



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

CAMPO I

**CUANTIFICACIÓN DE AFLATOXINAS EN CACAHUATE BOTANERO
EXPENDIDO EN EL MUNICIPIO DE ATIZAPÁN DE ZARAGOZA**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
INGENIERA EN ALIMENTOS
P R E S E N T A :
VERÓNICA MAYELA HERNÁNDEZ IZQUIERDO

ASESORES:
Ph D. SARA ESTHER VALDÉS MARTÍNEZ
M. en C. CAROLINA MORENO RAMOS



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

PAGINACIÓN

DISCONTINUA



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
P R E S E N T E

AT'N: Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

Cuantificación de aflatoxinas en cacahuate botanero expendido en el
municipio de Atizapán de Zaragoza

que presenta la pasante: Verónica Mayela Hernández Izquierdo
con número de cuenta: 9754493-7 para obtener el TITULO de:
Ingeniera en Alimentos

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO

A T E N T A M E N T E.

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 6 de julio de 2001

PRESIDENTE

Dra. Sara E. Valdés Martínez

VOCAL

Q.F.B. Virginia Oliva Arellano

SECRETARIO

I.A. Rosalía Meléndez Pérez

PRIMER SUPLENTE

I.A. Sandra M. Rueda Enriquez

SEGUNDO SUPLENTE I.A. Miriam Alvarez Velasco

**Este trabajo se realizó en el Laboratorio 9. Tecnología de calidad de alimentos.
Edificio de Posgrado de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Campo 1.**

AGRADECIMIENTOS

A MI FAMILIA:

Dedico este trabajo con mucho cariño, respeto y admiración a mi papá, a mi mamá y a Moni, porque a ellos debo una parte esencial de lo que ahora soy.
A mi prima Erika por el entusiasmo y dedicación que siempre me ha contagiado.

A MIS MAESTROS:

Agradezco especialmente a la Dra. Sara, a Carolina Moreno, a Lupita López Palacios y al Ingeniero Alfredo Álvarez por todo el apoyo que me brindaron en la realización de esta Tesis.

A la Dra. Silvia, por su ayuda y amistad incondicionales.

A la profesora Gloria Borjón, por enseñarme la importancia de poner un granito de amor en todo lo que hagamos.

A Miss Olga, quien estuvo a mi lado en una de las etapas más importantes de mi vida: la adolescencia.

A Miss Margaret, por alentarme a realizar todos mis sueños.

A todos los profesores que he tenido desde el Kinder hasta la fecha: ¡GRACIAS!

A MIS COMPAÑEROS Y AMIGOS:

A la generación 21 de Ingeniería en Alimentos, por haberme dado la oportunidad de compartir con ellos esta maravillosa etapa de mi vida.

En especial a Denisse, a Juan Carlos y a Júpiter, quienes desde el primer semestre de la carrera me brindaron su valiosa amistad.

A mis amigos Ordaz, Katia, el "Pollo", Vanessa, Mireya y Lety.

Sinceramente

VERÓNICA MAYELA

ÍNDICE

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE	i
LISTA DE TABLAS	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
INTRODUCCIÓN	1
JUSTIFICACIÓN	3
OBJETIVOS	4
CAPÍTULO I. MARCO REFERENCIAL	5
1.1. El cacahuete (<i>Arachis hypogaea</i> L.)	5
1.1.1. Generalidades	5
1.1.2. Clasificación taxonómica	6
1.1.3. Descripción botánica	7
1.1.4. Composición química	8
1.1.5. Condiciones ecológicas y edáficas	9
1.1.6. Cosecha y rendimiento	9
1.1.7. Producción nacional	10
1.1.8. Procesamiento	11
1.2. Hongos en granos y semillas	17
1.2.1. Hongos de campo	17
1.2.2. Hongos de almacén	18
1.2.2.1. <i>Aspergillus flavus</i>	20
1.2.3. Hongos de deterioro avanzado	21
1.2.4. Contaminación fúngica en el cacahuete	24
1.3. Micotoxinas	26
1.3.1. Generalidades	26
1.3.2. Factores que afectan la producción de micotoxinas	28
1.3.3. Historia de las micotoxinas en alimentos	29
1.3.4. Aflatoxinas	31

1.3.4.1.	Descubrimiento de las aflatoxinas	31
1.3.4.2.	Presencia en alimentos	33
1.3.4.3.	Características generales	34
1.3.4.4.	Metabolismo y toxicidad	36
1.3.4.5.	Prevención y detoxificación	38
1.3.4.6.	Detección y cuantificación	42
1.3.4.6.1.	Columnas de inmovilización Easi-Extract	45
CAPÍTULO II. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL		47
2.1.	Cuadro metodológico	48
2.2.	Desarrollo experimental	51
2.2.1.	Objetivo particular 1	51
2.2.2.	Objetivo particular 2	53
2.2.3.	Objetivo particular 3	55
CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN		56
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES		61
GLOSARIO		65
REFERENCIAS		67
ANEXOS		
I.	PRINCIPALES CAUSAS DE MORTALIDAD EN MÉXICO	72

LISTA DE TABLAS

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla I. Composición química promedio del cacahuete pelado	9
Tabla II. Marcas que comercializan cacahuete estilo salado, enchilado y japonés	12
Tabla III. Contenidos de humedad en equilibrio (T=25°C) a humedades relativas de 65-90% y hongos encontrados	19
Tabla IV. Mínima a_w requerida para el desarrollo de diversos mohos	24
Tabla V. Principales especies productoras de micotoxinas y efectos adversos	27
Tabla VI. Principales propiedades fisicoquímicas de las aflatoxinas	38
Tabla VII. Carcinogenicidad de AFB ₁	37
Tabla VIII. Factores y niveles de variación muestreados	54
Tabla IX. Contenido de aflatoxinas en 47 de las 90 muestras de cacahuete botanero analizadas en los meses de febrero y junio del 2001	58
Tabla X. Análisis de varianza para el modelo de análisis factorial 3x2x5	59
Tabla XI. Medias de los lotes de cacahuete botanero adquiridos en los meses de febrero (lote 1) y junio (lote 2) del 2001	59

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Vainas que contienen las semillas de cacahuete	5
Figura 2. Planta del cacahuete	7
Figura 3. Superficie nacional sembrada con cacahuete, 1990-1991	11
Figura 4. Elaboración de cacahuete botanero enchilado y salado	13
Figura 5. Elaboración de cacahuete estilo japonés	16
Figura 6. <i>Aspergillus flavus</i>	20
Figura 7. Estructuras de las aflatoxinas	32
Figura 8. Derivados hidroxilados de AFB ₂ y AFG ₂	35
Figura 9. Metabolitos hidroxilados de AFB ₁ y AFB ₂	35
Figura 10. Columna de inmunoafinidad Easi-Extract	46
Figura 11. Cuadro metodológico general	48
Figura 12. Cuadro metodológico conectores 1, 2 y 3	49
Figura 13. Cuadro metodológico conector 4	50

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

El estudio de las aflatoxinas y su cuantificación en alimentos tanto para el ganado como para el hombre ha captado la atención de una gran cantidad de científicos e instituciones en todo el mundo a partir de 1961, año en el cual se llevó a cabo el descubrimiento de estas sustancias tóxicas (Goldblatt, 1969).

En la actualidad más de 50 países han establecido límites de contaminación con micotoxinas en alimentos destinados al consumo humano y animal (León *et al.*, 1999). En especial se ha legislado sobre la contaminación por aflatoxinas debido a su gran capacidad **carcinogénica, teratogénica y mutagénica** (Jaimez *et al.*, 2000).

Entre los alimentos susceptibles a contaminación por aflatoxinas, el cacahuate y sus productos juegan un papel clave en la evaluación del riesgo por la ingesta de aflatoxinas (Miller, 1987). Se ha reportado que los niveles de contaminación que ocurren en estos productos frecuentemente sobrepasan en cientos de veces el límite máximo de aflatoxinas permitido para el consumo humano, que en el caso de México, es de 20 ppb (Moreno Martínez *et al.*, 1990).

Las personas que consumen grandes cantidades de cacahuate de calidad inferior y otros cereales contaminados, principalmente el maíz, pueden ir acumulando gradualmente niveles subtóxicos de aflatoxinas que producen **ictericia no infecciosa** y otros signos de dolencia hepática y mal estado general (FAO, 1991).

Los datos disponibles para evaluar el riesgo que representan las aflatoxinas para el hombre, son hasta ahora limitados y discutidos, por lo que el objetivo del presente trabajo consiste en estimar el contenido de aflatoxinas y los factores que lo afectan en cacahuate botanero expendido en el municipio de Atizapán de Zaragoza utilizando un método que permita la cuantificación de estas toxinas de manera más rápida y sencilla que los métodos cromatográficos tradicionales con el fin de contar con evidencias objetivas que permitan establecer la importancia de la cuantificación de estas toxinas en la industria procesadora del cacahuate en nuestro país.

El diseño experimental consistió en un modelo factorial de 3x5x2 en donde los factores estudiados fueron el estilo de cacahuate, la marca y el lote (adquirido en diferente época del año).

El trabajo se encuentra dividido en tres capítulos. El primero corresponde a un marco teórico sobre diferentes aspectos tanto del cacahuate como de los hongos y sus toxinas, haciendo especial énfasis en las aflatoxinas, metabolitos secundarios alrededor de los cuales gira esta investigación; el segundo capítulo corresponde a la metodología experimental y en el tercer y último capítulo se presentan los resultados obtenidos durante la etapa experimental así como la discusión acerca de los mismos.

Finalmente se presentan las conclusiones y recomendaciones surgidas a partir de este trabajo de investigación, seguidas de un glosario en donde se incluyen todos aquellos conceptos (resaltados con negrillas cuando aparecen por primera vez en el texto), esenciales para la cabal comprensión de los temas.

JUSTIFICACIÓN

JUSTIFICACIÓN

La importancia que se ha dado a la presencia de aflatoxinas en alimentos en las cinco últimas décadas ha propiciado el desarrollo de diferentes métodos para la detección y cuantificación de estas toxinas. Los métodos tradicionales para llevar a cabo este tipo de análisis (cromatografía en capa fina y HPLC) son a menudo difíciles, tardados y costosos, por lo que existe la necesidad de una prueba rápida y sencilla que permita mantener un control adecuado en los alimentos susceptibles a la contaminación por aflatoxinas, como es el caso del cacahuete. Las columnas de inmunofinidad para aflatoxina Easi-Extract cumplen con estos requisitos, razón por la cual se utilizaron en esta investigación.

Por otro lado, en México, una de las principales causas de mortalidad en adultos está representada por afecciones hepáticas (ver Anexo I), generalmente atribuidas a problemas de alcoholismo (<http://www.ssa.gob.mx>) y virus de la hepatitis B (Miller, 1987); sin embargo, en muchos países se ha correlacionado la ingesta de aflatoxinas con enfermedades hepáticas (Miller, 1987), por lo que no debe descartarse esta posibilidad en nuestro país.

Se ha reportado que el cacahuete, junto con el maíz, semilla de algodón y copra son los productos de más alto riesgo para la salud humana y animal por contaminación con aflatoxinas (Moreno Martínez *et al.*, 1990).

Se decidió enfocar este estudio hacia el cacahuete botanero de los estilos enchilado, salado y japonés debido a la gran demanda y aceptación de este tipo de productos en México aunado a la enorme susceptibilidad de la semilla del cacahuete a la contaminación por aflatoxinas.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Estimar el contenido de aflatoxinas y los factores que lo afectan en cacahuete botanero expendido en el municipio de Atizapán de Zaragoza, Estado de México, utilizando la técnica de columnas de inmunoafinidad y un diseño multifactorial con el fin de establecer la importancia de la cuantificación de estas toxinas en botanas de cacahuete.

OBJETIVOS PARTICULARES

OBJETIVO PARTICULAR 1

Implementar la técnica de columnas de inmunoafinidad para aflatoxinas Easi-Extract en el Laboratorio de Tecnología de Calidad de Alimentos con el fin de contar con un método más viable para la cuantificación de estas toxinas en el laboratorio.

OBJETIVO PARTICULAR 2

Cuantificar las aflatoxinas presentes en cacahuete botanero expendido en el municipio de Atizapán de Zaragoza a través de la técnica de columnas de inmunoafinidad Easi-Extract con el fin de estimar el nivel de contaminación con aflatoxinas en estas botanas.

OBJETIVO PARTICULAR 3

Detectar la existencia de diferencias significativas entre los tratamientos utilizados y llevar a cabo un procedimiento de comparación múltiple utilizando un modelo de análisis factorial $3 \times 5 \times 2$ y el método de Tukey con el fin de identificar los factores determinantes en el contenido de aflatoxinas en cacahuete botanero.

CAPÍTULO I

MARCO REFERENCIAL

CAPÍTULO I. MARCO REFERENCIAL

1.1. El cacahuete (*Arachis hypogaea* L.)



Figura 1. Vainas que contienen las semillas de cacahuete (INEGI, 1997)

1.1.1. Generalidades

El cacahuete es una semilla oleaginosa originaria de América del Sur (Manuales para educación agropecuaria, 1983). Se cree que las especies silvestres tienen su origen en Brasil, aunque datos arqueológicos sugieren que el cacahuete se domesticó por primera vez en los valles fluviales del litoral peruano hace 4000 años. Después, en el siglo XVI, los comerciantes portugueses lo llevaron a África, y el cultivo regresó al Nuevo Mundo como consecuencia del comercio de esclavos del África occidental (FAO, 1991).

La mayor producción mundial se encuentra en el Lejano Oriente, especialmente en China e India (Manuales para educación agropecuaria, 1983).

La planta del cacahuete se aprovecha para el consumo en forma integral. Las semillas se consumen tanto crudas como procesadas así como en una gran variedad de confituras y otros productos elaborados. El aceite, que constituye aproximadamente el 45% de la semilla, se aprovecha industrialmente para la

elaboración de mayonesas, mantequilla e inclusive en jabonería fina, cosméticos, productos farmacéuticos, adhesivos, pinturas y lubricantes especiales. La pasta que se obtiene como un subproducto de la extracción del aceite por medios físicos y que contiene 40% de proteínas y 22% de carbohidratos, se utiliza principalmente en raciones alimenticias para el ganado. De la pasta residual se obtienen también productos industriales como materiales plásticos, pinturas, adhesivos, emulsificantes, etcétera. Las cáscaras son utilizadas como combustible para calderas o para hacer furfural, el cual a su vez se convierte en nylon, o bien, pueden utilizarse como materia inerte en fertilizantes químicos y en alimentos o complemento de raciones para el ganado. Su follaje se proporciona al ganado, en forma de heno, como forraje verde o ensilado (INEGI, 1997).

1.1.2. Clasificación taxonómica

- a) **Reino:** Vegetal
- b) **División:** Traqueofita
- c) **Clase:** Angiospermas
- d) **Subclase:** Dicotiledóneas
- e) **Familia:** Leguminosas
- f) **Subfamilia:** Papilionoideas
- g) **Género:** *Arachis*
- h) **Especie:** *hypogaea* L.

El nombre científico del cacahuete es: *Arachis hypogaea* L. (INEGI, 1997)

Los nombres comunes o regionalismos con que se conoce al cacahuete o maní en algunas entidades son:

Cahuete (Chiapas)

Manía (Chiapas)

Mazapán (Oaxaca)

La especie se ha dividido a su vez en grupos de variedades, utilizando diferentes características para esta clasificación, aunque principalmente se toma

en cuenta el porte de la planta; estos grupos son: Español, Virginia y Valencia (Robles Sánchez, 1991).

1.1.3. Descripción botánica



Figura 2. Planta del cacahuete (INEGI, 1997)

Planta herbácea de 15 a 70 cm de altura, de tallo erecto, o rastrero, ramificado o semirrastrero, dependiendo de la variedad, más o menos cilíndrico, **pubescente**, con las ramificaciones de color verde claro u oscuro o incluso púrpura. Las hojas son compuestas y tienen de uno a cinco folíolos; estos pueden alcanzar un tamaño de 4 a 8 cm, son de forma ovalada, obovada, obtusos o ligeramente puntiagudos, con márgenes lisos pero algo aserrados en el **ápice**, se encuentran insertos en un **pecíolo** de 10 cm de largo aproximadamente, canaliculado, pubescente y con dos **estípulas** lateralmente agudas, en la base. Las **inflorescencias**, en pequeños racimos de tres a cinco flores, de las cuales sólo una o dos alcanzan la madurez, están insertas en las **axilas** de las hojas inferiores, superiores o intermedias, pero nunca en la porción terminal. Las flores son típicamente papilionadas, amarillas, pueden presentar manchas moradas, son **hermafroditas** y **autógamas**; las superiores son estériles y las de la parte inferior son fértiles, al inicio de la floración estas últimas son **sésiles**, después de la fecundación el **pedúnculo floral** (ginóforo) se

alarga respondiendo a estímulos hormonales (auxinas) y de geotropismo positivo, convirtiéndose en un tallo o estaquilla, de 3 a 20 cm de longitud, que gradualmente empuja al fruto joven dentro del suelo, en donde éste completa su desarrollo. El fruto es una vaina indehisciente abultada, de forma cilíndrica irregular, con estrangulaciones dependiendo del número de semillas que contenga. Generalmente tiene de dos a tres semillas, irregularmente cilíndricas u ovoides, pueden llegar a medir 2 cm de largo por 1 cm de ancho, están cubiertas, cada una, por un tegumento o testa cuyo color puede ser blanco, rosado, rojo, violáceo, negro o incluso rojo y blanco o variegado (INEGI, 1997).

1.1.4. Composición química

El cacahuete es una semilla auténticamente oleaginosa que contiene entre el 45 y el 50% de aceite, entre el 27 y el 33% de proteína, de 12 a 18% de carbohidratos junto con minerales y vitaminas del grupo B, especialmente riboflavina (B₂), tiamina (B₁) y niacina. En la tabla I se presenta la composición química promedio del cacahuete pelado.

El aceite del cacahuete es excelente para cocinar, ya que tiene un bajo contenido de ácidos grasos saturados y no contiene ácido linolénico, principal causa de los problemas de rancidez por oxidación en el aceite de soya, debido a su alto grado de insaturación (tres enlaces dobles); en cambio, es rico en ácido oleico, el cual posee un solo enlace doble (Primo Yúfera, 1987).

Los aminoácidos limitantes en la proteína de cacahuete son aquellos que contienen azufre (metionina y cistina). El contenido de lisina es también bastante bajo, aunque no limitante; sin embargo, esto es un inconveniente cuando se combina el cacahuete con cereales deficientes en lisina para equilibrar la ingesta alimentaria.

En comparación con otras leguminosas, el cacahuete tiene un contenido muy bajo de los oligosacáridos generadores de gas, i.e., rafinosa, estaquiosa y verbascosa. La mayor parte del azúcar libre en la harina de cacahuete es sacarosa (FAO, 1991).

Tabla I. Composición química promedio del cacahuate pelado

Componente	%
Humedad	12
Proteínas	27
Grasas	42
Fibra	2
Cenizas	2
ELN	19

ELN= extracto libre de nitrógeno

Fuente: Primo Yúfera, E. 1987. *Química Agrícola III. Alimentos*. Ed. Alambra. España. P. 181.

1.1.5. Condiciones ecológicas y edáficas

El cacahuate prospera en climas cálidos. Es altamente susceptible a las heladas, bastando sólo poco tiempo para destruir la planta temperaturas inferiores a los 0°C. Su intervalo de temperatura es de 20 a 40°C, siendo las temperaturas óptimas de 25 a 30°C.

Se desarrolla mejor en regiones desde el nivel del mar hasta 1000 m de altura y, en general, se cultiva en la franja comprendida entre los 40° de latitud norte y 30° sur (Robles Sánchez, 1991).

La siembra debe realizarse al inicio de la época de lluvias de tal manera que la cosecha coincida con la época de sequía.

Durante el desarrollo de los frutos y de las semillas, varios hongos pueden ocasionar su deterioro. Los factores que favorecen la infección son exceso de humedad y temperaturas altas del suelo.

Debe procurarse que el suelo sea suelto, preferentemente franco-arenoso, sin cascajo o piedras, y sin residuos vegetales en la superficie; un pH entre 5.8 y 6.2 es el más favorable (Manuales para educación agropecuaria, 1983).

1.1.6. Cosecha y rendimiento

La cosecha puede realizarse en forma manual, semimecanizada o mecanizada, dependiendo de la superficie de cultivo. En la cosecha manual se arrancan las plantas y agrupan en montones pequeños, alineados, para que el

sol las termine de secar. Luego, se separan los frutos y se someten a otro periodo de secado al sol (Manuales para educación agropecuaria, 1983). El secado tiene como objetivo bajar el contenido de humedad de la semilla de 25-30% (al momento de la cosecha) en forma paulatina hasta contener de 8 a 10% (Robles Sánchez, 1991).

El arranque a mano sólo se justifica en cultivos pequeños de tipo familiar. Es laborioso y debe realizarse con cuidado, a fin de aprovechar todos los frutos formados.

Para el desgrane y almacenamiento, la semilla debe tener un porcentaje de humedad de 8 a 10%. El desgrane consiste en la rotura de las cápsulas para separar las semillas. Esta labor se realiza mecánicamente.

El rendimiento promedio del cacahuete es de 25 a 30% de cáscara y de 70 a 75% de semilla, pudiendo haber diferencias de acuerdo con las variedades (Manuales para educación agropecuaria, 1983; Robles Sánchez, 1991).

1.1.7. Producción nacional

Según datos de INEGI (1997), en el año agrícola 1990-1991, la superficie nacional sembrada con cacahuete fue de 75 153 Ha. Fueron treinta y una las entidades que registraron este cultivo, destacando por su participación: Sinaloa con 15 128 Ha (20.12%), Oaxaca con 11 300 Ha (15.03%), Puebla con 10 883 Ha (14.48%), Chihuahua con 8 980 Ha (11.94%), Chiapas con 4 965 Ha (6.6%), Guerrero con 4 266 Ha (5.67%) y Nayarit con 4 100 Ha (5.45%). Las superficies anteriores representan en su conjunto 79.29% de la superficie sembrada con esta leguminosa en el país. Las veinticuatro entidades restantes aportaron una superficie de 15 531 Ha sembradas con cacahuete, la cual representa el 20.7% de la superficie nacional sembrada con cacahuete (ver figura 3).

La producción nacional de cacahuete en el año agrícola señalado fue de 76 199 Ton. A nivel nacional treinta y una entidades produjeron cacahuete, de éstas destacaron siete como las principales productoras con una participación conjunta equivalente al 80% de la producción nacional de esta leguminosa:

Chihuahua con 20%, Sinaloa y Oaxaca cada una con 16%, Nayarit con 9%, Puebla con 8%, Guerrero con 6% y por último Chiapas con 5%. En contraparte, diecinueve entidades sólo participaron con 5% de la producción total del país (INEGI, 1997).

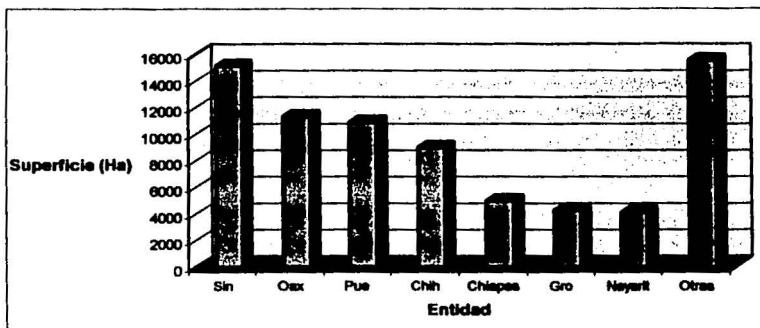


Figura 3. Superficie nacional sembrada con cacahuete, 1990-1991 (INEGI, 1997)

1.1.8. *Procesamiento*

La industria del cacahuete es muy amplia, pues abarca a los cultivadores, descascaradores, quebradores, mayoristas, salteadores, molineros de aceite y fabricantes de mantequilla de cacahuete, dulces, productos horneados, botanas, aislados proteínicos y otros productos alimenticios (Desrosier, 1996).

El tostado de los cacahuates dentro de la vaina, fue el primer tratamiento al que se sometió a estas semillas introduciéndose en Nueva York en 1870 por el circo Barnum. Posteriormente, alrededor de 1906, surgió la idea de vender cacahuates dentro de su vaina, tostados y salados en pequeñas bolsas (Matz, 1976).

Los cacahuates desecados en su vaina retienen buenas características organolépticas por un periodo de seis meses o más si se conservan libres de

infestaciones y protegidos de olores extraños que pudieran absorber; a una temperatura de 8°C su vida útil puede prolongarse hasta nueve meses. Cuando se elimina la vaina, la vida de almacenamiento se ve reducida en 1/3; si se elimina también la cutícula y se parten en mitades, se pierden 2/3 de la estabilidad potencial de la semilla.

Las principales causas de deterioro del cacahuete son: desarrollo de rancidez oxidativa, absorción de olores extraños y cambios en el color. Estos cambios se presentan más rápido en cacahuates desprovistos de la cáscara o vaina, por lo que es recomendable almacenar el cacahuete dentro de su vaina, en un ambiente seco y a bajas temperaturas para alargar lo más posible su vida útil y evitar los problemas de deterioro antes mencionados.

El cacahuete para botana goza de una gran aceptación y demanda a nivel mundial, en este sentido, algunos autores lo han llegado a comparar con las palomitas de maíz (Matz 1976). En el municipio de Atizapán de Zaragoza, Estado de México, se comercializan por lo menos ocho marcas distintas que manejan las tres presentaciones de cacahuete más comunes (salado, enchilado y japonés), estas marcas se enlistan en la **Tabla II**. Por otro lado, el cacahuete a granel que se expende en Atizapán, y en el cual también se manejan los tres estilos antes mencionados, es adquirido casi sin excepción en la central de abastos de Iztapalapa una vez por semana siendo el principal abastecedor para todo el municipio, la UNPRODIPB (Unión de Productores y Distribuidores de Perecederos Básicos en el Estado de México), mejor conocida como las "Bodegas de Atizapán".

Barcel	Nipon
Great Value	Nishikawa
Ika Ika	Sabritas
Mafer	
Marca propia Gigante	

En la **figura 4** se presenta el diagrama de bloques para el proceso de elaboración de cacahuete botanero enchilado y salado:

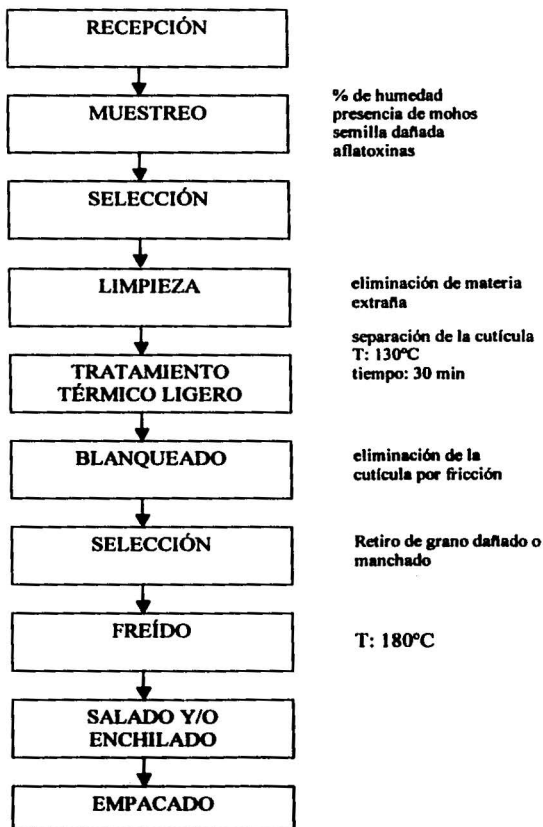


Figura 4. Elaboración de cacahuete botanero enchilado y salado

Fuente: Matz, S. A. 1978. "Snack Food Technology". Ed. AVI. USA.Pp. 171-174

RECEPCIÓN. En esta etapa se recibe el grano crudo dentro de su cáscara, generalmente en costales para poder ser almacenado y posteriormente utilizado.

MUESTREO. Se debe llevar a cabo un muestreo para determinar el contenido de humedad e identificar presencia de mohos, semillas dañadas y aflatoxinas.

SELECCIÓN. Debido a que son productos agrícolas, los cacahuates suelen llegar a la planta contaminados con una gran variedad de sustancias extrañas; además también puede haber cacahuete enmohecido, descolorido o encogido, el cual debe eliminarse si se quiere tener un producto final de calidad. La separación de las impurezas se puede realizar automáticamente con base en el tamaño, peso o apariencia del cacahuete.

Un separador de aire típico clasifica productos en dos o tres grupos y trabaja bajo el principio de que las semillas sanas son, ya sea más ligeras, o bien, más pesadas que el resto de las partículas (Matz, 1976).

LIMPIEZA. Los cacahuates descascarados son limpiados alimentándolos sobre una malla vibratoria a través de la cual pasa un flujo de aire. La amplitud de las vibraciones y el ángulo de la malla se controlan de tal manera que los objetos extraños pesados se muevan y sean descartados por la parte de atrás. Las impurezas ligeras como cutículas sueltas y polvo son succionadas a través de un sistema diseñado para estos fines (Matz, 1976).

TRATAMIENTO TÉRMICO Y BLANQUEADO. El término "blanqueado" se refiere al proceso de remoción de la testa generalmente por fricción. Las condiciones del tratamiento térmico, que es parte del proceso de blanqueado, tienen un efecto determinante en el perfil de sabor del cacahuete. El almacenamiento del cacahuete blanqueado da como resultado cambios pronunciados, generalmente indeseables, en el sabor a causa del desarrollo de rancidez oxidativa y absorción de olores (Matz, 1976), por lo que es preferible llevar a cabo esta operación justo antes del procesamiento del cacahuete.

FREIDO. Se utiliza aceite vegetal parcialmente hidrogenado (freído), con lo que se desarrolla el sabor y textura crujiente del cacahuete. Por otro lado, la semilla se oscurece debido a reacciones de Maillard y su contenido de humedad se reduce desde 5-8% hasta 0.5-1.5%. La piel o testa se vuelve más frágil y se desprende más fácilmente de la semilla. Se han sugerido varios métodos para incrementar la estabilidad del cacahuete frito, entre ellos está la adición de antioxidantes o recubrimientos con una mezcla de zeína y monoglicéridos acetilados. Estos métodos pueden ser útiles para extender la vida de las semillas frescas unas cuantas semanas o quizás meses pero de ninguna manera revertirán el deterioro que ya haya ocurrido (Matz, 1976).

SALADO. La adherencia adecuada de la sal al cacahuete es a menudo difícil de conseguir. El problema es más grave cuando el punto de fusión del aceite es bajo. Cuando se utiliza aceite de coco durante el freído, la sal se aplica antes de que la temperatura descienda, mientras el aceite aún se encuentra completamente en estado líquido. A medida que la grasa se enfría y se espesa, los gránulos de sal se adhieren firmemente a las semillas.

El tipo de sal utilizada es de gran influencia para la adherencia resultante, que puede ser de 2 a 3% dependiendo también del tipo de cacahuete utilizado así como del método de salado empleado. Se prefiere utilizar pequeñas partículas de sal de configuración irregular (Matz, 1976).

El cacahuete estilo japonés es el más popular de todos; en el municipio de Atizapán se encontraron 19 marcas distintas, 11 de las cuales únicamente manejan este estilo de cacahuete.

El diagrama de bloques para la elaboración de cacahuate estilo japonés se muestra en la siguiente figura:



Figura 5. Elaboración de cacahuate estilo japonés

Fuente: Comunicación personal, Industrias Mafer, 2001 ; Matz, S. A. 1978. "Snack Food Technology". Ed. AVI. USA. Pp. 171-174.

Cabe señalar que el riesgo de ingesta de aflatoxinas a través de cacahuate botanero es mayor con el consumo de cacahuate estilo japonés que con los otros dos estilos de cacahuate (salado y enchilado) debido a que tanto el cacahuate, como el trigo a partir del cual se obtiene el harina utilizada para el empanizado, son alimentos susceptibles a la contaminación por hongos productores de aflatoxinas.

1.2. Hongos en granos y semillas

Dentro de los factores bióticos que ocasionan deterioro en granos y semillas, los hongos juegan un papel importante ya que afectan su poder germinativo como simientes, y su calidad nutricional y sanitaria como granos alimenticios (Moreno Martínez, 1988).

Se han reportado más de 150 especies de mohos y levaduras en granos y semillas; la mayoría de estas especies se encuentran como contaminantes superficiales debido a que la principal forma de propagación de las esporas es por medio del aire (Sauer, 1992).

Los hongos que atacan a los granos y semillas se han dividido convenientemente en tres grupos: hongos de campo, hongos de almacén y hongos de deterioro avanzado (Moreno Martínez, 1988), los cuales se abordarán brevemente a continuación.

1.2.1. Hongos de campo

Se ha denominado así a este grupo de hongos debido a que invaden a las semillas cuando las plantas aún están creciendo en el campo o cuando se han cortado y separado pero antes de la trilla. La invasión es más común en climas húmedos o donde las lluvias son frecuentes que en climas secos, aunque el microclima alrededor de la semilla es a menudo lo suficientemente húmedo como para permitir cierta invasión de los hongos a los tejidos de la semilla (Sauer, 1992).

Para su crecimiento, estos hongos requieren de humididades relativas del 90 al 100%, lo que en semillas de cereales equivale a un contenido de humedad del 20% o superior, en base húmeda (Sauer, 1992). Son agentes causales de enfermedades de los cultivos además de que pueden ser transmitidos de un ciclo a otro a través de las semillas.

Los hongos de campo predominantes dependerán del tipo de cultivo, localización geográfica y clima; sin embargo, en trigo, arroz, cebada y avena,

que se cultivan en prácticamente todo el mundo, los principales hongos que invaden las semillas son especies de *Fusarium*, *Alternaria*, *Cladosporium* y *Helminthosporium* (Christensen *et al.*, 1969).

Alternaria es común en muchos granos y semillas, especialmente de cereales, aunque también es predominante en cacahuate; su recuperación de semillas desinfectadas superficialmente y la ausencia de hongos de almacén son evidencia de un buen almacenamiento, pues esto pone de manifiesto que las semillas se encuentran en aproximadamente las mismas condiciones en que fueron cosechadas (Christensen *et al.*, 1969; Sauer, 1992).

Los hongos de campo pueden afectar la apariencia y calidad de granos y semillas para casi cualquier propósito con el que vayan a ser utilizadas. Generalmente el daño ocasionado por estos hongos se presenta antes de la cosecha, puede ser detectado por inspección rutinaria y no continúa incrementándose durante el almacenamiento. Los hongos de campo tienden a desaparecer gradualmente con el almacenamiento, dependiendo del contenido de humedad y temperatura de las semillas almacenadas; sin embargo, las micotoxinas no desaparecerán, por lo que no es difícil tener lotes de granos contaminados por una determinada micotoxina y ya no estar presente el hongo productor (Christensen *et al.*, 1969; Moreno Martínez, 1988).

1.2.2. Hongos de almacén

Los hongos de almacén comprenden cerca de una docena de especies de *Aspergillus* (de los cuales únicamente alrededor de cinco son realmente comunes), varias especies de *Penicillium*, una sola especie de *Sporendonema* y posiblemente algunas especies de levaduras (Christensen, 1969).

Salvo algunas excepciones, estos hongos no infectan a las semillas significativamente antes de la cosecha; su hábitat natural no es el campo, sino el almacén, la bodega, el silo y las trojes; se desarrollan principalmente bajo condiciones de baja humedad relativa (85 a 90%), después de la cosecha, durante el transporte, el secado lento, el almacenamiento y procesamiento de

los granos. Los principales daños que ocasionan estos hongos a los granos y semillas almacenadas son la reducción del poder germinativo de las semillas, el ennegrecimiento de los granos y la producción de micotoxinas (Moreno Martínez, 1988).

Existe una gran cantidad de factores que determinan el grado de invasión en el grano almacenado: el contenido de humedad del grano, su temperatura, la cantidad de grano quebrado y materia extraña presente, el grado de invasión por hongos de almacén que ha sufrido el grano antes de llegar a un lugar determinado, la presencia de insectos y el tiempo de almacenamiento. Aunque todos estos factores interactúan entre sí en algún grado, los principales factores de riesgo son el contenido de humedad, la temperatura y el tiempo.

En la **tabla III** se presentan los contenidos de humedad de diferentes granos y semillas en equilibrio con distintas humedades relativas y los hongos que pueden invadirlos a los contenidos de humedad señalados.

Tabla III. Contenidos de humedad en equilibrio (T=25°C) a humedades relativas de 65-90% y hongos encontrados

% HR	Semillas de cereales, alimentos de oleaginosas desgrasados, bolitas de alfalfa	Soya	Cacahuete, girasol	Hongos
65-70	12-14	11-12	6-8	<i>A. halophilicus</i>
70-75	13-15	12-14	7-10	<i>A. restrictus</i> , <i>A. glaucus</i> , <i>Wallemia sebi</i>
75-80	14-16	14-16	8-11	<i>A. candidus</i> , <i>A. ochraceus</i> , cualquiera de los anteriores
80-85	15-18	16-19	9-13	<i>A. flavus</i> , <i>Penicillium</i> spp., cualquiera de los anteriores
85-90	17-20	19-23	10-16	Cualquiera de los anteriores

Fuente: Sauer, D. B. 1992. *Storage of Cereal Grains and their Products*. 4th edition. American Association of Cereal Chemists. USA. P. 325

A continuación se analizarán los grupos y especies que conforman el género *Aspergillus* haciendo especial énfasis en el grupo *Aspergillus flavus*.

1.2.2.1. *Aspergillus flavus*

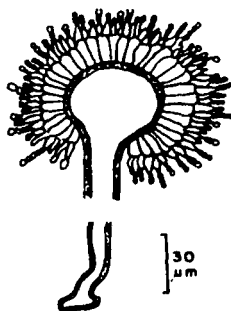


Figura 6. *Aspergillus flavus*

Fuente: Moreno Martínez, E. 1988. *Manual para la identificación de hongos en granos y sus derivados*. UNAM. México. P. 54

A los miembros del grupo *Aspergillus flavus* se les considera principalmente como hongos de almacén, sin embargo, en Estados Unidos se les ha encontrado invadiendo al maíz en el campo en periodos de sequía con la consiguiente producción de aflatoxinas.

La clasificación de las especies del género *Aspergillus* se sale de los cánones ortodoxos de la taxonomía de hongos, ya que este género ha sido dividido en 18 grupos, con 132 especies. Entre los hongos que invaden granos almacenados se tiene a los grupos: *Aspergillus restrictus*, *A. glaucus*, *A. flavus*, *A. candidus*, *A. versicolor* y *A. ochraceus*. Cada uno de estos grupos, a excepción de *A. candidus*, que solo presenta una especie, está integrado por especies con características morfológicas generales muy similares entre las especies del grupo y su clasificación en especies individuales se basa principalmente en características morfológicas específicas (forma, estructura, tamaño y color). Por

lo tanto, cuando se dice que se aisló un miembro del grupo *A. flavus*, no se está hablando específicamente de una determinada especie, sino de una de las 11 especies reconocidas para este género, la cual seguramente fue identificada con base en las características generales del grupo como son color, apariencia de la colonia, ausencia del estado perfecto (cleistotecios) y otras características que le permiten fácilmente al micólogo identificarlos como un miembro de dicho grupo (Moreno Martínez, 1988).

Las especies de este grupo requieren para crecer humidades relativas en equilibrio de 80-85% (actividad de agua de 0.80 a 0.85), en cereales con contenidos de humedad de 16.5 a 18%, y en cacahuete de 8.0-10.5%. Su desarrollo contribuye al calentamiento de los granos. Algunas especies producen las aflatoxinas, metabolitos altamente tóxicos, cancerígenos y teratógenos, siendo la aflatoxina B₁ la más activa. Sin duda la presencia de hongos de este grupo es indicativa de una mala conservación de los granos, pero no es determinante para concluir que las aflatoxinas están presentes en el producto del cual fue aislado. Para poder asegurar que las aflatoxinas están presentes en una determinada muestra es necesario confirmar la presencia a través del análisis químico y de ser posible confirmarla con un bioensayo, por ejemplo, alimentando patos de un día de edad con una dieta que supuestamente contiene aflatoxinas y observando las alteraciones que ocurren en las células epiteliales del conducto biliar.

Dos especies importantes de este grupo son *A. flavus* Link y *A. parasiticus* Speare, en las que algunas de sus cepas son productoras de aflatoxinas. Estos hongos son comunes en climas cálido-húmedos, colonizando diversos productos, entre ellos el cacahuete, el maíz, el arroz, la copra y la semilla de algodón (Moreno Martínez, 1988).

1.2.3. Hongos de deterioro avanzado

Estos requieren altos contenidos de humedad para su desarrollo (HR > 90%) y en la naturaleza se les encuentra colonizando materia orgánica en proceso de

descomposición, como es el caso de *Chaetomium*, que es un excelente degradador de celulosa.

Si los hongos aislados de granos u otros productos, pertenecen a este grupo, es un signo de mala calidad de esas materias primas, las que deberán ser consideradas con las máximas precauciones para su posible utilización en la alimentación animal. A los hongos de este grupo difícilmente se les aísla de granos destinados al consumo humano, ya que a esos granos, que prácticamente están en estado avanzado de pudrición, normalmente se les destina al consumo animal, con los consiguientes riesgos sanitarios; cabe mencionar que algunos de estos hongos tienen la capacidad de producir micotoxinas (Moreno Martínez, 1988).

La humedad del grano, su temperatura y el grado de aereación son tres de los factores más importantes que determinan el tiempo de almacenamiento y deterioro del grano (Sauer, 1992). Actualmente el combate de los hongos solo se logra secando los granos a niveles de humedad desfavorables para su desarrollo; a contenidos de humedad de los granos en equilibrio con humedades relativas menores del 75%. Otra manera de retardar el crecimiento de los hongos es almacenando los granos a bajas temperaturas como se hace en los bancos de germoplasma; sin embargo, el factor más importante es el contenido de humedad de los granos y de los productos almacenados, el que está en función directa de la humedad relativa del medio ambiente que los rodea, tendiendo ambos, la humedad del grano y del ambiente, a equilibrarse. El contenido de agua de los productos se expresa en porcentaje con base en el peso húmedo o seco del producto. En el comercio de los granos se usa el porcentaje de humedad calculado en relación al peso húmedo de la muestra (Moreno Martínez, 1988).

Debido a que la expresión del contenido de humedad de los productos en equilibrio con una determinada humedad relativa varía de acuerdo a su contenido de materia hidrofílica, se recomienda que en lugar de indicar los contenidos de humedad que requieren los hongos para su desarrollo, se haga

referencia a la actividad de agua (a_w), la cual puede tomar valores ente 0 y 1 y es igual a la humedad relativa en equilibrio dividida entre 100 (Sauer, 1992). La actividad de agua es la relación de la presión parcial del vapor de agua en equilibrio con el sustrato y la presión parcial del vapor de agua en equilibrio con el agua pura a la misma temperatura; es una medida de la cantidad de agua disponible en un producto o sustrato, capaz de permitir el crecimiento de los microorganismos, y corresponde en cifras decimales al valor de la humedad relativa en equilibrio que permite el desarrollo de un determinado microorganismo en un alimento (Moreno Martínez, 1988). En la **tabla IV** se muestra la actividad de agua mínima requerida para el desarrollo de diversos mohos.

Tabla IV. Mínima a_w requerida para el desarrollo de diversos mohos

Especie	a_w mínima requerida
<i>Monascus bisporus</i>	0.61
<i>Aspergillus chevalieri</i>	0.65
<i>A. halophilicus</i>	0.65-0.70
<i>A. restrictus</i>	0.70-0.75
<i>A. candidus</i>	0.72
<i>A. versicolor</i>	0.75
<i>A. flavus</i>	0.80
<i>A. fumigatus</i>	0.82
<i>A. niger</i>	0.85
<i>Penicillium chrysogenum</i>	0.78
<i>P. citrinum</i>	0.80
<i>P. islandicum</i>	0.83
<i>P. purpurogenum</i>	0.84
<i>Paecilomyces variotii</i>	0.84
<i>Fusarium</i> spp.	0.88-0.91
<i>Trichothecium roseum</i>	0.90
<i>Rhizopus</i> y <i>Mucor</i> spp.	0.92-0.94

Fuente: Sauer, D. B. 1992. Storage of Cereal Grains and their Products. 4th edition. American Association of Cereal Chemists. USA. P. 347

1.2.4. Contaminación fúngica en el cacahuete

El cacahuete puede ser contaminado por mohos cuando aún está en la tierra. La infección es claramente visible cuando la semilla es atacada por insectos, antes o después de la cosecha, o es dañada por condiciones climatológicas adversas, como la sequía durante la fase de crecimiento, especialmente cuando se quiebran en la madurez o cuando sufren daños mecánicos durante la cosecha (FAO, 1991).

El hongo *Aspergillus flavus* puede conseguir entrar en las vainas, crecer en su interior e infectar gravemente las semillas con sus toxinas; de hecho, el cacahuete, maíz, semilla de algodón y la copra, son los productos de más alto riesgo para la salud humana y animal por contaminación con aflatoxinas. Los niveles de contaminación que ocurren en cacahuete frecuentemente sobrepasan en cientos de veces el límite máximo de aflatoxinas permitido para el consumo humano que es, para algunos países, entre ellos, México, de 20 microgramos por kilogramo (Moreno Martínez *et al.*, 1990). Los daños en las vainas y las semillas, ocasionados por insectos, facilitan la entrada del moho (FAO, 1991), aunque esto no es absolutamente necesario para que el hongo pueda entrar y producir aflatoxinas.

En cacahuete, al igual que en maíz, también se ha asociado la producción de aflatoxinas en plantas sometidas a condiciones de sequía. Se han realizado estudios para definir la temperatura del suelo que favorece la producción de aflatoxinas, encontrándose que fluctúa entre 26.3 y 29.6°C. Igualmente se han realizado estudios que señalan claramente que la falta de humedad en el suelo y esas altas temperaturas favorecen la contaminación de las vainas y granos con aflatoxinas (Moreno Martínez *et al.*, 1990).

1.3. Micotoxinas

1.3.1. Generalidades

Se ha demostrado que un elevado número de mohos producen sustancias tóxicas denominadas micotoxinas. Algunas son mutágenas y cancerígenas, otras son tóxicas para determinados órganos, y otras se comportan como tóxicas por medio de otros mecanismos (Jay, 1994). Al menos 14 micotoxinas son cancerígenas, siendo entre éstas las aflatoxinas los agentes cancerígenos más potentes.

Las micotoxinas son producidas como metabolitos secundarios. Los metabolitos primarios de los hongos, así como de otros microorganismos, son aquellos compuestos indispensables para su crecimiento. Los metabolitos secundarios son producidos al final de la fase de crecimiento exponencial y carecen de importancia aparente para el microorganismo que los produce con respecto a su crecimiento o a su metabolismo. En general, parece ser que el microorganismo los produce cuando se acumulan grandes reservas de precursores de metabolitos primarios tales como aminoácidos, acetato, piruvato, etcétera, y la síntesis de micotoxinas representa un mecanismo que posee el hongo para reducir la reserva de precursores metabólicos que sus necesidades ya no demandan (Jay, 1994).

Se denomina micotoxicosis a las enfermedades resultantes de la ingestión de micotoxinas presentes en los alimentos (Sauer, 1992). Los tres principales géneros productores de micotoxinas son: *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*. En la **tabla V** se muestran las principales especies productoras de micotoxinas así como los compuestos que producen.

Tabla V. Principales especies productoras de micotoxinas y efectos adversos

TOXINA	PROCEDECENCIA FÚNGICA	PRINCIPALES ALIMENTOS AFECTADOS	PRINCIPALES EFECTOS FARMACOLÓGICOS DE SU INGESTIÓN
Toxinas de <i>Aspergillus</i> Aflatoxinas	<i>A. flavus</i> , <i>A. parasiticus</i>	Cacahuates, semillas oleaginosas, cereales, legumbres y otros; residuos de alimentos de origen animal.	Patógenas para el hígado; hepatocancerígenas en varios animales y posiblemente en el hombre.
Esterigmatocistina	<i>A. nidulans</i> , <i>A. versicolor</i>	Granos de cereales.	Tóxicas y hepatocancerígenas para las ratas.
Ocratoxinas	<i>A. ochraceus</i> , <i>P. viridicatum</i>	Granos de cereales; granos de café; residuos en animales.	Tóxicos renales en la rata.
Toxinas de <i>Penicillium</i> Luteosquirina	<i>P. islandicum</i>	Arroz y otros cereales.	Tóxico, posiblemente hepatocancerígeno para la rata.
Patulina	<i>P. articae</i> ; <i>P. claviformi</i> ; otros	Productos de manzanas, cereales, trigo.	Edema, tóxico renal en la rata.
Toxinas de <i>Fusarium</i> Zearalenona	<i>Gibberellazæe</i>	Maíz, trigo, cebada, avena.	Hiperestrogenismo en cerdos y animales de experimentación.
Aleucia tóxica alimentaria (ATA)	<i>F. poae</i> , <i>F. sporotrichioides</i>	Mijo y otros cereales.	Panleucocitopenia por lesión de médula ósea; hasta 96% de mortandad en epidemias humanas.
12, 13-epoxi-tricotecenos	<i>Fusarium</i> sp., <i>Tirichoderma</i> sp., <i>Glicotricothecium</i> spp.	Maíz, otros cereales.	Colapso cardiovascular; tiempo de coagulación aumentado, leucopenia; en el hombre podría haber estado implicada la ATA.

Fuente: Fennema, O. 1993. Química de los alimentos. Ed. Acribia. España. P. 797.

Como se puede observar en la tabla anterior, se ha identificado una gran cantidad y variedad de micotoxinas que afectan a la salud del hombre, el cual se encuentra constantemente expuesto a estas sustancias como resultado del consumo de productos vegetales, carne, leche o huevos. Por otro lado, la contaminación de estos alimentos por mohos y sus toxinas representa graves pérdidas económicas, que en muchas ocasiones resultan inevitables.

1.3.2. Factores que afectan la producción de micotoxinas

La formación de micotoxinas se ve afectada por diversos factores, los cuales se pueden dividir en biológicos, físicos y químicos.

- a) **Factores biológicos.**- Muchas especies toxigénicas de hongos son también patógenos para las plantas. Se ha observado una relación entre el nivel de infección y la producción de micotoxinas. Por ejemplo, Brown *et al.* (1995) demostraron que había una correlación directa entre la colonización con *A. flavus* y la contaminación con aflatoxina B₁ en granos de maíz (D'Mello *et al.*, 1997). La producción de micotoxinas también se ve influenciada por interacciones fúngicas; se ha demostrado que el crecimiento de *A. parasiticus* en presencia de *Penicillium purpurogenum* trae como consecuencia una mayor producción de aflatoxina (Krogh, 1987). Tanto la rubratoxina, un metabolito del *P. purpurogenum* como la cerulenina, un metabolito de una cepa de *Cephalosporium*, favorecen la producción de aflatoxina por *A. parasiticus* (Krogh, 1987).

- b) **Factores físicos.**- La interacción de una gran cantidad de factores físicos puede afectar la producción de micotoxinas en el campo y durante el almacenamiento de los alimentos. Entre estos factores se incluyen el tiempo, la temperatura, la humedad relativa, contenido de humedad del alimento y el grado de infestación por insectos. Por ejemplo, estudios con *Fusarium moniliforme* sugieren que el tiempo como la actividad de agua pueden interactuar para favorecer la producción de fumonisina B₁ en el maíz. En las regiones tropicales es especialmente importante el efecto de la invasión de las semillas por insectos tanto en el campo como durante el almacenamiento ya que esta infestación predispone al grano a la infección fúngica y por lo tanto a la producción de micotoxinas (D'Mello *et al.*, 1987).

- c) **Factores químicos.**- Los principales factores químicos que se deben tomar en cuenta son los fungicidas debido a su uso para el control de las enfermedades producidas por hongos en los diferentes cultivos; cuando su uso con este fin es exitoso, el riesgo de contaminación con micotoxinas es bajo; sin embargo, se ha demostrado que a concentraciones sub-letales se puede favorecer la producción de micotoxinas (D'Mello *et al.*, 1997). Aunque la producción de aflatoxinas es inhibida por algunos compuestos como los ácidos cítrico y láctico, los constituyentes de algunas especies y algunos insecticidas, ésta se ve favorecida por algunos fungicidas como el ácido propiónico y la nisina (Krogh, 1987).

1.3.3. Historia de las micotoxinas en alimentos

En apartados anteriores se vió que la producción de micotoxinas se debe únicamente a ciertos grupos de hongos filamentosos o mohos. Su impacto en los animales en términos de detención del crecimiento, reproducción anormal, muerte prematura y otras enfermedades se conoce desde hace siglos, así como también su impacto en las enfermedades humanas, pero su papel como posibles cancerígenos humanos comenzó a estudiarse intensamente hasta comienzos de la década de los 60, cuando se dio el descubrimiento de las aflatoxinas (Goldblatt, 1969; Shibamoto, 1996,).

Ergotismo

La primera micotoxicosis de la que se tienen amplios registros desde la Edad Media, y posiblemente desde la Antigua Grecia, es el ergotismo, originado por la ingestión de centeno y otros cereales contaminados con el hongo *Claviceps purpurea* (cornezuelo de centeno).

La aparición de brotes importantes de ergotismo pudo haber iniciado desde que comenzó a cultivarse el centeno para consumo humano, a principios de la Edad Media, alrededor del siglo V, en la región de Europa oriental y el oeste de

Rusia. De esta época se tienen registros acerca de los síntomas ocasionados por el cornezuelo aunque la causa de los síntomas era en ese entonces desconocida.

Del siglo X al XIV se presentaron severas epidemias de ergotismo cada 5 a 10 años principalmente en Francia dadas las condiciones de baja temperatura y humedad, favorables para el desarrollo del cornezuelo. En el año 944 d. C. 40 000 personas murieron de ergotismo en el sur de Francia. Debido a que la causa era desconocida no había cura disponible ([http://www. Botany .hawaii. edu/faculty /wong / BOT135/Syllabus98. htm](http://www.Botany.hawaii.edu/faculty/wong/BOT135/Syllabus98.htm)).

No fue sino hasta 1670 cuando un médico francés, el Dr. Thuillier estableció una relación de causa-efecto entre el consumo de centeno infectado con cornezuelo y la enfermedad conocida como "Fuego de San Antonio". Sin embargo, nunca pudo convencer a los granjeros de la causa de aquella terrible enfermedad y tuvieron que pasar 200 años para que esto ocurriera.

Hacia mediados del siglo XIX, el micólogo René Tulasne estudió el ciclo de vida del cornezuelo de centeno, el cual, en condiciones de humedad y temperatura adecuadas invade los granos individuales y forma un esclerocio. El esclerocio es una formación ligeramente curvada, de color negro a púrpura y de unos 6 cm de longitud que constituye la fase de reposo del *Claviceps* y que permanece viable en condiciones de sequedad, para germinar cuando dispone de humedad (Shibamoto, 1996).

Actualmente se sabe que alrededor de 50 especies de *Claviceps* pueden contaminar alimentos y piensos produciendo la intoxicación debida al cornezuelo denominada "ergotismo".

Aún en el siglo XIX ha habido brotes de ergotismo ocasionados por el consumo de centeno contaminado; en Rusia ocurrió en 1926-27 con 10 000 casos reportados; en Inglaterra en 1927, con 200 casos y el último ocurrió en Francia en 1951. Esta intoxicación aguda o crónica, se caracteriza generalmente por diarrea, vómitos, cefalea, vértigo, convulsiones y gangrena seca de los dedos, orejas o nariz, debido al espasmo prolongado de las arteriolas.

Aleucia tóxica alimentaria

Otra micotoxicosis que ha afectado severamente a la humanidad es la aleucia tóxica alimentaria (ATA). Ha sido señalada principalmente en Rusia, desde el siglo XIX. Se produjeron brotes en 1913, 1932 y finales de la Segunda Guerra Mundial. Las descripciones rusas de los síntomas de esta enfermedad incluyen: fiebre, enrojecimiento hemorrágico, hemorragias de nariz, garganta y encías, angina necrótica, leucopenia grave, agranulocitosis, sepsis y modificaciones de la médula ósea. Los brotes de la enfermedad fueron bruscos y la mortalidad superó al 50% de los afectados (Shibamoto, 1996).

Hubo diversas teorías sobre la causa de la enfermedad, como deficiencias vitamínicas e infecciones hasta que finalmente logró determinarse que los brotes de ATA habían sido causados por mijo contaminado con hongos.

Hacia el final del invierno y principios de la primavera, el mijo se infestaba con una gran variedad de hongos, incluyendo *Fusarium sporotrichoides*, también llamado *Fusarium tricinctum*, y cuando la gente ingería estos hongos presentaba los síntomas de la enfermedad denominada ATA. Posteriormente se aisló e identificó la toxina involucrada a partir de *F. sporotrichoides* dándosele el nombre de T-2 y clasificándola como un tricoteceno.

Aunque los tricotecenos juegan un cierto papel en la etiología de la ATA, "la enfermedad no puede adjudicarse a una sola sustancia y la compleja interacción de los tricotecenos con las variables del hospedador deben ser desentrañadas antes de que pueda comprenderse la etiología de la ATA" (Shibamoto, 1996).

1.3.4. Aflatoxinas

1.3.4.1. Descubrimiento de las aflatoxinas

Aunque se tiene evidencia de diferentes micotoxicosis desde tiempos muy remotos, el verdadero interés en la investigación de micotoxinas no se presentó sino hasta 1960, año en que enfermaron y murieron alrededor de 100, 000 pavos en Inglaterra debido a una necrosis aguda del hígado e hiperplasia del

conducto biliar (D'Mello *et al.*, 1997), afección que se denominó "enfermedad X de los pavos" (Goldblatt, 1969). Al mismo tiempo, atrajo la atención la creciente incidencia de tumores hepáticos en las truchas criadas en granjas de acuicultura de los Estados Unidos. Más tarde se demostró que tanto la harina de cacahuate empleada como suplemento del pienso de los pavos, como la de algodón utilizada para suplementar el pienso de las truchas, estaba contaminada por una serie de compuestos producidos por un hongo, llamado *Aspergillus flavus*. Dichos compuestos, las aflatoxinas, no solo son potentes toxinas agudas para varias especies animales, sino también algunos de los más potentes hepato-cancerígenos que se conocen (Shibamoto *et al.*, 1996).

La propiedad física que tienen las aflatoxinas de fluorescer bajo luz ultravioleta (aprox. 365 nm) facilitó su aislamiento y caracterización, culminando en la determinación de las fórmulas moleculares de cuatro compuestos designados como: aflatoxina B₁ (AFB₁), aflatoxina B₂ (AFB₂), aflatoxina G₁ (AFG₁) y aflatoxina G₂ (AFG₂) (Miller, 1987). La AFB₁ y AFB₂ fluorescen azul mientras que la AFG₁ y AFG₂ producen una fluorescencia verde. Las estructuras químicas de estos compuestos se muestran en la figura 7.

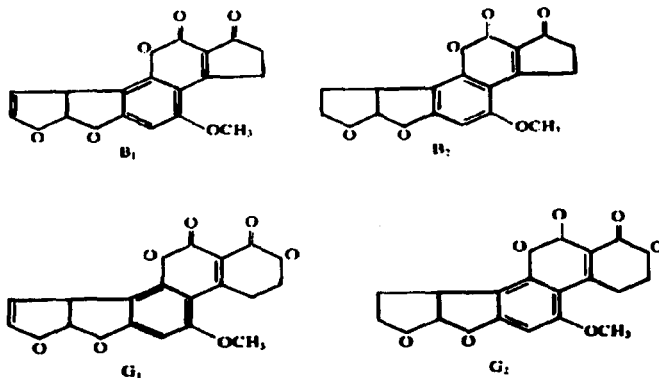


Figura 7. Estructuras de las aflatoxinas (Jay, 1994)

1.3.4.2. Presencia en alimentos

Entre los alimentos susceptibles a contaminación por aflatoxinas, el cacahuete y sus productos juegan un papel clave en la evaluación del riesgo por ingesta de aflatoxinas. La contaminación de cacahuete y sus productos con aflatoxinas se ha reportado en los Estados Unidos y países de África, Asia y otros (Miller, 1987). A este respecto se han hecho las siguientes observaciones:

- El crecimiento de los hongos y la producción de aflatoxina tienen lugar principalmente durante el secado de los cacahuates después de sacarlos de la tierra.
- En un lote de cacahuates tóxico, sólo contiene toxina un número de granos relativamente escaso, y el éxito en la detección de la toxina depende de la obtención de una muestra relativamente grande, por ejemplo de 1 kg, para investigarla.
- La cantidad de toxina variará mucho incluso dentro de un mismo grano (Jay, 1994).

Las aflatoxinas también se han encontrado en otras clases de nueces incluyendo almendras, avellanas y pistaches, aunque en niveles relativamente bajos.

La AFB₁ y micotoxinas relacionadas se detectan con frecuencia en cereales como maíz, trigo, sorgo, avena, cebada, mijo, arroz y otros granos comestibles y alimentos. Aunque los contenidos son bajos comparados con los niveles encontrados en cacahuete y maíz, estos alimentos son importantes componentes de la dieta en todo el mundo (Miller, 1987).

Los productos lácteos suelen estar contaminados con aflatoxina B₁ y M₁ (Miller, 1987). La aflatoxina M₁ se encuentra en la leche de vacas alimentadas con pienso que contiene AFB₁. La conversión total de la aflatoxina B₁ en M₁ en la leche de vaca se ha estimado en un 1% aproximadamente (Shibamoto, 1996).

La carne y productos cárnicos también pueden estar contaminados con aflatoxinas cuando el ganado es alimentado con raciones contaminadas con

afatoxinas. Por otro lado, muchos productos embutidos son madurados tradicionalmente utilizando mohos, aunque actualmente se tiende a controlar este proceso utilizando cepas seleccionadas no tóxicas.

También se ha detectado la presencia de afatoxinas en especias, incluyendo diferentes clases de pimientas y nuez moscada (Miller, 1987).

1.3.4.3. Características generales

La síntesis de afatoxinas se inicia al principio de la fase estacionaria de crecimiento del moho y tiene lugar junto con la síntesis de lípidos. De las tres principales vías del metabolismo secundario existentes en los hongos (vía de los policétidos, vía de los terpenoides, y la que utiliza aminoácidos indispensables), las afatoxinas son sintetizadas por la vía de los policétidos (Jay, 1994).

Las afatoxinas son una serie de compuestos policíclicos de constitución química parecida; hasta el momento se han identificado por lo menos 16 de estos compuestos (Jaimez, 2000). Estas toxinas contienen uno (B_1 , B_2 , B_{2a} , M_1 , M_2) o dos anillos lactónicos (ésteres cíclicos) (G_1 , G_2 , G_{2a}), siendo las afatoxinas B_{2a} y G_{2a} derivados hidroxilados de AFB_2 y AFG_2 respectivamente (Miller, 1987) (figura 8). Los metabolitos hidroxilados M_1 y M_2 (figura 9) se encuentran en leche, productos lácteos, queso y huevo (Casanova, 1995; Jaimez, 2000), mientras que Q_1 y P_1 , metabolitos de AFB_1 (Shibamoto, 1996), pueden estar presentes en el hígado u orina de muchos mamíferos, incluyendo el hombre (Jaimez, 2000).

Otra toxina es la conocida como GM_1 , que en realidad no es más que un derivado hidroxilado de G_1 . Posiblemente las M_1 , M_2 y GM_1 son productos intermedios de la degradación de las afatoxinas B_1 , B_2 y G_1 en el hígado (Lindner, 1995).

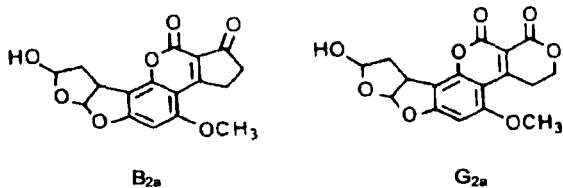


Figura 8. Derivados hidroxilados de AFB₂ y AFG₂ (Lindner, 1995)

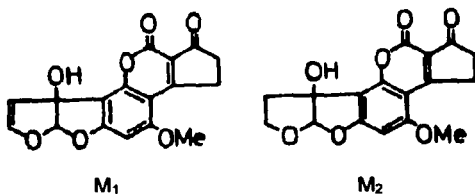


Figura 9. Metabolitos hidroxilados de AFB₁ y AFB₂ (Miller, 1987)

Sólo algunas variedades de *Aspergillus flavus* producen aflatoxinas: *A. flavus* Link, *A. parasiticus* y *A. nomius* (Jaimez et al., 2000). También el *Penicillium puberulum* produce aflatoxinas; en los extractos de cultivos de este moho se ha encontrado aflatoxina B₁, B₂ y G₁ (Lindner, 1995).

En la **tabla VI** se resumen las principales propiedades fisicoquímicas de las aflatoxinas.

Tabla VI. Principales propiedades fisicoquímicas de las aflatoxinas.

Característica	B1	B2	G1	G2	M1
Fórmula química	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	C ₁₇ H ₁₂ O ₇
Peso molecular	312	314	328	330	330
Punto de fusión	268-269	287-289	244-249	230	290
Emisión fluorescente	425 nm	425 nm	450 nm	425 nm	425 nm

Fuente: Moreno Martínez, E. *et al.* 1990. Aspergillus flavus y la producción de aflatoxinas. Almacenes Nacionales de Depósito. México. P.30

1.3.3.4. Metabolismo y toxicidad

Aunque la susceptibilidad de los humanos a las aflatoxinas no es bien conocida, los resultados de estudios epidemiológicos llevados a cabo en África y Asia, en donde existe una elevada incidencia de **hepatoma**, han revelado cierta asociación entre la incidencia de **cáncer** y el contenido de aflatoxinas en la dieta. El brote mas severo de hepatitis humana debido a aflatoxicosis se registró en India en 1974, en donde murieron 108 de 397 pacientes que habían consumido maíz contaminado con niveles de aflatoxinas de 0.25 a 15 mg/kg. También la enfermedad conocida como "cirrosis de la niñez hindú" es en parte debida al envenenamiento con aflatoxinas. El síndrome de Reye, con encefalopatías y degeneración grasa en las vísceras de niños, también se ha relacionado con la toxicidad de las aflatoxinas. En Tailandia, en donde las aflatoxinas representan una situación **endémica**, se han detectado por cromatografía las aflatoxinas B₁, G₁ y B₂ en el hígado del hombre y la presencia de los metabolitos P₁ y Q₁ se ha relacionado con cancer (Jaimez *et al.*, 2000).

Muchas aflatoxinas exhiben toxicidad aguda y crónica incluyendo efectos mutagénicos, carcinogénicos y teratogénicos en una gran cantidad de organismos. Generalmente se admite que aproximadamente el 93% de los compuestos mutágenos tiene propiedades cancerígenas. En cuanto a las micotoxinas, los sistemas de ensayo microbiológico revelan un nivel de

correspondencia del 85% entre la acción cancerígena y la mutagénesis (Jay, 1994).

Entre los numerosos metabolitos fúngicos, la AFB₁ está considerada como el más potente hepatocarcinógeno en animales experimentales. Evaluaciones detalladas han demostrado que la AFB₁ es carcinogénica en ratones, ratas, peces, patos y monos a través de diversas vías de administración, como se observa en la tabla VII.

Tabla VII. Carcinogenicidad de AFB₁

Especie	Dosis	Duración de la observación	Frecuencia de los tumores
Pato	30 µg/kg en la dieta	14 meses	8/11 (72%)
Trucha	8 µg/kg en la dieta	1 año	27/65 (40%)
Mono	100-800 mg totales	Más de dos años	3/42 (7%)
Rata	100 µg/kg en la dieta	58-88 semanas	28/28 (100%)
Ratón	150 µg/kg en la dieta	80 semanas	0/60 (0%)

Fuente: Miller, K. 1987. Toxicological aspects of food. Elsevier Applied Science. Great Britain. P. 180.

Con frecuencia se utilizan las ratas como modelo experimental para el estudio de la carcinogenicidad de la AFB₁; de entre varias especies, las ratas Fischer machos son las más susceptibles, y la frecuencia de cáncer de hígado depende de la dosis en un intervalo de 1-100 µg/kg de alimento.

La administración oral de AFB₁ en una dosis de 25 µg/kg de peso corporal, 5 días a la semana, por 8 semanas, causa una elevada incidencia de cáncer de hígado 42 semanas después. Los tumores se producen más fácilmente en machos y en las ratas jóvenes, mientras que los ratones son más resistentes a la AFB₁.

Aunque se ha correlacionado la incidencia de cáncer primario de hígado (PLC, por sus siglas en inglés: Primary Liver Cancer) con la ingesta de AF's, atribuyendo un efecto sinérgico y estadísticamente significativo a la ingesta de alcohol en el desarrollo de PLC, existe también una hipótesis que sostiene que

es el virus de la hepatitis B (HBV) el que juega el papel más importante en la inducción de PLC.

En 1985, la Organización Mundial de la Salud concluyó que el HBV es la segunda causa de cáncer en el hombre, solo después de productos del tabaco.

Los estudios bioquímicos y toxicológicos acerca de la carcinogenicidad potencial de AFB₁ han revelado que esta toxina es metabolizada hacia una forma activa (epóxido) que tiene la capacidad de unirse a macromoléculas tales como el DNA, RNA y proteínas, ocasionando de esta forma alteraciones genéticas. La hidroxilación y desmetilación de AFB₁ produce AFM₁ y AFP₁ respectivamente, mientras que las enzimas del citosol catalizan la reducción de AFB₁ a aflatoxicol. De entre todos estos procesos metabólicos, la reacción de epoxidación está considerada como una reacción de activación, mientras que la hidroxilación y desmetilación se consideran como reacciones de detoxificación (Miller, 1987).

Las aflatoxinas inducen hepatoma o lesiones hepáticas que afectan progresivamente el funcionamiento normal del hígado. Las personas que consumen grandes cantidades de cacahuate de calidad inferior y otras legumbres o cereales contaminados, pueden ir acumulando gradualmente niveles subtóxicos de aflatoxinas que producen ictericia no infecciosa y otros signos de dolencia hepática y mal estado general. No obstante, los datos sobre este aspecto del envenenamiento por aflatoxinas siguen siendo limitados y discutidos (FAO, 1991).

1.3.4.5. Prevención y detoxificación

Indudablemente la prevención del crecimiento fúngico constituye el mejor método para prevenir la producción de aflatoxinas; por consiguiente, las medidas preventivas están dirigidas hacia el control de los factores que influyen en el crecimiento de los hongos, como son: actividad de agua, humedad relativa, temperatura, disponibilidad y composición de los sustratos y presencia de inhibidores. Si la contaminación no se puede prevenir, será necesario aplicar

métodos de descontaminación y/o detoxificación para eliminar o destruir las toxinas permitiendo el consumo del alimento con efectos adversos reducidos (Krogh, 1987). Un proceso de descontaminación se refiere a la supresión física de las unidades (granos o semillas) contaminados, mientras que la detoxificación se refiere a la supresión o destrucción de la toxina del interior de la unidad (Moreno Ramos *et al.*, 1988).

Prevención:

La producción de aflatoxinas en granos y semillas puede controlarse adecuadamente a través de buenas prácticas durante las etapas de:

- ✓ cosecha,
- ✓ secado y
- ✓ almacenamiento

Las medidas preventivas aplicadas en estas etapas se enfocan hacia la reducción de la actividad de agua del alimento hasta un punto en el cual el hongo es incapaz de crecer (ver tabla IV), debiendo mantenerse esta baja a_w durante el almacenamiento posterior (Krogh, 1987).

Los inhibidores del crecimiento fúngico, como amoníaco y ácido propiónico, pueden inhibir la producción de aflatoxina en maíz con un alto contenido de humedad.

Las técnicas para controlar la producción de aflatoxinas en el campo no se han podido implementar tan fácilmente ni de manera tan exitosa como las que se han implementado durante el almacenamiento.

El daño por insectos se ha correlacionado con una elevada incidencia de contaminación con aflatoxinas, por lo que un efectivo programa de control de plagas puede ayudar a reducir la incidencia de aflatoxinas en los cultivos aunque no eliminará por completo la contaminación en el campo (Krogh, 1987).

Detoxificación:

Se han aplicado los siguientes tratamientos:

- a) Inactivación mediante luz
- b) Tratamiento térmico
- c) Tratamiento con amoniaco
- d) Tratamiento con agentes reductores
- e) Tratamiento con agentes oxidantes
- f) Nixtamalización

a) Inactivación mediante luz.- la luz se ha empleado con buenos resultados para destruir aflatoxinas en aceite de cacahuete sin refinar. En estudios recientes se ha demostrado que la luz visible es más eficaz que la luz ultravioleta o infrarroja para la destrucción total de las aflatoxinas. La inactivación depende de que se tomen las medidas necesarias para una exposición máxima del aceite a la luz del sol durante una hora (Moreno Ramos *et al.*, 1988).

b) Tratamiento térmico.- En estado seco, las aflatoxinas son estables al calor hasta su punto de fusión (269°C). En presencia de humedad, sin embargo, su destrucción se logra a temperaturas más elevadas. Se cree que lo que ocurre es la apertura del anillo de lactona seguida de una descarboxilación en esta reacción (Miller, 1987). Las condiciones normales de tostado disminuyen el contenido de AFB₁ de los cacahuates en un 80%, después de media hora de tratamiento (Shibamoto, 1996). Cuando se muele cacahuete contaminado para obtener aceite y harina, la toxina resiste las bajas temperaturas de este proceso o de la extracción mediante solventes, pero se destruye a las temperaturas, más elevadas, que se dan durante el ulterior refinado comercial del aceite. Así, en el aceite refinado comercialmente, no permanecen sustancias perjudiciales, aunque las aflatoxinas pueden estar presentes en la harina residual, lo que posiblemente la hace inadecuada para el consumo humano o animal.

- c) Tratamiento con amoníaco.- El empleo de este compuesto para detoxificar la harina de maíz y de semilla de algodón aumenta el valor nutritivo del pienso que permite el crecimiento de truchas, terneras y otros animales sin efectos patológicos.
- d) Tratamiento con agentes reductores.- La reducción de AFB₁ por hidrógeno da la tetrahidrodeoxi-aflatoxina, y la reducción con hidruro de boro sódico, da AFRB₁ y RB₂. Estos compuestos se forman como resultado de la apertura del anillo de lactona seguido de reducción del grupo ácido y del grupo ceto en el anillo de ciclopentenona (Miller, 1987).
- e) Tratamiento con agentes oxidantes.- Muchos agentes oxidantes tales como hipoclorito de sodio, permanganato de potasio, peróxido de hidrógeno y perborato de sodio, reaccionan con las aflatoxinas cambiando su estructura (Miller, 1987).
- f) Nixtamalización.- Reduce el nivel de contaminación original en el maíz, pero no la elimina. Hay evidencias de que las aflatoxinas se reactivan al acidificarse, lo cual fue observado por Price y Jorgensen (1985) cuando acidificaron muestras nixtamalizadas para simular el efecto de los ácidos en el estómago de los monogástricos (Moreno Martínez *et al.*, 1990).

Cuando se añadieron 250 ppb de AFB₁ a higos secos y después fueron sometidos a varios tratamientos, el bisulfito sódico al 1% efectuó una reducción del 28.2% en 72 horas; el peróxido de hidrógeno al 0.2% (incorporado 10 minutos antes del tratamiento con bisulfito sódico) efectuó una reducción del 65.5%; el calentamiento a temperatura comprendida entre 45 y 65°C durante una hora, redujo las aflatoxinas en un 68.4%; y la radiación UV efectuó una reducción del 45.7%. Cuando se trató maíz de grano amarillo, contaminado de modo natural con 1 600 ppm de aflatoxina, con una solución de sosa al 3% a 100°C durante 100 minutos, y después fue elaborado y frito, se destruyó el 99% de la aflatoxina (Jay, 1994).

Se pueden aplicar otros tratamientos a base de altas temperaturas, tratamientos con amoníaco o extracción de aflatoxinas con mezclas de solventes

que contienen acetona, hexano y agua, o también la utilización de dimetil éter aunque todos estos procesos elevan los costos de producción (FAO, 1981).

1.3.4.6. Detección y cuantificación

Durante los últimos 30 años se ha propuesto una gran cantidad de métodos químicos y biológicos para la detección y cuantificación de AFB₁ y compuestos relacionados. Las primeras observaciones de Sargeant *et al.* (1961) respecto a las propiedades químicas de los compuestos tóxicos en el alimento a base de cacahuete contaminado con aflatoxinas constituyen la tecnología básica para los procedimientos de separación y detección de aflatoxinas (Miller, 1987): extracción exhaustiva con metanol, purificación parcial por transferencia en cloroformo y resolución por cromatografía en papel como una mancha única que exhibe fluorescencia azulosa bajo iluminación ultravioleta de onda larga. El mejoramiento subsecuente en la metodología se puede clasificar en operaciones unitarias que involucran:

- a) La extracción primaria de aflatoxinas
- b) Purificación del extracto
- c) Separación cromatográfica de aflatoxinas
- d) Estimación de aflatoxinas

Después de las observaciones iniciales de Sargeant *et al.* (1961) se propusieron extracciones en Soxhlet con metanol para la remoción de AF's de productos de cacahuete dañados por el hongo, con una duración de cuatro a seis horas. De ser necesario, el desengrasado de las muestras se realizaba con éter de petróleo mediante una extracción tipo Soxhlet antes de la extracción primaria con metanol. Una desventaja común que se presentó en todos los sistemas de extracción exhaustiva con metanol fue la presencia de grandes cantidades de lípidos polares, pigmentos y carbohidratos en el extracto primario no lográndose la remoción de la mayoría de estas sustancias en los pasos subsecuentes de purificación del extracto (Goldblatt, 1989).

Muchos investigadores han propuesto el uso de sistemas de solventes en equilibrio para lograr una extracción más eficiente y en un tiempo más reducido. En la mayoría de los métodos propuestos se utilizan los siguientes sistemas de disolventes:

Metanol-agua (55:45 v/v)

Acetona-agua (85:15)

Acetonitrilo-agua (9:1)

Cloroformo-agua (50% de sustrato seco)

Dicloruro de metileno-agua (50% de sustrato seco)

La purificación del extracto consiste en la remoción de lípidos, carbohidratos y pigmentos de los extractos primarios (Goldblatt, 1969). En la mayoría de los casos, los lípidos son los principales componentes que interfieren con los pasos subsiguientes de cuantificación y los procedimientos para la remoción de lípidos dependen de los solventes empleados para la extracción. Los extractos con solventes orgánicos hidrofílicos (metanol, acetona, acetonitrilo) son desengrasados con hexano o iso-octano. A menudo se introducen en columnas adsorbentes para la remoción de materiales que puedan interferir. En muchos casos, con extractos de origen vegetal, los pigmentos ocasionan problemas durante el análisis evitándose este problema con acetato de plomo, acetato de zinc o carbonato cúprico (Miller, 1987).

La primera purificación cromatográfica fue propuesta por Coomes y Sanders en 1963; estos investigadores cromatografiaron un extracto primario parcialmente purificado de productos de cacahuete en una columna de alúmina neutra para identificar aflatoxinas (Goldblatt, 1969).

La separación de aflatoxinas por cromatografía en capa fina (TLC) aunada a las propiedades fluorescentes de estas toxinas, ha dado las bases para el desarrollo de métodos analíticos extremadamente sensibles.

Las primeras separaciones cromatográficas fueron propuestas simultáneamente por Coomes y Sanders (1963) y por Broadbent *et al.* (1963). Dada la sencillez, economía y fácil manejo de la TLC, ésta es una herramienta

poderosa de separación y detección. También se ha introducido TLC bidimensional para determinación de AF's en carne, leche y huevo (Miller, 1987).

El uso de pequeñas columnas cromatográficas (minicolumnas) para la detección de AF's en alimentos y forrajes, fue introducida en 1968 por Holaday, y fue utilizada para detectar aflatoxinas en cacahuete de una manera similar a la técnica tradicional de cromatografía en capa fina.

La minicolumna consiste en un tubo de vidrio pequeño (aproximadamente 4 mm de diámetro interior), el cual se rellena con uno o varios tipos de adsorbentes (florisil, sílica gel para columna, alúmina ácida, básica o neutra, celulosa o arena) los que a su vez son desarrollados con un sistema de solvente adecuado y posteriormente se observa bajo luz UV (Moreno Ramos, 1988).

El método de minicolumnas es uno de los más utilizados para detectar en forma rápida la presencia de aflatoxinas en maíz y cacahuates llevándose a cabo una extracción con solventes, la purificación de los extractos, su concentración y su elución a través de una minicolumna (Moreno Martínez, 1988).

Las principales ventajas del método de minicolumna sobre cromatografía en capa fina son: disminución del tiempo de desarrollo; equipo y operación sencillos; y bajo costo por muestra. Probablemente la desventaja sea la baja susceptibilidad en la detección de aflatoxinas (Moreno Ramos, 1988).

En años recientes se ha incrementado el uso de la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para el análisis de AF's (Jaimez *et al.*, 2000), siendo Pons (1976) el primero en proponer el uso de esta técnica (Miller, 1987). Las AF's son resueltas completamente como picos agudos en el orden B₁-B₂-G₁-G₂ sobre una columna porosa de sílica gel en 7-13 minutos por medio de un solvente de elución saturado con agua a base de cloroformo-ciclohexano-acetonitrilo, con detección por absorción UV a 380 nm.

Actualmente la metodología de HPLC se emplea para la detección de AFB₁ y toxinas relacionadas en productos de semilla de algodón, AFM, en leche y productos lácteos, AFB₁ y AFG₁ en orina humana, y otros. La AOAC

(Association of Official Analytical Chemists) (1981) ha propuesto un método oficial de HPLC para AF's.

La tecnología moderna ha permitido la introducción de espectrofotometría de masa para el análisis de AF's (Miller, 1987).

En la búsqueda de métodos más sencillos y específicos, para la detección de micotoxinas, incluyendo AF's, se han desarrollado varios métodos inmunquímicos con anticuerpos poli y monoclonales.

El desarrollo de un inmunoensayo incluye al menos cuatro categorías: conjugación de micotoxinas y proteínas para la inmunización; formación de anticuerpos contra las micotoxinas; caracterización de su especificidad, y la aplicación de anticuerpos específicos para determinación de micotoxinas (Miller, 1987).

1.3.4.6.1. Columnas de inmunofinidad Easi-Extract

Las columnas de inmunofinidad Easi-Extract fueron desarrolladas por Rhône Diagnostic Technologies Ltd. para detecciones cuantitativas y semicuantitativas de aflatoxinas B₁, B₂, G₁, G₂ y M₁ en una gran diversidad de alimentos con una recuperación garantizada de más del 80% (Ayres, 1970). Las columnas Easi-Extract han sido evaluadas para los siguientes productos: maíz, trigo, cacahuete, mantequilla de cacahuete, nueces, pistaches, semillas de palma, semillas de girasol, semillas de algodón, higos, pasta de higo, especias, café, leche y queso.

Algunos de los beneficios de estas columnas se enlistan a continuación:

- ✓ La presentación es una columna de inmunofinidad de alta calidad, reproducible y de producción controlada.
- ✓ Alta recuperación de toxinas a partir de una gran variedad de productos (mayor al 80%).
- ✓ Fácil de utilizar y no requiere de personal especializado para su manejo.
- ✓ Tienen la versatilidad de que están diseñadas para trabajar con un número de métodos de detección (por ejemplo: fluorómetro, TLC o HPLC).

✓ Tienen un tiempo de vida de 2 años si se almacenan a una temperatura de 2-8°C.

En la figura 10 se muestra un esquema de la columna de inmunoafinidad Easi-Extract.

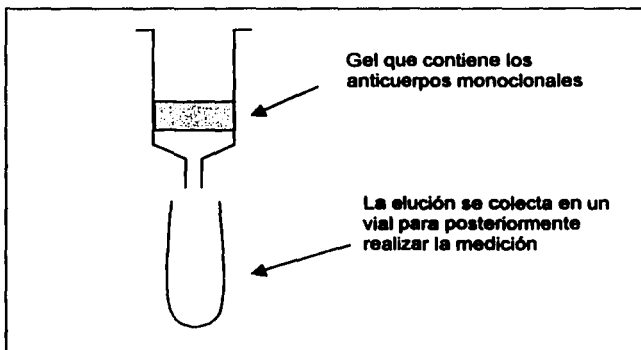


Figura 10. Columna de inmunoafinidad Easi-Extract

Fundamento de la técnica:

Las aflatoxinas son extraídas de la muestra con metanol al 80%, el extracto es filtrado, diluido con solución salina de buffer de fosfatos pH 7.4 y pasado a través de una columna de inmunoafinidad, la cual contiene anticuerpos monoclonales específicos para aflatoxinas. En este estado la aflatoxina se liga al anticuerpo de la columna. La columna es entonces lavada con agua destilada para eliminar impurezas. Posteriormente, las aflatoxinas son removidas del anticuerpo pasando metanol grado HPLC a través de la columna. A la elución resultante se le agrega solución reveladora de bromo y finalmente las aflatoxinas son cuantificadas en forma total a través de un fluorómetro (PROY-NOM-188-SSA1-2000).

**CAPÍTULO II
METODOLOGÍA
EXPERIMENTAL**

CAPÍTULO II. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

En la **figura 11** se muestra el cuadro metodológico general seguido para la realización de este proyecto, la **figura 12** corresponde a los conectores 1, 2 y 3 del cuadro general, mientras que en la **figura 13** se ilustra el procedimiento de extracción, purificación y cuantificación de aflatoxinas por medio de columnas de inmunofinidad Easi-Extract (conector 4) utilizado para cumplir con el objetivo particular 2.

El desarrollo experimental se describe en el apartado 2.2 de este capítulo.

2.1. Cuadro metodológico

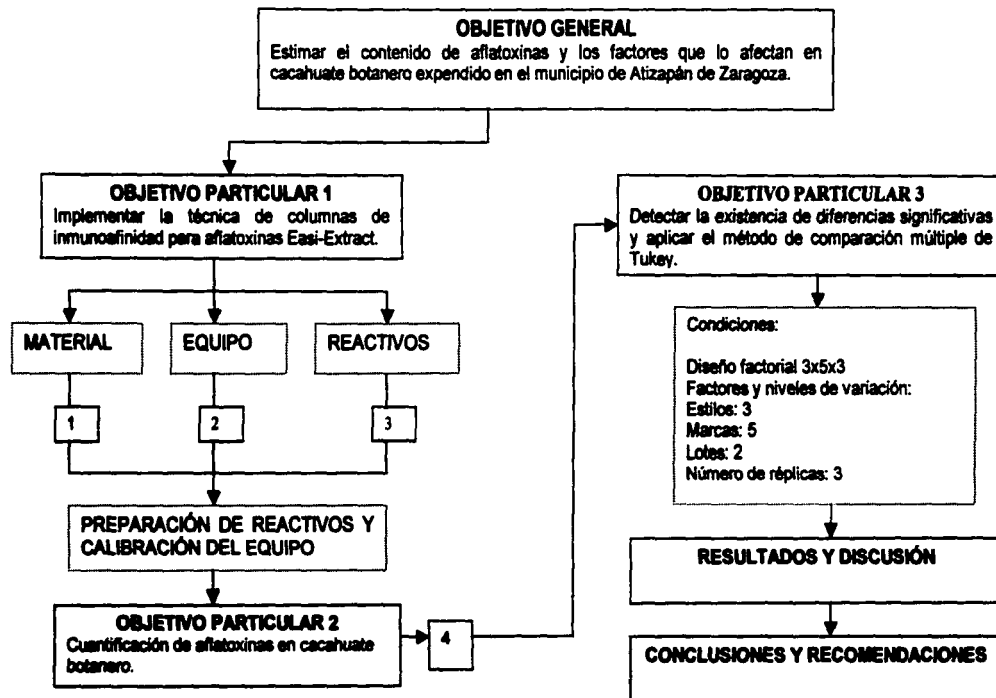


Figura 11. Cuadro metodológico general

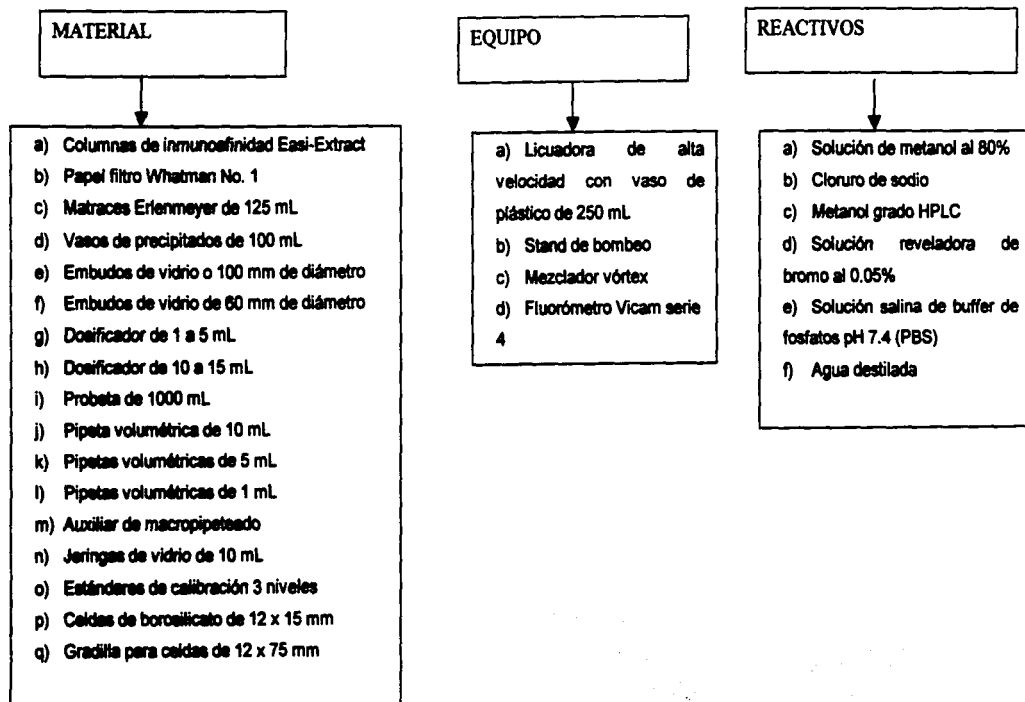


Figura 12. Cuadro metodológico conectores 1, 2 y 3

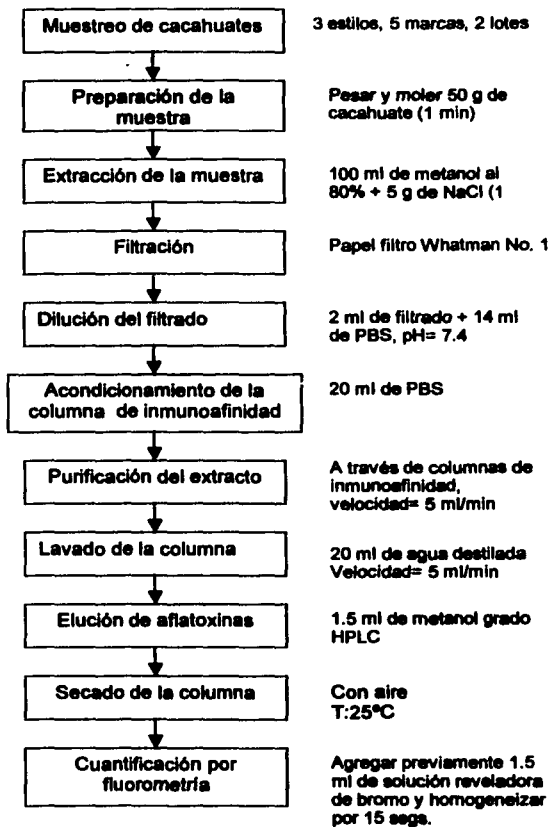


Figura 13. Cuadro metodológico conector 4

2.2. Desarrollo experimental

2.2.1. Objetivo particular 1

Este objetivo consistió en implementar la técnica de columnas de inmunoafinidad Easi-Extract en el Laboratorio de Tecnología de Calidad de Alimentos con el fin de contar con un método más viable para la cuantificación de estas toxinas en el laboratorio.

Para cumplir con el objetivo particular 1, se realizaron las siguientes actividades:

Actividad 1.1. Verificación de la disponibilidad del material, equipo y reactivos señalados en el instructivo de uso Easi-Extract, así como en el proyecto de norma oficial mexicana PROY-NOM-188-SSA1-2000.

En la Figura 12 se encuentra el material, equipo y reactivos utilizados para llevar a cabo la cuantificación de aflatoxinas en el cacahuete analizado.

Actividad 1.2. Preparación de reactivos y calibración del equipo.

Los reactivos y las cantidades necesarias de estos para una llevar a cabo una réplica son los siguientes:

- ⌘ 100 mL de metanol al 80%
- ⌘ 5 g de cloruro de sodio
- ⌘ 1.5 mL de metanol grado HPLC
- ⌘ 35 mL de solución salina de buffer de fosfatos pH 7.4 (PBS)
- ⌘ 20 mL de agua destilada
- ⌘ 1.5 mL de solución reveladora de bromo

La calibración consistió en la verificación de la exactitud y ajuste o corrección del fluorómetro Vicam siguiendo los pasos que se especifican en el proyecto de norma PROY-NOM-188-SSA1-2000 y que se enumeran a continuación:

- 1) Colocar el switch de encendido en posición ON.
- 2) Presionar SELECT TEST seguido de la tecla ENTER.
- 3) El fluorómetro dará lectura de: START CALIBRATION... OPEN THE LID INSERT RED VIAL.

- 4) Abrir la compuerta e insertar el vial de calibración de micotoxinas. Asegúrese que el vial esté completamente dentro del compartimiento de salida.
- 5) El display del equipo dará una lectura: HIGH CAL 22 PPB
- 6) Presionar la tecla ENTER
- 7) El display dará una lectura: READING HIGH CAL... SAVING HIGH INTENSITY.
- 8) Y a continuación leerá: OPEN THE LID INSERT GREEN VIAL.
- 9) Abrir la compuerta y remover el vial rojo. Insertar el vial verde de calibración de micotoxinas y cerrar la compuerta.
- 10) El display dará lectura: LOW CAL -1.0 PPB.
- 11) Presionar la tecla ENTER.
- 12) El display dará una lectura de: READING LOW CAL... SAVING LOW INTENSITY y leerá a continuación: OPEN THE LID.
- 13) Abrir la compuerta y remover el vial verde.
- 14) El display dará una lectura de: VICAM V1.1 READY.
- 15) Presionar SELECT TEST y el display leerá: AFLATEST.
- 16) Presionar ENTER.
- 17) El display leerá: START RUN TEST OPEN THE LID.
- 18) Insertar el estándar de calibración amarillo de micotoxinas. Deberá dar una lectura de 11 ± 2 .
- 19) El fluorómetro está listo para insertar las muestras. El fluorómetro deberá ser calibrado una vez por semana.
- 20) Para la recalibración del fluorómetro: Presionar la tecla OPTIONS hasta que en el display se lea: CALIBRATE TEST.
- 21) Presionar la tecla ENTER. Deberá aparecer en pantalla AFLATEST.
- 22) Si no sucede esto, presionar SELECT TEST hasta que aparezca AFLATEST en la pantalla.
- 23) Entonces presionar ENTER. Insertar los viales rojo y verde de calibración de micotoxinas y calibrar como se describió anteriormente.

Por último se realizaron algunas corridas con muestras de cacahuete con el fin de corroborar que todo estuviese listo para pasar al objetivo particular 2.

2.2.2. Objetivo particular 2

Este objetivo consistió en cuantificar las aflatoxinas presentes en cacahuete botanero expendido en el municipio de Atizapán de Zaragoza a través de la técnica de columnas de inmunoafinidad Easi-Extract con el fin de estimar el nivel de contaminación en estas botanas.

El procedimiento seguido para el cumplimiento de este objetivo se esquematiza en la Figura 13. A continuación se describen los pasos seguidos para llevar a cabo el muestreo, la extracción, purificación y cuantificación de aflatoxinas en los cacahuates analizados.

MUESTREO

Se llevó a cabo un muestreo aleatorio simple de tres estilos de cacahuete (enchilado, salado y japonés) de cinco marcas diferentes en las cuatro tiendas de autoservicio y los dos mercados fijos más importantes y concurridos dentro del municipio de Atizapán de Zaragoza en los meses de febrero y junio del año 2001 de acuerdo con un diseño factorial de $3 \times 5 \times 2$ en el que los factores y niveles de variación para cada uno se especifican en la tabla VIII.

Se encontró que en este municipio del Estado de México se comercializan al menos 19 marcas de cacahuete botanero, de las cuales únicamente ocho (42%) manejan los tres estilos de cacahuete analizados en el presente trabajo; el resto de las marcas (el 58%) sólo maneja cacahuete estilo japonés, siendo estas últimas marcas las que predominan en los mercados fijos estando ausentes en las tiendas de autoservicio. Por otro lado, tanto en las tiendas de autoservicio como en los mercados fijos, se expende cacahuete a granel de los tres estilos a un precio hasta 280% menor que el cacahuete empacado (\$20.00/kg vs \$56.50/kg en el caso más extremo).

Tabla VIII. Factores y niveles de variación muestreados

FACTORES	NIVELES DE VARIACIÓN*
Estilo	3**
Marca***	5
Lote	2

*Se llevaron a cabo 3 réplicas por cada nivel de variación (Total= 90 corridas)

** Los estilos de cacahuete manejados fueron enchilado, salado y japonés

*** Las marcas 1 a 4 corresponden a cacahuete empaquetado y expandido en tiendas de autoservicio, mientras que la marca 5 corresponde al cacahuete expandido a granel en los mercados fijos.

EXTRACCIÓN

Para cada réplica se llevó a cabo una extracción sólido-líquido (lixiviación) a temperatura ambiente (25°C) utilizando metanol al 80% y 5 gramos de cloruro de sodio. Como se puede observar en la figura 13, la técnica específica una reducción de tamaño previa de 50 g de cacahuete durante un minuto utilizando una licuadora de laboratorio y vasos de plástico de 250 ml para posteriormente licuar la muestra con 100 mL de metanol/agua al 80% (v/v) y 5 g de cloruro de sodio por un tiempo de un minuto. El siguiente paso consistió en filtrar la muestra a través de papel filtro Whatman No. 1 y retener el filtrado.

PURIFICACIÓN

En esta etapa se utilizaron las columnas de inmunoadinidad Easi-Extract, las cuales contienen anticuerpos monoclonales altamente específicos para aflatoxinas B₁, B₂, G₁, G₂ y M₁. En primer lugar se diluyeron 2 mL del filtrado con 14 mL de solución buffer (PBS pH 7.4) a la vez que se acondicionó la columna a utilizar, antes de su uso, con 20 mL de PBS de pH 7.4 a una velocidad de 5 mL/min evitando que se secase la columna.

Una vez acondicionada la columna, se pasaron 16 mL de la muestra preparada a través de la columna a una velocidad de flujo de 5 mL/min (evitando que se secase la columna). De esta forma, cualquier aflatoxina presente en la muestra fue específicamente enlazada al anticuerpo y todos los otros materiales

interferentes (lípidos, pigmentos, etc.) pasaron como desechos siendo recolectados en vasos de precipitados de 100 mL.

A continuación se lavó la columna con 20 ml de agua destilada (5 ml/min) para remover cualquier material extraño que no se hubiera enlazado.

CUANTIFICACIÓN

Para poder cuantificar las aflatoxinas enlazadas a los anticuerpos de las columnas de inmunoafinidad, se utilizan 1.5 mL de metanol grado HPLC, el cual se pasó bajo gravedad a través de la columna para eluir cualquier aflatoxina unida a ésta y colectarla en un vial. Para remover las últimas gotas de metanol, la columna se secó pasando aire a temperatura ambiente a través de la columna para remover las últimas gotas de metanol.

Por último se agregó al eluido 1.5 mL de revelador de bromo y se homogeneizó con un mezclador Vortex durante 15 segundos.

La muestra obtenida se utilizó para determinar la cantidad de aflatoxinas presentes por medio de un fluorómetro Vicam serie 4.

2.2.3. *Objetivo particular 3*

Este objetivo consistió en detectar diferencias significativas entre las medidas de los tratamientos o niveles de variación a través de un análisis de varianza (ANOVA, por sus siglas en inglés –Analysis of Variance–) para posteriormente utilizar el método de Tukey de comparación múltiple y poder identificar así los factores y/o interacciones determinantes en el contenido de aflatoxinas en cacahuete botanero.

Para llevar a cabo este análisis estadístico de los resultados, se empleó el programa estadístico SAS (Statistical Analysis System) haciendo uso de un modelo de análisis factorial 3x5x2 y el método de Tukey, como ya se había señalado anteriormente.

**CAPÍTULO III
RESULTADOS
Y DISCUSIÓN**

CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CUANTIFICACIÓN DE AFLATOXINAS

Se llevó a cabo la cuantificación de aflatoxinas en un total de 90 muestras de cacahuate botanero expendido en el municipio de Atizapán de Zaragoza, Estado de México, de tres estilos, cinco marcas y dos lotes diferentes (ver tabla VIII).

El método de cuantificación aplicado fue el de columnas de inmunoafinidad Easi-Extract, para las cuales se ha reportado un porcentaje de recuperación superior al 80% (Rhône Diagnostic Technologies Ltd.), utilizando metanol/agua al 80% como disolvente para llevar a cabo la extracción primaria de aflatoxinas.

Se detectó la presencia de aflatoxinas en 47 de las 90 muestras analizadas, lo que significa que un 52.22% de las muestras resultaron contaminadas con aflatoxinas. Los resultados de los análisis con cacahuates, positivos para aflatoxinas, se reportan en la tabla IX.

Tabla IX. Contenido de aflatoxinas encontrado en 47 de las 90 muestras de cacahuate botanero analizadas en los meses de febrero y junio del 2001

Número	Lote ^a	Marca ^b	Estilo ^c	Cantidad de AF (ppb) ^d
1	1	1	Sal	5
2	1	1	Sal	1
3	1	1	Sal	2
4	1	2	Sal	20
5	1	2	Sal	11
6	1	2	Sal	6
7	1	3	Sal	5
8	1	3	Sal	2
9	1	4	Sal	2
10	1	4	Sal	6
11	1	4	Sal	6
12	1	5	Sal	12
13	1	5	Sal	1
14	1	5	Sal	1
15	1	1	Enc	2
16	1	2	Enc	1
17	1	3	Enc	1
18	1	3	Enc	2

Número	Lote ^a	Marca ^b	Estilo ^c	Cantidad de AF (ppb)
19	1	5	Enc	2
20	1	5	Enc	2
21	1	5	Enc	3
22	1	1	Jap	2
23	1	1	Jap	6
24	1	2	Jap	55
25	1	2	Jap	13
26	1	2	Jap	3
27	1	3	Jap	2
28	1	3	Jap	1
29	1	3	Jap	6
30	1	4	Jap	3
31	1	4	Jap	4
32	1	4	Jap	32
33	1	5	Jap	6
34	1	5	Jap	4
35	1	5	Jap	2
36	2	3	Sal	1
37	2	4	Sal	1
38	2	1	Enc	1
39	2	2	Enc	1
40	2	2	Enc	1
41	2	2	Enc	1
42	2	3	Enc	2
43	2	3	Enc	1
44	2	5	Enc	3
45	2	5	Enc	3
46	2	5	Enc	3
47	2	3	Jap	1

^a Lote 1: muestras recolectadas en el mes de febrero

Lote 2: muestras recolectadas en el mes de junio

^b Las marcas 1-4 corresponden a cacahuete empacado

La marca 5 corresponde a cacahuete a granel

^c Sal= cacahuete salado

Enc= cacahuete enchilado

Jap= cacahuete japonés

^d Cantidad de aflatoxinas expresada en partes por billon (1 ppb= 1 µg/kg)

El contenido promedio de aflatoxinas en las muestras positivas de cacahuete botanero fue de 5.34 ppb. Cabe recordar que la legislación nacional señala un límite de 20 ppb (PROY-NOM-188-SSA1-2000) en cereales para consumo humano y animal.

Araujo, A. *et al.* (1994) analizaron 86 muestras de cacahuates crudos y tostados adquiridos en el comercio de la ciudad de Recife, Brasil, encontrando un 30% de muestras positivas para aflatoxinas totales y un promedio de 141 ppb para aflatoxina B₁, cantidad que rebasa en un 470% el límite máximo de 30 ppb establecido en la legislación brasileña (Araujo *et al.*, 1994).

En un estudio realizado en Barcelona, España (Casanova, C. *et al.*, 1995), se analizaron 19 muestras de maíz destinado a la fabricación de pienso, de las cuales 12 resultaron positivas para aflatoxinas (63%) siendo la concentración máxima encontrada con el método de inmunoensayo ELISA de 5 ppb, cantidad que se encuentra por debajo del límite de 10 ppb establecido en la legislación española.

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Para el análisis de datos se usó un modelo de análisis factorial 3x5x2 donde se consideró el estilo (salado, enchilado, japonés), cinco de las ocho marcas más comunes que manejan los tres estilos de cacahuete analizados y dos lotes de cacahuete obtenidos en los meses de febrero y junio del año 2001 respectivamente.

Para el caso de diferencias significativas se realizó una prueba de separación de medias empleando el método de Tukey. Se empleó el programa estadístico SAS para la obtención de resultados estadísticos.

Los resultados promedio obtenidos para los dos lotes de cacahuete utilizados, así como los resultados para el caso de la interacción lote X producto, presentaron diferencias significativas con un nivel de significación $\alpha=0.05$. Los efectos de las marcas, estilos e interacciones marca X producto, lote X marca y lote X marca X producto no presentaron significancia ($P > 0.05$). Los resultados del análisis de varianza obtenidos con ayuda del programa estadístico SAS se resumen en la tabla X.

Tabla X. Tabla de análisis de varianza para el modelo de análisis factorial 3x2x5

FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO	F	SIGNIFICANCIA
Modelo	29	2263.65	78.08	2.01	P<0.05
Lote	1	504.10	509.10	12.98	P<0.05
Marca	4	308.93	77.23	1.99	n.s.
Estilo	2	205.48	102.74	2.65	n.s.
Lote X Marca	4	329.28	82.32	2.12	n.s.
Lote X Estilo	2	333.80	166.90	4.30	P<0.05
Marca X Estilo	8	303.06	37.88	0.98	n.s.
Lote X Marca X Estilo	8	278.97	34.87	0.90	n.s.
Error	60	2329.33	38.82		
TOTAL	89	4592.98			

EFFECTO DEL LOTE

Al hacer una comparación mediante la prueba de Tukey entre el lote adquirido en el mes de febrero (lote 1) y el adquirido en el mes de junio (lote 2), se encontró que existen diferencias significativas ($P<0.05$) entre las medias de ambos tratamientos para el contenido de aflatoxinas en los cacahuates.

Las medias para cada lote se muestran en la tabla XI.

Tabla XI. Medias de los lotes de cacahuete botanero adquiridos en los meses de febrero (lote 1) y junio (lote 2) del 2001

LOTE	CONTENIDO DE AFLATOXINAS (PPB)
1	5.156
2	0.442

La diferencias existentes pueden atribuirse a las condiciones de cultivo, cosecha, secado y almacenamiento de los lotes de cacahuete muestreados, pues, como se revisó anteriormente, durante el desarrollo de los frutos y semillas de la planta del cacahuete, los hongos productores de aflatoxinas pueden llegar a invadir el grano produciendo estas toxinas dependiendo de la temperatura y

humedad del suelo. Se ha encontrado que temperaturas del suelo entre 26.3 y 29.6°C, aunadas a la falta de humedad en el suelo (épocas de sequía), favorecen la contaminación de las vainas y granos con aflatoxinas (Moreno Martínez, 1988).

EFFECTO DE LA INTERACCIÓN LOTE X PRODUCTO

Según la prueba de Tukey, de todas las interacciones posibles, la única que presenta diferencias significativas es la de lote X producto, lo que indica que las diferencias que se presentaron en el contenido de aflatoxinas se debieron tanto al lote como al estilo de cacahuete utilizado (salado, enchilado, japonés). Se ha demostrado la presencia de aflatoxinas en especias como pudiera ser el chile utilizado en el caso del cacahuete enchilado; dentro de los ingredientes utilizados para la elaboración de cacahuete estilo japonés, la harina de trigo constituye una fuente potencial de contaminación por aflatoxinas, por lo que no es suficiente tener un adecuado control únicamente en el cacahuete utilizado sino en cada uno de los ingredientes que conforman la formulación.

**CONCLUSIONES Y
RECOMENDACIONES**

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La presencia de aflatoxinas en alimentos constituye un problema de salud pública a nivel mundial debido a la gran capacidad carcinogénica, teratogénica y mutagénica de estos metabolitos fúngicos, presentes en una gran variedad de alimentos. Se ha correlacionado la ingesta de una dieta con un alto contenido de aflatoxinas con enfermedades hepáticas en algunos países del continente africano, por lo que no debe descartarse a estas toxinas como una posible causa de las enfermedades hepáticas que aquejan gravemente a la población mexicana de 35 a 55 años de edad.

El objetivo general del presente estudio consistió en estimar el contenido de aflatoxinas y los factores que lo afectan en cacahuete botanero expendido en el municipio de Atizapán de Zaragoza, Estado de México, utilizando la técnica de columnas de inmunoafinidad y un diseño multifactorial de 3x5x2 con el fin de establecer la importancia de la cuantificación de estas toxinas en botanas de cacahuete.

Se eligió al cacahuete por estar considerado como uno de los alimentos clave en la evaluación del riesgo por la ingesta de aflatoxinas (Miller, 1987), además de que fue el producto que dio pie al descubrimiento de las mismas en el año de 1961.

De acuerdo con los resultados obtenidos, a pesar de las posibles diferencias de precio, demanda y apariencia entre las distintas marcas y estilos de cacahuete, no parece existir una diferencia real en el contenido de aflatoxinas en estos productos debido a la marca o al estilo, aunque es importante señalar que, a excepción del cacahuete a granel, únicamente se analizaron muestras de las marcas registradas de mayor consumo entre la población de Atizapán de Zaragoza de clase media y alta. Dado que en México abundan las micro y pequeñas empresas así como las marcas no registradas, un estudio del contenido de aflatoxinas en botanas provenientes de este círculo sería importante para contribuir a la evaluación de la exposición a las aflatoxinas de los estratos poblacionales de la clase media y baja.

El contenido promedio de aflatoxinas se encontró por debajo del límite de 20 ppb establecido en la legislación mexicana. A pesar de que no se rebasó el límite máximo establecido en el proyecto de norma oficial mexicana *PROY-NOM-188-SSA1-2000. Bienes y servicios. Control de aflatoxinas en cereales para consumo humano y animal. Especificaciones sanitarias*, es importante tener presente que se detectó la presencia de aflatoxinas totales en más del 50% de las 90 muestras analizadas encontrándose un valor máximo de 55 ppb para cacahuete japonés.

Dada la toxicidad crónica que pueden presentar las aflatoxinas y su presencia en una gran variedad de alimentos, no se puede evaluar fácilmente el riesgo que representan estas toxinas y menos aún tomando en cuenta única y exclusivamente a un solo producto como es el cacahuete, por lo que sería de gran utilidad llevar a cabo un estudio en otros alimentos, en particular el maíz, cereal de gran consumo en nuestro país y fuente importante de exposición a las aflatoxinas para el ser humano y el ganado.

Con los análisis estadísticos de varianza y la prueba de Tukey se determinó que existían diferencias significativas únicamente debidas al lote y a la interacción lote X estilo (producto), por lo que sería ampliamente recomendable llevar a cabo un seguimiento del contenido de aflatoxinas durante todos los meses del año para detectar variaciones a partir de las cuales se podrían obtener mejores conclusiones acerca de los factores que más influyen en el contenido de aflatoxinas en estas botanas y tratar de encontrar soluciones prácticas que permitan minimizar el riesgo de contaminación por aflatoxinas en estos productos.

Una vez implementada la técnica de columnas de inmunoafinidad para aflatoxinas en un laboratorio, este método resulta ser una herramienta útil en el control de calidad sanitaria de alimentos como: cacahuete, maíz, trigo, semillas de algodón, semillas de girasol, nueces, pistaches, semillas de palma, higos, especias, café, leche y queso.

El hecho de que se detecten estas sustancias tóxicas en los alimentos, aunque sea en un intervalo que cae dentro de los límites establecidos en la

legislación nacional, pone de manifiesto la necesidad de su control y cuantificación sistemática en la industria de los alimentos principalmente debido a la toxicidad crónica que estos metabolitos pueden presentar. Por esta misma razón se debe tratar siempre de reducir al mínimo el riesgo potencial que representan las aflatoxinas para la salud del hombre.

Dada la ubicuidad de las aflatoxinas en granos y semillas así como su presencia relativa en una gran variedad de alimentos, es imprescindible vigilar la calidad tanto de las materias primas como de los ingredientes susceptibles a la contaminación con aflatoxinas incluidos en la formulación de un producto determinado.

Los resultados arrojados por la experimentación reflejan lo que está sucediendo actualmente en el municipio de Atizapán de Zaragoza, Estado de México respecto al cacahuete comercializado en esta región y, dado que las marcas 1 a 4 analizadas corresponden a empresas de talla nacional y la marca 5 corresponde a cacahuete adquirido en la central de abastos más importante del país (Iztapalapa), estos resultados pueden extrapolarse a la mayor parte del territorio nacional.

Con este trabajo se abre la puerta en el Laboratorio 9, Edificio de Posgrado de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán a futuros investigadores interesados en el tema aquí tratado para que continúen aportando conocimientos y descubrimientos científicos en el área de Análisis de Alimentos.

Algunos "tips" útiles en el uso rutinario de las columnas de inmunofinidad Easi-Extract son:

- ✓ Verificar la presencia y cantidad de todos los reactivos a utilizar antes de comenzar la experimentación.
- ✓ Utilizar bata, guantes desechables, cubrebocas, cofia y lentes protectores a lo largo de toda la experimentación.
- ✓ Utilizar protectores auditivos durante la etapa de reducción de tamaño de la muestra.

- ✓ Remojar el material utilizado por un mínimo de dos horas en una solución de hipoclorito de sodio al 1.3% w/w seguido de lavado con agua y jabón y un enjuagado final con agua destilada.
- ✓ Enjuagar las jeringas de vidrio con metanol y agua destilada al final de cada experimento.
- ✓ Guardar la solución buffer de fosfatos en refrigeración (0-5°C) y descartar si aparece turbidez.
- ✓ Cuando de experimentar se trata, el seguimiento cuidadoso de los pasos del método científico aunado a la paciencia, la curiosidad y la tenacidad deben estar presentes en todo investigador.

GLOSARIO

GLOSARIO

- ☞ **ÁPICE.** Extremo superior de un órgano; punto de crecimiento.
- ☞ **AÑO AGRÍCOLA.** El período que resulta de la adición del ciclo Otoño-Invierno con el ciclo Primavera-Verano y el de las cosechas de los cultivos perennes.
- ☞ **CÁNCER.** Cualquier tumor maligno incluyendo el carcinoma y el sarcoma. Se forma por la división anormal e incontrolada de las células que después invaden y destruyen los tejidos de alrededor.
- ☞ **CARCINOGENÉTICO.** Cualquier sustancia que en contacto con un tejido vivo puede causar la producción de un carcinoma.
- ☞ **CARCINOMA.** Cualquier cáncer que se desarrolla en el epitelio, tejido que reviste la piel y los órganos internos del cuerpo.
- ☞ **ENDÉMICO.** Que se presenta con frecuencia en una determinada región o población.
- ☞ **ESTÍPULA.** Órgano pequeño de las hojas en forma de espina, que se encuentra en la base del rabito o peciolo.
- ☞ **FOLIÓLO.** Cada una de las divisiones u hojitas de una hoja compuesta (pinnada).
- ☞ **HEPATOMA.** Tumor maligno del hígado que se origina en las células maduras hepáticas.
- ☞ **HERMAFRODITA.** Con órganos sexuales masculinos y femeninos en la misma flor.
- ☞ **HIPERPLASIA.** Incremento de la formación y el desarrollo de las células normales de un tejido u órgano. La parte afectada aumenta de tamaño pero mantiene su forma normal.
- ☞ **ICTERICIA.** Coloración amarilla de la piel o de la esclerótica ocular producida por el exceso de bilirrubina (pigmento biliar) en la sangre.
- ☞ **INDEHISCENTE.** Que no se abre para liberar polen o semillas.
- ☞ **INFLORESCENCIA.** Agrupamiento de flores.
- ☞ **MUTACIÓN.** Cambio en el material genético de una célula.

- ☞ **MUTAGÉNICO.** Agente externo que al aplicarse a las células u organismos puede incrementar el índice de **mutación**.
- ☞ **NECROSIS.** Muerte de alguna o de todas las células en un órgano o tejido.
- ☞ **OBOVADA.** Que presenta el contorno de un huevo invertido.
- ☞ **PECÍOLO.** Tallito o eje delgado que une la hoja al tallo.
- ☞ **PEDÚNCULO.** Rabito que une la hoja, la flor o el fruto al tallo o a la rama.
- ☞ **PINNADA (HOJAS).** Que constan de varias hojuelas o folíolos que nacen a lo largo de un eje o nervio medio.
- ☞ **PUBESCENTE.** Que está cubierto de vellos o pelillos.
- ☞ **SARCOMA.** Cáncer de tejido conectivo.
- ☞ **TEGUMENTO.** Tejido que envuelve y protege algunas partes de las plantas, como algunos frutos, las semillas, etcetera.
- ☞ **TERATOGÉNICO.** Cualquier sustancia, agente o proceso que produce malformaciones de desarrollo en el feto.
- ☞ **TESTA.** Ver **tegumento**.
- ☞ **VAINA.** Se aplica al fruto de las leguminosas (legumbres).

REFERENCIAS

REFERENCIAS

1. Araújo, A., *et al.* 1994. *Determinación de aflatoxinas en cacahuetes comercializados en Recife-PE, Brasil.* Alimentaria. (249): 35-37.
2. Ayres, G. 1970. *Análisis químico cuantitativo*. Ed. Harla. México.
3. Badui Dergal, S. 1998. *Diccionario de tecnología de los alimentos*. Ed. Addison Wesley Longman. México.
4. Carleto, F. 1999. *Validation of Pharmaceutical Processes*. 2nd edition. Marcel Dekker Inc. USA.
5. Casanova, C., *et al.* 1995. *Identificación y semicuantificación de aflatoxinas en maíz.* Alimentaria. (159): 45-47.
6. Christensen, C. M. and Henry H. Kaufmann. 1969. *Grain storage*. University of Minnesota Press. USA.
7. Desrosier, N. W. 1996. *Elementos de tecnología de alimentos*. Ed. CECSA. México.
8. D'Mello, J. P., *et al.* 1997. *Mycotoxins.* Animal Feed Science Technology. **69**: 155-166.
9. FAO. 1991. *Utilización de alimentos tropicales: semillas oleaginosas tropicales*. Estudio FAO alimentación y nutrición 47/5. Italia.
10. Feng-qin Li, *et al.* 2000. *Alternaria Mycotoxins in Weathered Wheat from China.* J. Agric. Food Chem. **48**: 2920-2924.

11. Fennema, O. R. 1993. *Química de los alimentos*. Ed. Acribia. España.
12. Galindo Fentanes, E. 1988. *Biotecnología: oportunidades y amenazas*. Ciencia y Desarrollo, (80): 21-40.
13. Gobierno del Estado de México, et al. 1989. *Libro del Estado de México*. 6^{ta} edición. México.
14. Goldblatt, Leo A. 1969. *Aflatoxin. Scientific Background, control and implications*. Academic Press. USA.
15. <http://www.botany.hawaii.edu/faculty/wong/BOT135/syllabus98.htm>
16. <http://www.inegi.gob.mx>
17. <http://www.ssa.gob.mx>
18. INEGI. 1997. *Cultivos anuales de México. VII Censo Agropecuario*. México.
19. Jaimez, J., et al. 2000. *Application of the assay of aflatoxins by liquid chromatography with fluorescence detection in food analysis*. Journal of Chromatography, 882: 1-10.
20. Jay, J. 1994. *Microbiología moderna de los alimentos*. Ed. Acribia. España.
21. Krogh, P. 1987. *Mycotoxins in Food*. Academic Press. USA.
22. Leming Lin, et al. 1998. *Thin-layer chromatography of mycotoxins and comparison with another chromatographic methods*. Journal of Chromatography, 815: 3-20.

23. León, M. J., et al. 1999. *Importancia de los planes de muestreo en la determinación de micotoxinas*. Alimentaria, 36 (307): 31-34.
24. Lindner, E. 1995. *Toxicología de los alimentos*. 2ª edición. Ed. Acribia. España.
25. Manuales para educación agropecuaria. 1983. *Cultivos oleaginosos*. Ed. Trillas. México.
26. Matz, S. A. 1976. *Snack Food Technology*. Ed. AVI. USA.
27. McMurry, John. 1994. *Química orgánica*. Grupo Editorial Iberoamérica. México.
28. Medina Martínez, M., et al. 2000. *Mold Occurrence and Aflatoxin B₁ and Fumonisin B₁ Determination in Corn Samples in Venezuela*. J. Agric. Food Chem. 48: 2833-2836.
29. Mercado H., S. 1999. *¿Cómo hacer una tesis?* Ed. Limusa. México.
30. Miller, Klara. 1987. *Toxicological Aspects of Food*. Elsevier Applied Science. Great Britain.
31. Montgomery, D. C. 1991. *Diseño y análisis de experimentos*. Gpo. Editorial Iberoamericana. México.
32. Moreno Martínez, E. 1988. *Manual para la identificación de hongos en granos y sus derivados*. UNAM. México.
33. Moreno Martínez, E. y Manuel Gil Gutiérrez. 1990. *Aspergillus flavus y la producción de aflatoxinas*. Almacenes Nacionales de depósito. México.

34. Moreno Martínez, E. 1993. *Tratamiento químico de las semillas para el combate de los hongos*. UNAM. México.
35. Moreno Ramos, C. e I. Hernández Torres. 1988. *Implementación de técnicas de cuantificación de aflatoxinas*. (Tesis de licenciatura). Cuautitlán Izcalli, Edo. de México: FES Cuautitlán. UNAM.
36. Munck, L. 1989. *Fluorescence analysis in foods*. Longman Scientific & Technical. Singapore.
37. Primo Yúfera, E. 1987. *Química agrícola III. Alimentos*. Ed. Alambra. España.
38. PROYECTO de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-188-SSA1-2000. *Bienes y servicios. Control de aflatoxinas en cereales para consumo humano y animal. Especificaciones sanitarias*.
39. Ramírez Grande, Lucía. 1992. *Validación del método analítico para valoración de diclofenaco sódico en grageas de liberación prolongada y materia prima*. (Tesis de licenciatura). Cuautitlán Izcalli, Edo. de México: FES Cuautitlán. UNAM.
40. Robles Sánchez, R. 1991. *Producción de oleaginosas y textiles*. Ed. Limusa. México.
41. Roitt, I., et al. 1998. *Inmunología*. Ed. Harcourt Brace. España.
42. Sauer, D. B. 1992. *Storage of cereal grains and their products*. 4th edition. American Association of Cereal Chemists. USA.
43. Shibamoto, T. y L. F. Bjeldanes. 1996. *Introducción a la toxicología de los alimentos*. Ed. Acribia. España.

44. Vélez Sobrino, N. 1998. *Introducción a la estadística para la calidad total*. Ed. Limusa. México.

45. Villee, C. 1988. *Biología*. Ed. McGraw Hill. México.

ANEXOS

I. PRINCIPALES CAUSAS DE MORTALIDAD EN MÉXICO

Principales Causas de Mortalidad General Estados Unidos Mexicanos, 1999

No. de Orden	Causa	Clave CIE 10a. Rev	Defunciones	Tasa 1/
	Total	000	443,950	452.4
1	Enfermedades del corazón	097	69,278	70.6
	- Enfermedades isquémicas del corazón	097C	44,070	44.9
2	Tumores malignos	049	53,662	54.7
3	Diabetes mellitus	061	45,632	46.5
4	Accidentes	167	35,690	36.4
	- Accidentes de tráfico de vehículos de motor	167B	11,659	11.9
5	Enfermedades del hígado	125	27,040	27.6
	- Enfermedad alcohólica del hígado	125A	13,417	13.7
6	Enfermedades cerebrovasculares	098	25,836	26.3
7	Ciertas afecciones originadas en el periodo perinatal	163	19,268	19.6
	- Dificultad respiratoria del recién nacido y otros trastornos respiratorios originados en el periodo perinatal	1631	10,042	10.2
8	Influenza y Neumonía	105	14,068	14.3
9	Agresiones (homicidio)	169	12,249	12.5
10	Enfermedades pulmonares obstructivas crónicas	113	11,319	11.5
11	Desnutrición y otras deficiencias nutricionales	066	9,776	10.0
12	Malformaciones congénitas, deformidades y anomalías cromosómicas	165	9,714	9.9
13	Bronquitis crónica y la no especificada, enfisema y asma	110	7,840	8.0
14	Insuficiencia renal	139	7,807	8.0
15	Enfermedades infecciosas intestinales	001	5,622	5.7
16	Enfermedad por virus de la inmunodeficiencia humana (SIDA)	037	4,204	4.3
17	Anemias	058	3,581	3.7
18	Lesiones autoinfligidas intencionalmente (suicidio)	168	3,339	3.4
19	Tuberculosis pulmonary	002	3,229	3.3
20	Septicemia	015	3,085	3.1
	Paro cardíaco	997	0	0.0
	Síntomas signos y hallazgos anormales clínicos y de laboratorio no clasificados en otra parte	998	9,474	9.7
	Las demás causas	999	62,237	63.4

1/ Tasa por 100,000 habitantes.
Fuente: INEGI, SSA/DOEI, 1999.

**Principales Causas de Mortalidad en Población de 35 a 44 años
Estados Unidos Mexicanos, 1999**

No. de Orden	Causa	Clave CIE 10a. Rev	Defunciones	Tasa I/
	Total	000	29,783	255.9
1	Accidentes	167	4,800	41.2
	- Accidentes de tráfico de vehículos de motor	167B	1,865	16.0
2	Enfermedades del hígado	125	4,300	36.9
	- Enfermedad alcohólica del hígado	125A	2,763	23.7
3	Tumores malignos	049	3,791	32.6
	- Tumor maligno del cuello del útero	0490	723	6.2
	- Tumor maligno de la mama	049M	573	4.9
4	Agresiones (homicidio)	169	2,348	20.2
5	Enfermedades del corazón	097	2,314	19.9
	- Enfermedades isquémicas del corazón	097C	1,380	11.9
6	Diabetes mellitus	061	1,750	15.0
7	Enfermedad por virus de la inmunodeficiencia humana (SIDA)	037	1,274	11.0
8	Enfermedades cerebrovasculares	098	870	7.5
9	Síndrome de dependencia del alcohol	069	644	5.5
10	Lesiones autoinfligidas intencionalmente (suicidio)	168	493	4.2
11	Influenza y Neumonía	105	480	4.1
12	Insuficiencia renal	139	456	3.9
13	Tuberculosis pulmonar	002	389	3.3
14	Embarazo, parto y puerperio	157	306	2.6
15	Epilepsia	081	278	2.4
16	Desnutrición y otras deficiencias nutricionales	066	206	1.8
17	Pancreatitis aguda y otras enfermedades del páncreas	127	201	1.7
18	Septicemia	015	179	1.5
19	Anemias	058	179	1.5
20	Enfermedades infecciosas intestinales	001	147	1.3
	Paro cardíaco	997	0	0.0
	Síntomas signos y hallazgos anormales clínicos y de laboratorio no clasificados en otra parte	998	310	2.7
	Las demás causas	999	4,068	35.0

I/ Tasa por 100,000 habitantes de 35 a 44 años, estimada en base a las proyecciones de población del Consejo Nacional de Población.
Fuente: INEGI, SSA/DOEI, 1999.

**Principales Causas de Mortalidad en Población de 45 a 54 años
Estados Unidos Mexicanos, 1999**

No. de Orden	Causa	Clave CIE 10a. Rev	Defunciones	Tasa 1/
	Total	000	39,434	541.4
1	Tumores malignos	049	6,737	92.5
	- Tumor maligno del cuello del útero	049O	1,030	14.1
	- Tumor maligno de la mama	049M	911	12.5
	- Tumor maligno del estómago	049C	591	8.1
2	Enfermedades del hígado	125	6,060	83.2
	- Enfermedad alcohólica del hígado	125A	3,478	47.8
3	Diabetes mellitus	061	5,209	71.5
4	Enfermedades del corazón	097	4,805	66.0
	- Enfermedades isquémicas del corazón	097C	3,206	44.0
5	Accidentes	167	3,525	48.4
	- Accidentes de tráfico de vehículos de motor	167B	1,269	17.4
6	Enfermedades cerebrovasculares	098	1,715	23.5
7	Agresiones (homicidio)	169	1,338	18.4
8	Síndrome de dependencia del alcohol	069	661	9.1
9	Insuficiencia renal	139	644	8.8
10	Enfermedad por virus de la inmunodeficiencia humana (SIDA)	037	535	7.3
11	Influenza y Neumonía	105	530	7.3
12	Tuberculosis pulmonar	002	483	6.6
13	Desnutrición y otras deficiencias nutricionales	066	298	4.1
14	Bronquitis crónica y la no especificada, enfisema y asma	110	298	4.1
15	Enfermedades pulmonares obstructivas crónicas	113	292	4.0
16	Lesiones autoinfligidas intencionalmente (suicidio)	168	289	4.0
17	Septicemia	015	230	3.2
18	Anemias	058	223	3.1
19	Enfermedades infecciosas intestinales	001	204	2.8
20	Úlceras gástrica y duodenal	118	194	2.7
	Paro cardíaco	997	0	0.0
	Síntomas signos y hallazgos anormales clínicos y de laboratorio no clasificados en otra parte	998	364	5.0
	Las demás causas	999	4,800	65.9

1/ Tasa por 100,000 habitantes de 45 a 54 años, estimada en base a las proyecciones de población del Consejo Nacional de Población.
Fuente: INEGI, SSA/DGEL, 1999.