions i dilatacions anulars) i anus. La seva dieta natural es basa en fulles mortes, herbes i altres substàncies vegetals. Normalment humitegen l'aliment amb secrecions salivals i s'ho empassen mitjançant l'acció muscular del prostomi, "llavis" i faringe.

2.1.1.5 SISTEMA CIRCULATORI

La sang està constituïda per un plasma líquid, de color vermell degut a l'hemoglobina dissolta, i per corpuscles lliures incoloros. El sistema circulatori està format per un vas dorsal i un vas ventral que recorren tot el cos. El dorsal presenta en cada segment una dilatació contràctil que assegura la propulsió de la sang. A l'altura de l'esòfag els dos vasos s'uneixen mitjançant altres estructures pulsàtil·les.

2.1.1.6 RESPIRACIÓ

No existeix sistema respiratori organitzat. Gràcies a la fina cutícula amb la que es troba revestit el cuc de terra, es dona l'intercanvi de gasos, entre l'exterior i la seva pell. La sang circula pels capil·lars propers a la cutícula de la paret del cos i així rep oxigen i elimina anhídrid carbònic.

2.1.1.7 SISTEMA EXCRETOR

El sistema excretor està format per un parell de nefridis en cada somita o segment. Es basa en un sistema de tubs que desemboquen a l'exterior i la seva funció és eliminar els productes de rebuig del celoma i els procedents dels vasos sanguinis que envolten el nefridi. Els productes d'excreció són amoníac, urea i creatinina, principalment.

2.1.1.8 APARELL REPRODUCTOR

Primerament, s'ha de dir que els cucs de terra són hermafrodites, és a dir, un mateix individu està dotat d'òrgans sexuals masculins i femenins, però són incapaços d'autofecundar-se. Els òrgans reproductors es troben en la posició ventral.

L'època de la fecundació es dona al llarg de tot l'any, però és especialment notòria quan el temps és més càlid i humit. Es produeix de nit i la còpula sol durar unes dues o tres hores.

Per tal de fecundar-se, els cucs de terra s'uneixen per les superfícies ventrals amb els extrems anteriors dirigits cap al sentit oposat. S'intercanvien espermatozous, els quals no fertilitzen immediatament els ous sinó que durant un temps queden depositats en uns embolcalls viscosos, allotjats al clitel.

2.1.1.9 IMPORTÀNCIA DE L'ESPÈCIE

Els cucs de terra actuen com a descomponedors naturals de matèria orgànica. Aprofiten una part de la ingesta però rebutgen una altra part com excrement, produint així el compost també anomenat lombricompost. Una altra funció molt important dels cucs de terra és remoure el substrat. Ho fan remouent la capa

superior del substrat, permetent la penetració de l'aire i de l'aigua. Mitjançant aquest procediment, la profunditat del substrat llaurable en les àrees poc fèrtils pot augmentar gradualment.

A més, el substrat en el que conviuen arriba a tenir en aliments assimilables per a les plantes, 5 vegades més nitrats, 7 vegades més fòsfor, 11 vegades més potassi, 2 cops més calci i 2 cops més magnesi que un substrat comú.

En l'antiguitat, ja es coneixia la importància d'aquesta espècie. A l'antic Egipte es consideraven els cucs de terra com a indicadors de terra fèrtil i es castigava als que tractaven malament als cucs productors d'humus. Aristòtil va descriure els cucs de terra com els intestins de la terra. Charles Darwin va escriure una obra al 1881 anomenada «*La formació de la terra vegetal per l'acció dels cucs de terra*». En aquesta obra afirma que cada any passen pels intestins dels cucs de terra 7 tones de terra seca per hectàrea i explica que els seus excrements aporten potassi a la superfície, fòsfor al subsòl i afegeixen a la terra productes nitrogenats dels seu metabolisme; per tant, es pot considerar a Darwin com al pare de la lombricultura.

2.1.2 CRIA DE L'ESPÈCIE

La cria d'aquesta espècie es pot fer a gran o a petita escala. En el primer cas, el cultiu es fa al camp. La unitat de mesura a l'hora de criar els cucs és el llit de 2 m². En una explotació de cucs de terra que es trobi en condicions òptimes, en cada 2m² poden conviure uns 100.000 cucs de terra (entre adults, joves i capolls). En el cultiu s'han de tenir en compte diversos paràmetres com ara el reg, l'alimentació i la duplicació dels cucs.



Fig. 4: Camp de cultiu
Eisenia foetida

En el segon cas, la cria a petita escala, es dona a un nivell més baix, fins i tot es pot fer a casa, en caixes de fusta, d'aproximadament 50x50x15cm amb tapes que tanquin hermèticament. Mitjançant aquest procés es poden arribar a produir més de 1.000 cucs de terra en 6 setmanes.

Qualsevol que sigui el procediment, *Eisenia foetida* es pot criar en un ampli rang de residus animals. No obstant, es recomana la mescla 50:50 de fems, generalment de cavall o ramat, i torba. El pH òptim és 7, i el contingut salí molt baix (conductivitat iònica inferior als 6.0 mili-Siemens), segons l'OECD. El substrat tampoc pot ser enriquit i és aconsellable també començar el cultiu amb capolls, que aproximadament tarden 3 o 4 setmanes en sortir de la closca i 7 o 8 setmanes en convertir-se en cucs de terra madurs, a 20°C, aproximadament.

2.2 SUBSTÀNCIA TESTADA I ORGANISMES PRODUCTORS

La substància testada, com s'ha dit anteriorment, ha estat l'*aflatoxina B₁*, produïda habitualment pel fong *Aspergillus flavus*.

2.2.1 ASPERGILLUS

El gènere *Aspergillus* comprèn al voltant de 180 espècies. Són fongs filamentosos, hialins i ubics. Es reproduïxen normalment de forma asexual per conidis, que s'originen de grups de fiàlids localitzats per tota la superfície o només a la part apical i dilatada del conidiòfor. *Aspergillus flavus* és una de les espècies representatives d'aquest tipus de fongs.

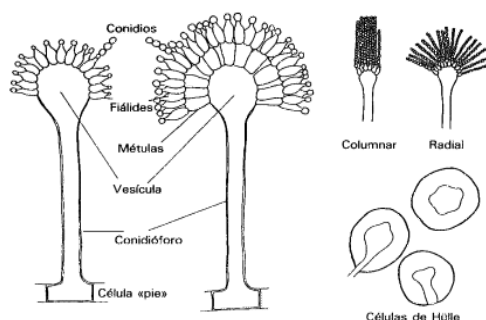


Fig. 5: Representació *Aspergillus*

Tot i que rara, l'estudi de la reproducció sexual d'alguns *Aspergillus* ha permès ubicar-los dins de la divisió *Ascomycota*.

Els fongs d'aquest gènere tenen un gran potencial biòtic i són degradadors actius de matèria orgànica, i en conseqüència molt útils en l'ecologia del terrestre. Per contra, causen malalties a l'ésser humà i als animals mitjançant tres mecanismes diferents:

- **HIPERSENSIBILITAT:** aquesta pot ser congènita. En aquests casos, *Aspergillus* només actua com ho farien altres antigens ambientals, per exemple, la pols o el pol·len, ocasionant des d'una rinitis al·lèrgica fins a asma crònic sever.
- **INTOXICACIÓ PER INGESTA DE METABÒLITS FUNGICS:** en aquest cas, substàncies com les aflatoxines, produïdes durant el creixement d'*Aspergillus* poden arribar a afectar òrgans. S'ha demostrat el seu potencial hepatotòxic i cancerigen.
- **INVASIÓ (micosis):** Els fongs d'aquest gènere són capaços d'envair teixits i òrgans, gràcies a la producció de diverses lipases, elastases o ADNases. El conjunt d'infeccions causades per aquest gènere de fongs rep el nom d'aspergil·losis i engloba malalties com l'aspergil·losi pulmonar, aspergil·losi invasiva, queratitis aspergil·lar, aspergil·losi cutània, sinusitis i otitis externa, entre d'altres.

La classificació del gènere *Aspergillus* en subgèneres i seccions està basada fonamentalment en 4 característiques: presència del teleomorfe, presència o absència de mètules o fiàlids sobre la vesícula i coloració de les colònies.

Pel que fa a l'espècie *Aspergillus flavus*, es reconeix per les seves colònies

d'aspecte vellutat i color groc verdós. Els conidiòfors són erectes, de longitud variable i acaben en una característica dilatació globosa o claviforme (la vesícula). Els conidis poden ser uniseriats o biseriats.

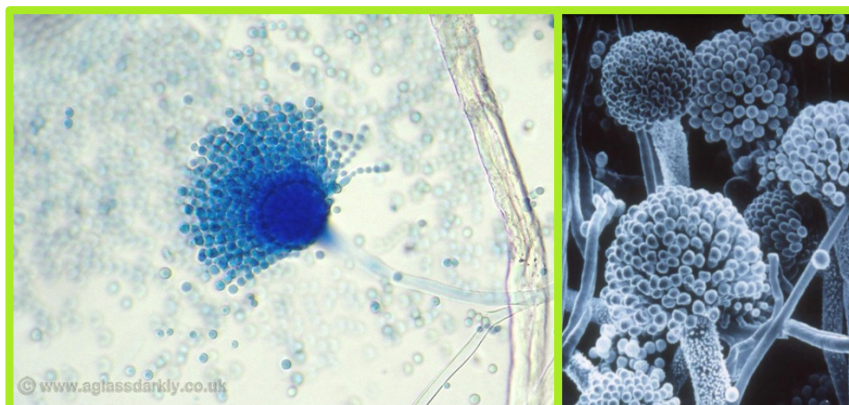


Fig. 6: Imatges *Aspergillus flavus* vist al microscopi òptic (esquerra) i al microscopi electrònic de rastreig (dreta)

2.2.2 DISTRIBUCIÓ *ASPERGILLUS*

Com altres floridures, *Aspergillus* té una distribució mundial, com a resultat de la producció de nombrosos conidis, que poden ser dispersats pel vent i pels insectes. *Aspergillus flavus* creix millor en presència d'humitat. La seva temperatura òptima de creixement és 37°C, però pot desenvolupar-se entre els 12 i els 48°C. Espores i altres propàguls d'aquesta espècie es poden trobar habitualment al sòl, l'aire i l'aigua.

El sòl és un dels ambients habituals d'aquesta espècie, on duu a terme un paper molt important com a reciclador de nutrients. *Aspergillus flavus* també és molt freqüent en l'aire, sobretot als països tropicals. Les condicions climàtiques influeixen en la prevalença d'aquest fong. Calvo *et al.* (1980) van comprovar que a Barcelona l'*Aspergillus flavus* i *A. niger* eren les espècies més freqüents a l'atmosfera, mentre que Guinea *et al.* (2005) van constatar que a Madrid era *Aspergillus fumigatus*. Altres estudis realitzats a Londres, París, Lió i Marsella (Mallea *et al.*, 1972), reflecteixen l'abundància d'*Aspergillus versicolor* al sud, mentre que a París, Londres i Brussel·les, *A. fumigatus* és el més abundant. També s'ha comprovat l'existència d'aquest fong en l'aire de sales d'hospitals i domicilis particulars.

2.2.3 CLASSIFICACIÓ DE LES AFLATOXINES

Resultat del metabolisme d'algunes soques d'*Aspergillus flavus* i *A. parasiticus* i de les espècies relacionades, *A. nomius* i *A. niger*, és la producció d'unes toxines, anomenades aflatoxines, que són substàncies altament tòxiques. Existeixen quatre aflatoxines importants: B₁, B₂, G₁, G₂ i dos productes metabòlics addicionals, M₁ i M₂. Les aflatoxines M₁ i M₂ varen ser aïllades de la llet d'animals alimentats amb pinsos contaminats; la designació de la lletra M,

prové de la paraula "milk" (llet en anglès). Mentre que la designació de B, de les aflatoxines B₁ i B₂, prové de la fluorescència blau ("blue") sota l'exposició a la llum ultraviolada (UV), la designació de G, es refereix a la fluorescència de color verd groguet ("green") de les estructures il·luminades amb la llum UV. Aquestes toxines tenen estructures similars i formen un grup únic de compostos heterocíclics altament oxigenats, naturals.

2.2.4 OBTENCIÓ DE L'AFLATOXINA UTILITZADA

L'aflatoxina B₁ que s'ha utilitzat al PCB va ser encarregada a l'empresa **Sigma Aldrich**. Es va demanar 1 mg de l'aflatoxina B₁, concretament. (referència: A6636-1MG).

També s'havia suggerit la possibilitat de cultivar el fong en plaques de Petri amb agar dextrosa patata i mesclar el producte obtingut, en diferents proporcions, amb el substrat que es proporciona als cucs. Però aquest procediment es va considerar molt més laboriós.



Fig. 7: *Aspergillus flavus* en placa

2.2.5 CARACTERÍSTIQUES DE L'AFLATOXINA B₁

-**Fórmula molecular:** C₁₇H₁₂O₆

-**Pes molecular:** 312,3 g/mol

-**Punt de fusió:** 268-269°C

-**Temperatura d'emmagatzematge:** 2-8°C

-**Coefficient d'extinció:**

EmM = 25,6(223NM), 13,4 (265nm), 21,8(363nm)

-**Emissió màxima de fluorescència:** 425nm (etanol)

-**Sinònims:** AFB₁, Aflatoxina B, Aflatoxina B₁, 6-Methoxydifurocoumarone

-**Solubilitat:** cloroform, etanol absolut i DMSO

A l'etiqueta del producte, hi ha un pictograma que diu que és un producte cancerigen, que pot modificar l'ADN de les cèl·lules i provocar danys a la persona exposada o a la seva descendència. Un altre pictograma adverteix que es tracta d'un producte que pot produir efectes negatius en les funcions sexuals, perjudicar la fertilitat, provocar la mort del fetus o produir-li malformacions. L'aflatoxina pot alterar el funcionament d'alguns òrgans, com el fetge i també pot afectar als pulmons provocant al·lèrgies respiratòries.

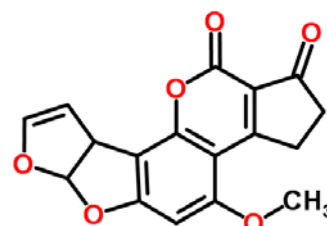


Fig. 8: Estructura molecular aflatoxina B₁

Els efectes perjudicials de les aflatoxines es deuen a la seva capacitat d'unir-se de forma covalent a l'ADN. Els danys de l'ADN condueixen a la mutagènesis seguida d'una possible disfunció cel·lular. L'aflatoxina B₁ indueix la transversió de G a T al codó 249 del gen supressor de tumors p53 .

Aquestes micotoxines són altament tòxiques i molt carcinogèniques. Es troben entre les substàncies carcinogèniques del fetge més potents que es coneixen i són considerades els carcinògens biològics més importants.

2.2.6 AFLATOXINES EN EL MENJAR

Les aflatoxines són un contaminant particular del menjar. Es poden trobar en els productes alimentaris derivats de plantes o animals exposats al creixement de la floridura, particularment quan els productes alimentaris estan emmagatzemats. Els seus derivats tòxics poden també trobar-se com contaminants indirectes en productes alimentaris. L'exposició humana és usualment el resultat del consum alimentari.

Productes com els cereals (blat de moro, arròs, civada i melca), oleaginoses (cacauets, cacau, nous i pistatxos), així com fruits secs y espècies (pebre i xilis secs, entre d'altres) són productes en els que freqüentment trobem aquesta aflatoxina. Les aflatoxines, produïdes pel fong *Aspergillus flavus*, no es veuen, no tenen sabor ni olor, són resistentes a la calor i als processos de cocció, ultrapasteurització, nixtamalització i fermentació.



Fig. 9: Aliments que poden presentar aflatoxina B₁

Encara que la detecció d'aquesta floridura en productes alimentaris indica el risc potencial de contaminació per potencial de l'aflatoxina, la presència d'aquesta floridura no és una comprovació de contaminació per aflatoxina. Actualment s'han dissenyat nous aparells per tal de calcular els valors no solament de l'aflatoxina B₁ sinó d'altres productes tòxics de forma ràpida. Un exemple és un aparell anomenat ToxiQuant dissenyat per l'empresa anglesa Toximet. Aquest aparell va ser guanyador del premi d'Innovació del Consell Internacional de Nous i Fruits Secs (INC).

3. MATERIAL I MÈTODES

Es va realitzar un test de toxicitat aguda i amb cucs supervivents es va dur a terme el test de genotoxicitat anomenat *Comet Assay*.

3.1 TEST DE TOXICITAT AGUDA

Aquesta prova té com a finalitat determinar les concentracions de la dosi letal, i de la dosi efectiva. La dosi letal (LC50) és la concentració de tòxic necessària per causar la mort del 50% de la població tractada en un temps determinat. La dosi efectiva (EC50) és la concentració del tòxic que origina l'efecte definit prèviament.

3.1.1 EQUIPAMENT

- Tubs de vidre de fons pla d'uns 8 cm de llarg i 3 cm de diàmetre.
- Paper de filtre de grau mig de 80 a 85 g/cm² i aproximadament 0,2 mm de gruix.
- Parafilm.
- Balança de precisió.
- Micropipetes.
- Estufa o incubador capaç de mantenir una temperatura de 20 ± 2°C.

3.1.2 SELECCIÓ D'INDIVIDUS

Es van seleccionar 10 individus per cada tractament. Com es van realitzar 5 tractaments, es van necessitar 50 individus. Es van seleccionar individus adults (amb clitel) i d'edat semblant. Els cucs es van netejar amb aigua desionitzada i es van assecar abans de pesar-los. El pes mitjà per grup va ser de 3 a 6 grams.

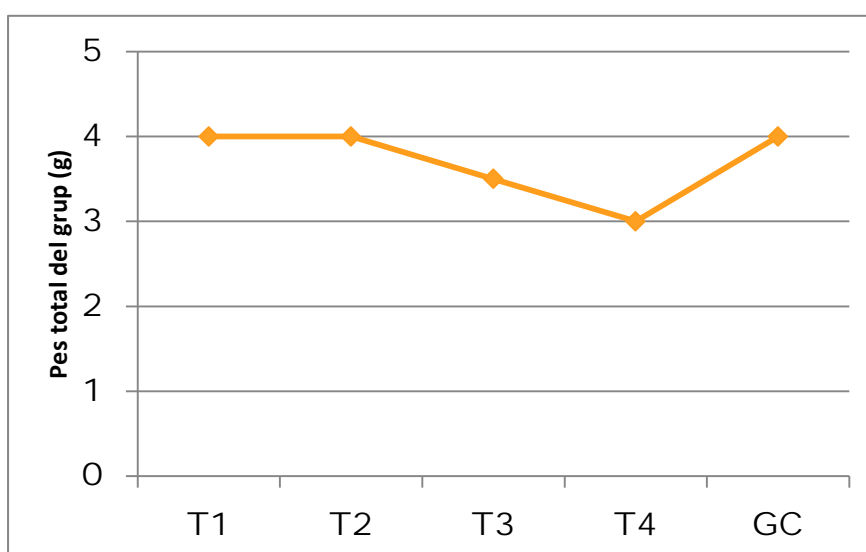
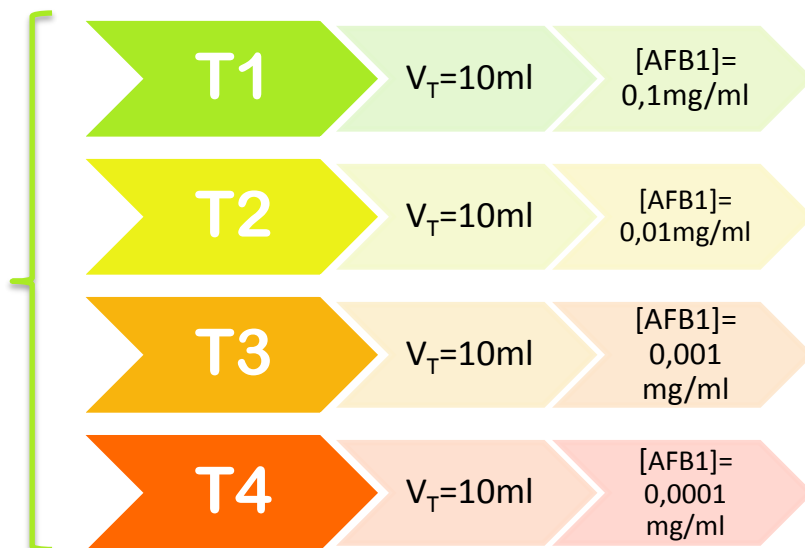


Fig. 10: Pes dels grups d'*Eisenia foetida*

3.1.3 CÀLCUL DE LES CONCENTRACIONS

Es va dissoldre l'aflatoxina B₁ en etanol absolut. Es van preparar quatre concentracions diferents de l'aflatoxina i de cadascuna es van omplir 10 ml. Al no conèixer les dosis tòxiques, es va optar per escollir les concentracions establertes que van ser:



Encara que nominalment es van anotar aquestes concentracions, el resultat dels càlculs al laboratori són una mica diferents: T1: 0,090009 mg/ml ; T2: 0,009009 mg/ml ; T3: 0,00090009 mg/ml ; T4: 0,000090009 mg/ml.

Com a control negatiu també es van omplir 10 ml però només del dissolvent (etanol).

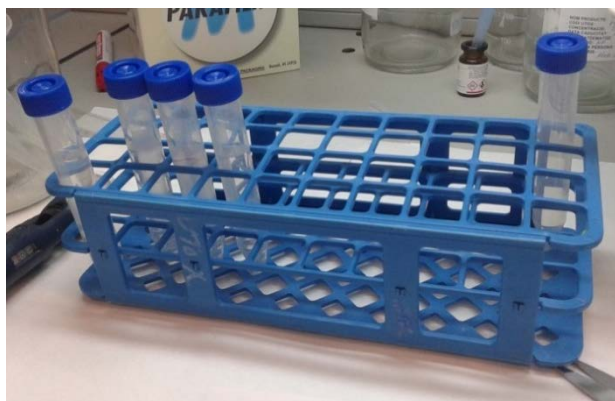


Fig. 11: Imatge tubs de cada tractament al laboratori

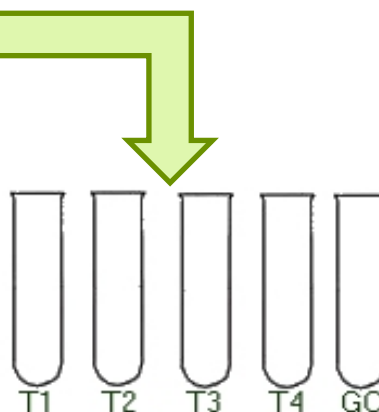


Fig. 12: Representació tubs de cada tractament

3.1.4 PREPARACIÓ DE L'ASSAIG

Es van preparar 4 tractaments i un grup control. Per cada tractament, es van fer 10 rèpliques, és a dir, es van utilitzar 10 vials per a cada tractament i també per al grup control.

Es va cobrir la paret interior dels vials amb paper de filtre, sense que es solapés. Després es va afegir 1 ml de la dissolució preparada prèviament, a cada vial. Mitjançant la micropipeta, amb el vial quasi horitzontal, es va afegir la dissolució mentre que es girava el vial, per tal que la dissolució s'impregnés en tot el paper.

Tot seguit, es va procedir a portar els vials a assecar a la campana de flux laminar. Quan van estar secs, es van treure de la campana i es va afegir 1ml d'aigua desionitzada a cadascun del vials. També es va introduir un cuc per vial, i es van tancar amb parafilm que es va foradar per a què el cuc pogués respirar. Finalment es van deixar en una estufa a 20 ± 2 °C.

Els cucs van estar en exposició durant 48 hores. Un cop va passar aquest temps, es van analitzar els cucs de tots els vials per estimar la mortalitat. Es treia el parafilm i amb l'ajuda d'unes pinces comprovàvem si els cucs havien mort.

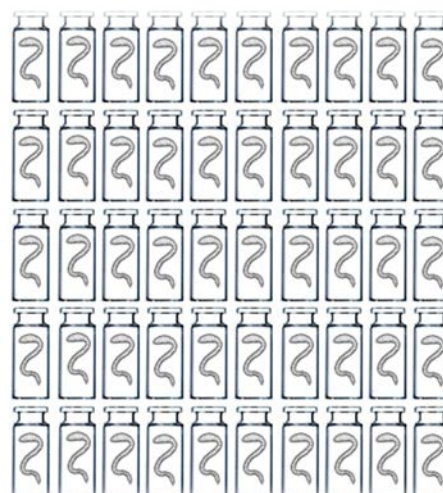


Fig. 13: Representació vials



Fig. 14: Procediments del test de toxicitat aguda

3.1.5 OBSERVACIONS

Del grup control, tres individus van perdre líquid celomàtic en el moment d'introduir-los als vials. Possiblement, pel dany produït en el procés de

manipulació.

3.2 COMET ASSAY

El «*comet assay*» alcalí o «*single-cell gel electrophoresis assay*» (electroforesi de cèl·lules individuals en gels d'agarosa) és un assaig de genotoxicitat que permet detectar trencaments en cadenes senzilles d'ADN en pràcticament tots els tipus de cèl·lules eucariotes. Va ser realitzat per primer cop per Östling & Johansson el 1984 i va ser modificat per Singh el 1988. Actualment, s'ha generalitzat el seu ús ja que es considera una tècnica genotòxica estàndard.

Consisteix en sotmetre una suspensió cel·lular de puresa i concentracions adequades, procedent d'òrgans d'animals o de cultius cel·lulars i estesa sobre un portaobjectes en un gel d'agarosa, a una lisi alcalina, primerament, que provoca el desenrotllament de la fibra d'ADN, i posteriorment, a una migració electroforètica de curta durada.

L'ADN, tenyit amb un fluorocrom apropiat, és observat mitjançant un microscopi de fluorescència. El material genètic no danyat migra agrupat en una massa arrodonada, però, en cas d'haver-se produït fragmentació, els segments d'ADN de mida menor migren a una distància superior, produint-se una imatge semblant a la cua d'un cometa.

3.2.1 PROCEDIMENT

Aquesta tècnica s'ha realitzat en cinc etapes ben diferenciades.

3.2.1.1 PREPARACIÓ DE LA PRIMERA CAPA D'AGAROSA

Es va encendre el bany termostàtic i es va programar a una temperatura de 50°C. Es va preparar agarosa per a electroforesi de punt de fusió normal, al 1%, en aigua milli-Q, en un matràs Erlenmeyer omplert fins la meitat del seu volum, o menys. Per preparar la dissolució s'ha d'introduir en un microones i escalfar-la sense que bulli, mitjançant petits polsos, alternats amb moviments d'agitació del matràs, fins que l'agarosa s'hagi dissolt completament. Després, es va temperar la solució sota un flux d'aigua freda i es va posar dins del bany termostàtic.

Tot seguit, es va transferir part de la solució d'agarosa a un vas de precipitats. Es van submergir els portaobjectes en la solució d'agarosa al 1% i a 50°C. Posteriorment, es va treure cada portaobjectes de la solució i es va netejar la part de sota. Finalment, es va deixar assecar el porta a temperatura ambient i es va guardar en una capsa de preparacions.

3.2.1.2 OBTENCIÓ DE LA SUSPENSIO CEL·LULAR

Aquesta fase depèn del tipus cel·lular que es vol testar i de la procedència de les cèl·lules. Es necessita un mínim de 10^4 cèl·lules nucleades en 100µl de suspensió i un màxim de 5×10^5 , si la quantitat és menor es fa difícil trobar cèl·lules, i si és major, es solapen. En el nostre cas, com es tractava de cel·lules de lumbrícids, es va aplicar un procediment específic.

El procés consisteix a rentar els cucs amb solució salina (0,57 g NaCl/100 ml aigua) a temperatura ambient, un mínim de 3 cops. Es van seleccionar 13 cucs: 1 individu que va sobreviure al tractament 1, 3 individus que van sobreviure al tractament 2, 3 individus que van sobreviure al tractament 3, 3 individus que van sobreviure al tractament 4 i 3 individus del grup control.

Els cucs seleccionats es van col·locar sobre un paper de filtre humitejat amb aigua de l'aixeta i se'ls hi va fer un massatge de les $\frac{3}{4}$ parts terminals, fins a la cua, en sentit longitudinal, per buidar el contingut de l'intestí de matèria orgànica i de bacteris que poguessin malmetre la mostra. Tot seguit, es va introduir cada cuc en un tub de microcentrífuga ("ependorf") de 12 ml, al qual es va afegir 3 ml de líquid d'extrusió (95 % de salí, 2,5 mg/ml EDTA sòdic, 10mg/ml de GCE i 5 % de alcohol absolut) a temperatura ambient i a pH de 7.3, durant 3 minuts. Passats els 3 minuts, es van treure les restes visibles de cada cuc amb unes pinces, mentre que el líquid obtingut es va centrifugar a 3000 g durant 3 minuts. Després, es va extreure el sobrenedant mitjançant una pipeta. Es va afegir 1ml de salí, es va pipetejar la dissolució i, tot seguit, es va traslladar el contingut a un altre eppendorf, el qual vam tornar a centrifugar a 3.000 g durant 3 minuts. Finalment, el precipitat es va resuspendre en 60 µl de salí.



Fig. 15: Muntatge procediment

3.2.2.3 SEGONA CAPA D'AGAROSA

Es va preparar una solució d'agarosa de baix punt de fusió, al 0,9% en aigua miliQ. Per dissoldre-la, es va passar la dissolució pel microones durant curts períodes de temps, sense que bullís. Es va temperar el bany termostàtic a 37°C i després es van barrejar la suspensió cel·lular amb solució d'agarosa (60µl suspensió cel·lular + 80µl agarosa).

Un cop es va tenir la suspensió cel·lular en l'agarosa, es va aplicar sobre el portaobjectes en gotes de 5µl, efectuant un moviment circular de la pipeta per tal que aquestes quedessin el més planes possibles sobre la superfície dels portaobjectes. Seguidament, els portaobjectes es van deixar 15 minuts sobre una superfície plana i sobre gel. Finalment, es van mantenir a -20°C durant 6 minuts exactes.



Fig. 16: Aplicació suspensió cel·lular sobre portaobjectes

3.2.2.4 LISI ALCALINA

A la solució stock es va afegir un 1% de Triton X100 i 1% de Lauryl Sarcosine, minuts abans d'iniciar la lisi. Per fer la lisi, es van submergir els portes en la solució durant 2 hores. Aquest procés es va realitzar a 4°C i sense llum.



Fig.17: Portes sotmesos a la solució

3.2.2.5 PREPARACIÓ DE LA CUBETA D'ELECTROFORESI

Transcorregut el temps de lisi, es van traslladar els portes a una cubeta d'electroforesi plena de tampó d'electroforesi, on es van mantenir a 4°C, durant 20 minuts. Per tal que el pas del corrent durant l'electroforesi fos uniforme al llarg de tota la superfície, es van omplir les fileres lliures amb portes sense agarosa, per igualar la resistència. Els portes es van col·locar l'un al costat de l'altre, molt propers, ben arrengrats i banyats en el tampó d'electroforesi.

3.2.2.6 ELECTROFORESI ALCALINA

Es va iniciar en connectar la cubeta d'electroforesi a la font d'alimentació. La solució es va fer córrer a 0,8-1,5 V/cm i 300 mA durant dues hores, en el nostre cas. Si els paràmetres no s'ajusten, s'ha de treure o afegir tampó d'electroforesi fins arribar als valors desitjats.

5.2.2.7 NEUTRALITZACIÓ PH:7.5

Després de treure els portes de la cubeta, es van fer 3 rentats, durant 5 minuts, en solució Tris 1M. Posteriorment, es van assecar sobre paper i es van guardar en una caixa de preparacions.



Fig. 18: Cubetes amb solució Tris 1M

3.2.2.8 TINCIÓ

Si els portes s'han deixat assecar, s'han de tornar a hidratar, durant 10 minuts amb aigua milli Q. Posteriorment es tenyeixen amb 20µl de DAPI o 4',6-diamino-2-fenilindo, marcador fluorescent que s'uneix fortament a regions enriquides en Adenina i Timina en seqüències d'ADN, a una dilució de 5µg/ml, escampant-lo bé per la superfície dels portes. El DAPI s'ha de mantenir a 4°C mentre no es faci servir i cal evitar en tot moment que li arribi la llum. Abans d'observar la preparació pel microscopi, convé esperar 3 minuts per a que el DAPI actuï. Cal mantenir en tot moment la llum apagada, per a evitar la degradació del DAPI.

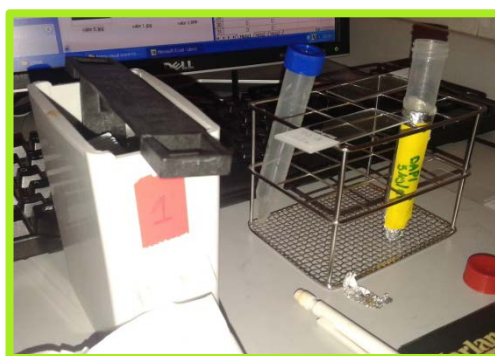


Fig. 19: DAPI per tenyir els portes

3.2.2.9 OBSERVACIÓ I VALORACIÓ DELS RESULTATS

Existeixen dues formes d'analitzar els resultats, una d'automàtica i l'altra de manual. En ambdós casos la base és la utilització d'un microscopi d'epifluorescència amb un filtre que permeti el pas de longituds d'ona d'excitació de l'espectre ultraviolat, entre 330 i 380 nm. La diferència és que en

un cas l'observació es complementa amb l'ús d'un software especialitzat, mentre que en l'altre cas només s'utilitza el microscopi.

En el cas de fer l'observació amb software, es fa servir un aplicatiu especialitzat anomenat *Comet Assay IV*, amb el qual es poden detectar fàcilment les cèl·lules i mesurar-les amb gran exactitud. És molt senzill d'utilitzar, però es requereix la presència d'una càmera de video instal·lada sobre el triocular del microscopi d'epifluorescència i connectada a un ordinador.

Consisteix en connectar el microscopi d'epifluorescència a l'ordinador. La càmera de video, d'alta resolució, transfereix les imatges al monitor de l'ordinador. Aquestes imatges reflecteixen el que s'observa per l'ocular del microscopi. Qualsevol reenfoament o moviment de la platina es mostra en la pantalla, en temps real. El procés resulta tant senzill com clicar a les cèl·lules, perquè el programa proporciona immediatament tots els paràmetres de mesura. Per tal d'enregistrar la següent cèl·lula, es torna a repetir el procés. Per fer el procés més fàcil, les cèl·lules enregistrades es marquen amb una creu, per a evitar la possible repetició. Totes les cèl·lules avaluades i els seus respectius resultats són afegits automàticament a una llista de resultats. No obstant, les preparacions han d'haver estat ben executades. Contràriament, el procés no es realitza de forma eficaç.

Quan es fa servir només el microscopi, s'analitza la placa ordenadament i es fa una estima del grau d'afectació de cadascuna de les cèl·lules. Aquest grau d'afectació es va avaluar del 0 al 3, que és respectivament de menor al major. No es va comptabilitzar el nivell 2, per les dificultats que comporta la diferenciació dels nivells 1 i 3, en alguns casos. Aquest mètode s'anomena *Visual Score*.

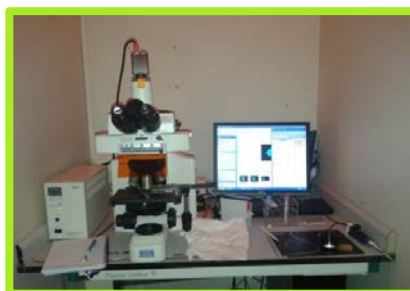


Fig. 20: Imatge microscopi epifluorescència

Al grau 0, es troben les cèl·lules ben definides, de contorn arrodonit, per no haver-se produït la fragmentació de l'ADN. Quan els nivells d'afectació van augmentant, la fragmentació és fa evident, i apareix l'anomenada cua del cometa, que pot ser més llarga o més curta. El procés amb el que es va dur a terme l'avaluació del procés va ser el segon, perquè el software no va ser capaç de detectar correctament els nuclis.

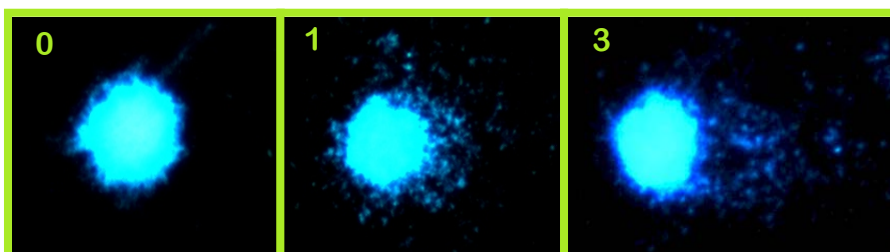


Fig. 21: Graus d'afectació *Comet Assay* mitjançant dosis creixents d'un genotòxic conegut *MMS*

4.RESULTATS

4.1 TEST DE TOXICITAT AGUDA

Els resultats mostren una mortalitat més elevada entre els cucs sotmesos a dosis més altes d'aflatoxina B₁ (figura 22). Mentre que entre els sotmesos al tractament 1 van morir 7 individus (70%), entre els sotmesos al tractament 2 van morir 2 (20%), cap (0%) entre els sotmesos al tractament 3 i un individu entre els sotmesos al tractament 4.

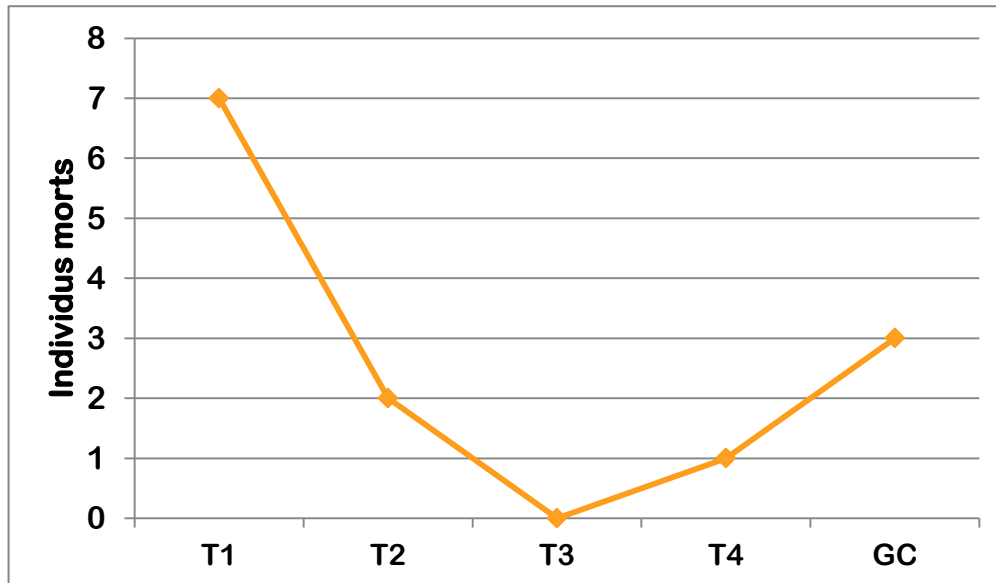


Fig. 22: Gràfic dels individus morts test toxicitat aguda

No obstant, s'ha de dir que va escapar un cuc dels sotmesos al tractament 3, que no s'ha comptabilitzat com a mort, i que els tres individus morts del grup control van manifestar pèrdua de líquid celomàtic prèviament, durant el procés de manipulació, com s'ha informat anteriorment.

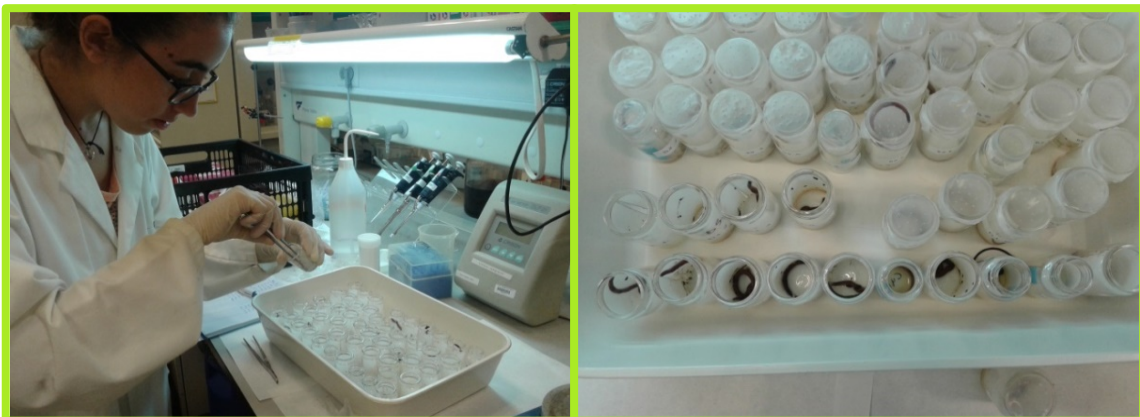


Fig. 23: Vials passades les 48 hores

Amb els resultats obtinguts, es va calcular la mortalitat (Fig. 23).

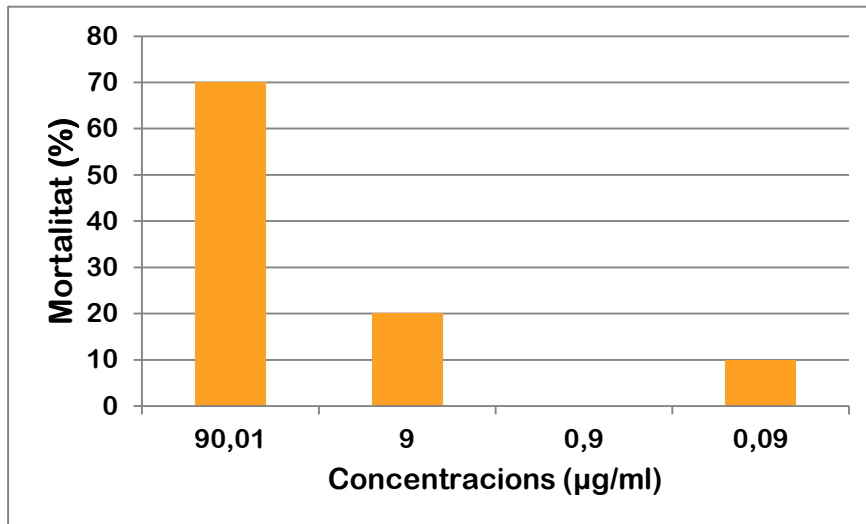


Fig. 24: Gràfic en què es relaciona la concentració d'aflatoxina B₁ amb la mortalitat.

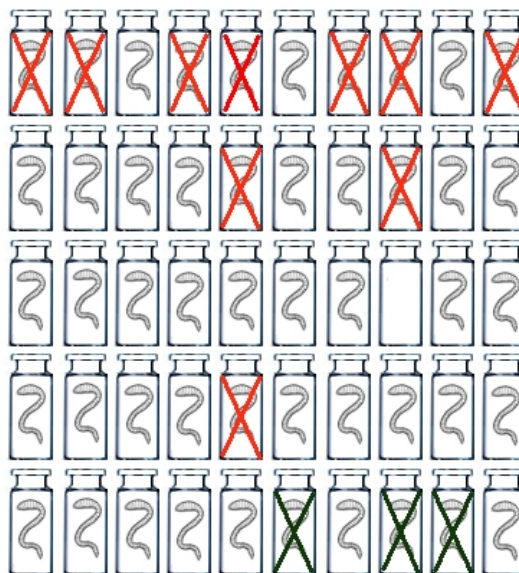


Fig. 25: Representació dels cucs morts en cada tractament.

4.2 COMET ASSAY

Els resultats del *Comet Assay* van mostrar una major afectació a les dosis més altes i una menor afectació a les baixes. També es va comprovar la manca d'afectació al grup control.

Es van analitzar 60 cèl·lules de cada placa. Els resultats es van anotar a un full d'Excel. La mitjana dels resultats obtinguts per cada rèplica analitzada va ser la següent:

TAULA 1. COMET ASSAY, MITJANA DE RESULTATS OBTINGUTS PER A CADA INDIVIDU

GC	T1	T2	T3	T4
0,17	0,05	0,12	2,8	2,76
2,66	2,76	2,22	2,08	1,90
1,68	1,63	2,08	1,90	1,68
1,63	2,08	1,90	1,68	2,08

S'ha de tenir en compte que els rangs del *Visual Score* són: 3- màxim dany i 0-sense danys.

TAULA 2. COMET ASSAY, MITJANA GENERAL RESULTATS OBTINGUTS PER A CADA TRACTAMENT

GC	T1	T2	T3	T4
0,11	2,80	2,73	2,07	1,80

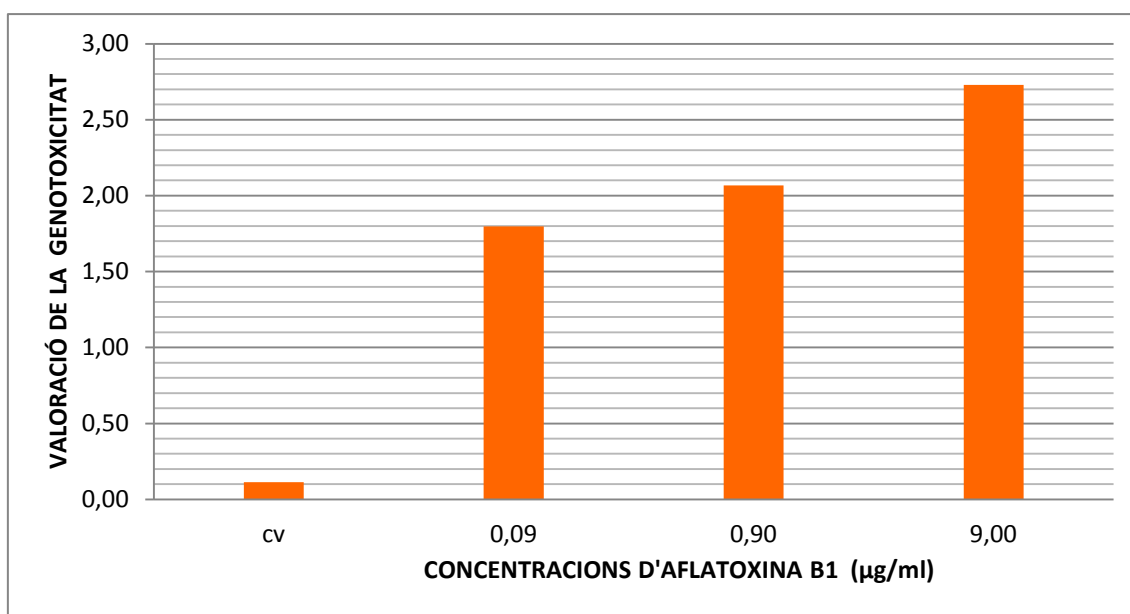


Fig. 26: Valoració de la toxicitat en relació a la concentració de l'aflatoxina B₁

5. DISCUSSIÓ I CONCLUSIONS

L'aflatoxina B₁, produïda pel fong *Aspergillus flavus*, causa efectes tòxics sistèmics i genotòxics sobre el cuc *Eisenia foetida*. Amb el test de toxicitat aguda, s'ha manifestat una mortalitat progressiva a cadascun dels tractaments, assolint el 70% al tractament 1 (90,01 µg/ml). Queda per tant demostrat que per dosis superiors a 90 µg/mL la mortalitat del cuc de terra es evident, obtenint un 20% d'efecte sobre la viabilitat. Pel que fa al test de genotoxicitat, es veu una dosi-resposta clara en quant a l'afectació del DNA. Un augment de la dosi d'aflatoxina B₁ causa un increment de dany en el DNA. Dosis superiors a 0,09 µg/mL causen un efecte molt evident sobre el DNA.

No s'ha pogut determinar amb exactitud la **dosi letal** d'aflatoxina B₁ per a *E. foetida*. No obstant, podem estimar que es troba entre les concentracions dels tractaments 1 (90,01 µg/ml) i 2 (9 µg/ml), que van comportar unes mortalitats del 70% i del 20%, respectivament. Per tal de determinar amb precisió la dosi letal, s'haurien d'haver fet molt més tractaments.

Pel que fa a la **dosi efectiva** i malgrat no haver-se definit un efecte concret en el moment d'iniciar-se l'experiment, podem afirmar pels resultats del *Comet assay* que s'ha manifestat efecte genotòxic a totes les concentracions utilitzades de l'aflatoxina. Per a propers estudis, s'hauria de reduir el factor de dilució entre les dosis per tal d'acotar millor la EC50.

La mort de tres cucs del grup control indica que la manipulació dels exemplars potser no es va fer de la forma adient, aquesta hauria de ser precisa per evitar alterar-los durant el procés.

No obstant, creiem que es pot afirmar que el cuc de Terra californià, *Eisenia foetida*, es veu afectat per l'aflatoxina B₁, tant a nivell sistèmic com a nivell genòmic. I per tant, que la nostra hipòtesi inicial, que contemplava la possibilitat del desenvolupament d'alguna mena de resistència, ha estat refutada. No és fàcil trobar una explicació a aquest fet. D'una banda, potser s'ha reconegut una convivència entre el cuc i el fong que realment no ha existit, ja que el sistema utilitzat es un sistema aïllat on només es testa l'aflatoxina i el cuc. No es té en compte un ecosistema complert. També s'ha de tenir en compte que *E. foetida* és un organisme molt cultivat, resultant en bona part d'una intensa selecció artificial. D'altra banda, s'ha admès que la presència del fong *Aspergillus* en un determinat medi, en aquest cas el sòl, ha de ser un indicatiu segur de la presència de l'aflatoxina B₁, quan tampoc coneixem les condicions ambientals que afavoreixen la producció del tòxic. També es desconeixen les concentracions d'aflatoxina que es poden trobar habitualment al medi ambient i les dosis que en exposicions més o menys perllongades poden afectar als éssers humans. Possiblement les concentracions utilitzades de 90 µg/ml són massa elevades i poden afectar indiscriminadament a tot tipus d'organismes.

Aquests dubtes, la ubiqüitat del fong i les importants conseqüències que pot tenir l'aflatoxina per a la salut humana, són factors que poden justificar aquest estudi i altres investigacions posteriors.

Finalment, he de dir que, independentment dels resultats obtinguts, considero que la meva experiència ha estat totalment satisfactòria, perquè m'ha permès conèixer els tipus de treballs que es fan a la Unitat de Toxicologia i Ecotoxicologia, les tècniques i els instruments que fan servir, i molt especialment, el seu personal investigador, que ha contribuït a fer la meva estada al PCB profitosa i inoblidable.

6. AGRAÏMENTS

Deixo constància del meu agraïment a totes les persones que m'han ajudat a fer aquest treball:

Als meus tutors del treball de recerca, David Ramos López, el meu tutor al Parc Científic, i Marian Querol, la meva tutora a l'institut Baldiri Guilera, per la seva disposició incondicional.

Al meu professor de biologia durant els últims dos anys, Antoni Garro, que va obrir-me els ulls a l'hora d'escollir un treball de recerca que m'assentés les bases de la metodologia científica i va presentar-me a Josep Maria Fernández Novell, qui em va ajudar momentàniament fins que finalment vaig accedir al Parc Científic.

A la meva família per donar-me un gran ajut emocional i estar sempre disposats a ajudar-me. Al meu germà per ajudar-me a l'hora de polir el treball, i, especialment, al meu pare, que va saber presentar-me el món de la investigació i va ajudar-me des del primer moment fins l'últim en tot el procés de fer realitat el treball.

Als meus amics, la majoria dels quals passem per la mateixa situació i ens hem ajudat constantment fent així la carrega del treball menys feixuga.

A l'Aida Llacuna Górriz, que va ajudar-me a fer les pràctiques durant l'estada al Parc Científic.

A tot l'equip del Parc Científic, per brindar-nos l'oportunitat tant a mi com als altres companys de realitzar el treball al seu centre i apostar d'aquesta forma per nosaltres. Sense aquesta possibilitat, el treball hagués estat molt més difícil de realitzar.

No podria haver fet el treball sense la vostra ajuda, gràcies.

7. BIBLIOGRAFIA

BRUSCA, R.C & BRUSCA, G.J. 2003. *Invertebrados*. Mc Graw Hill. Aravaca, Madrid.

CORNEJO, J & VILLARROEL, O. *Antecedentes generales sobre las aflatoxinas y otras micotoxinas y elementos a tener en cuenta para el diseño de prácticas correctas de cultivo y elaboración de nueces*. Gobierno de Chile, Ministerio de Salud. Accesible a l'adreça: <http://web.minsal.cl/portal/url/item/72fd6274dad8792ee04001011f0109e4.pdf>

DURÁN, L. & HENRÍQUEZ, C. *Crecimiento y reproducción de la lombriz roja (Eisenia foetida) en cinco sustratos orgánicos*. Agronomía Costarricense. Accesible a l'adreça: http://www.mag.go.cr/rev_agr/v33n02_275.pdf

OECD. 1984. *OECD Guideline for testing of chemicals "Earthworm, Acute Toxicity Tests"*. Accesible a l'adreça: <http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/9720701e.pdf?expires=1422465527&id=id&accname=quest&checksum=36D2F955B92C372EE83A347A335F8334>

PETRINI, L. E. & O. PETRINI. 2013. *Identifying moulds, A practical guide*. J. Cramer in der Gebrüder Borntraeger Verlagsbuchhandlung. Stuttgart, Germany.

STORER, T.I, USINGER, R.L, STEBBINS, R.C & NYBAKKEN, J.W. 2003. *Zoología general*. Omega. Barcelona

RUBIO, R. 2011. *Incidencia de aflatoxinas en leche de oveja y derivados en Castilla la Mancha. Albacete*. Accesible a l'adreça: <https://www.educacion.gob.es/teseo/imprimirFicheroTesis.do?fichero=23321>

SERRET, J. *Comet alcalí*. Parc Científic Barcelona.

SERRET, J. 2014. *Test de toxicitat aguda en cucs de terra*. Parc Científic Barcelona.

SIGMA ALDRICH. *Product information Aflatoxin B₁*. Sant Louis, Missouri (USA). Accesible a l'adreça http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/a6636pis.pdf

8. WEBGRAFIA

<http://inversanet.wordpress.com/2011/09/07/ciclo-biologico-y-desarrollo-de-eisenia-foetida-lombriz-roja/>

<http://www.manualdelombricultura.com/manual/conceptos.html>

<http://www.manualdelombricultura.com/manual/imagenes.html>

<http://repositorio.ulead.edu.ec/handle/26000/117>

<http://www.asturhumus.net/>

http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/veterinaria/v12_n2/micotoxicosis.htm

<http://www.vermicuc.com/humus/la-lombriz.htm>

<http://mic.sgmjournals.org/content/153/6/1677.full>

<http://www.aspergillusflavus.org/>

<http://www.aspergillus.org.uk/>

<http://www.toximet.com/>

<http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/micologia/aspergilosis.html>

http://en.wikipedia.org/wiki/Comet_assay

<http://www.perceptive.co.uk/cometassay/es/>

<http://www.monografias.com/trabajos40/lombriz-roja-californiana/lombriz-roja-californiana.shtml>

<http://www.jornada.unam.mx/2013/07/16/ciencias/a03n1cie>

<http://alvaroalonsodocencia.wikispaces.com/Probit-CL50>

9. ANNEXOS

9.1 TAULA RESULTATS COMET ASSAY

CV2	CV1	CV3	D41	D42	D43	D31	D32	D33	D21	D23	D22	D1
0	0	0	3	0	3	1	3	3	3	3	3	3
0	0	0	0	1	1	3	0	1	1	3	3	3
0	0	0	1	1	3	3	1	1	3	3	3	3
0	0	1	0	3	3	0	3	3	3	3	3	3
0	0	0	1	1	3	3	3	1	3	3	3	3
0	0	0	0	0	3	1	1	1	3	3	3	3
1	0	0	1	3	1	3	3	3	3	3	3	3
0	0	0	3	3	1	3	1	1	3	3	3	3
0	0	0	0	1	1	3	3	1	3	3	3	1
0	0	0	0	3	3	1	1	1	1	1	3	3
1	1	0	0	0	3	1	3	1	3	1	3	3
0	0	0	0	3	3	1	1	1	3	1	3	3
0	0	0	0	1	1	1	3	3	3	3	3	3
0	0	0	3	0	3	3	3	3	3	3	3	1
0	0	0	3	0	3	1	1	1	3	3	3	1
0	0	0	3	1	3	3	1	3	3	3	3	3
0	0	0	1	0	3	3	3	3	3	3	3	3
0	0	1	3	0	3	0	1	1	3	1	3	3
1	0	0	1	3	3	1	3	0	3	3	3	3
1	0	0	1	3	1	3	3	1	1	3	3	3
1	0	0	1	3	1	3	1	3	1	3	1	3
0	0	0	1	1	0	3	3	3	3	3	1	3
0	0	0	3	0	3	1	0	3	3	3	1	3
0	0	0	1	1	3	3	1	1	1	3	3	3
0	0	0	3	1	3	3	1	3	3	3	1	3
0	0	0	3	1	1	3	3	3	3	1	1	3
1	0	0	3	1	1	1	1	1	3	1	3	3
0	0	0	1	3	1	1	1	0	3	3	3	3
0	0	0	3	3	3	1	3	1	3	3	3	1
0	0	0	3	3	3	3	3	3	3	1	3	3
0	0	0	1	1	1	3	1	3	3	3	3	3
0	0	0	1	1	3	3	3	3	3	3	3	3
0	0	0	1	1	3	3	1	3	3	1	3	3
0	0	0	3	0	1	3	3	3	1	3	3	3
0	0	1	3	1	3	3	1	1	3	3	3	3
0	1	0	0	3	3	1	1	1	3	3	3	3
0	0	0	1	1	0	3	3	0	3	3	3	3
0	0	1	3	3	3	1	3	1	3	3	3	3
0	0	0	3	3	3	3	1	3	3	3	3	3
1	1	0	3	3	1	1	1	1	3	3	3	3
0	0	0	1	0	3	3	3	3	3	3	3	3
0	0	0	3	0	1	1	1	3	3	3	3	3
0	0	0	1	3	3	1	3	0	3	3	3	3
0	0	0	3	3	3	1	3	3	3	3	3	3
1	0	0	0	1	3	3	3	3	3	3	3	3
1	0	0	1	3	1	3	1	3	3	3	3	1
0	0	0	3	3	1	3	3	3	3	3	3	3
0	0	0	3	1	0	3	3	3	3	3	3	3
0	0	0	1	3	3	1	3	0	3	1	3	3
0	0	0	3	3	1	3	1	0	3	3	3	1
1	0	0	3	0	3	3	3	1	3	3	1	3
0	0	0	1	0	3	1	3	3	3	3	3	3
0	0	1	1	1	0	3	3	3	3	3	3	3
0	0	0	1	0	3	3	3	3	3	1	3	3
0	0	0	3	3	1	3	1	1	3	3	3	3

