



---

---

**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTILÁN**

**ESTUDIO DE INOCUIDAD DE PRODUCTOS A BASE DE PEPITA VERDE  
DE CALABAZA ELABORADOS ARTESANALMENTE EN MÉXICO.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
INGENIERA EN ALIMENTOS**

**P R E S E N T A :  
ADRIANA CORRALES SALINAS**

**ASESORA:  
DRA. MARÍA ANDREA TREJO MÁRQUEZ.**

**Cuautilán Izcalli, Abril del 2008.**



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.

## *AGRADECIMIENTOS.*

*El presente trabajo fue financiado por la Cátedra de Investigación de Tecnología de Productos Vegetales (IN2-29) de la FES-Cuautitlán, UNAM.*

*Se agradece el apoyo técnico para la investigación y aislamiento de los hongos a la Q.F.B. Ma. Antonieta Silva Chávez del Cepario de la Facultad de Química, UNAM.*

*Doctora María Gabriela Vargas Martínez del Laboratorio de Desarrollo de Métodos Analíticos de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM, por el apoyo en la identificación de aflatoxinas.*

*Se agradece el apoyo técnico a la M. en .C. Norma Angélica Camacho de la Rosa para la realización del presente trabajo.*

*M. en C. Josefina Moreno Lara por el apoyo y asesoramiento técnico en la cuantificación de aflatoxinas.*

## DEDICATORIAS

*Agradezco a Dios por haberme dado a la mejor familia, a quienes estoy infinitamente agradecida por darme siempre el apoyo y cariño incondicional.*

*A mis padres María Salinas Villanueva y J. Jesús Corrales Quebrado por todo el apoyo que me han brindado en el transcurso de mi vida, por toda la ayuda recibida ya que han hecho más ligero mi camino, por las palabras de aliento recibidas en los momentos más difíciles, por la vida misma, por su dedicación, por sus esfuerzos que han brindado a sus hijos, por sus desvelos, por sus sacrificios. Por darme el amor y por alentarme a salir siempre adelante. Por ustedes y para ustedes que hoy ven realizados su meta de convertirse en Ingenieros en Alimentos. Los amo mucho. Gracias.*

*A mis hermanos Arminda, Marco A., Alejandra y Araceli Corrales Salinas porque siempre han estado conmigo. Por la ayuda que me brindan para poder llegar al término de un ciclo más en mi preparación.*

*A ti Daniel A. Sánchez Bravo por el apoyo y amor que me has dado en todo momento.*

*A la familia Villanueva Corrales, Familia Flores Villanueva, Familia Cazañas Flores, Familia Villegas Flores, Familia Carranza Flores, Familia Corrales Quebrado, gracias por su cariño y apoyo.*

*A la Doctora Ma. Andrea Trejo Márquez por confiar y creer en mí, por sus enseñanzas, por el apoyo y por la dedicación que pone a cada uno de sus alumnos.*

*A Norma A. Camacho por la enseñanza y apoyo para la realización de la tesis*

*A mis amigos de la carrera Karen Navarrete, Miriam Ugalde, Ángeles Ruiz, Gerardo Chávez, Jesús Gutiérrez, Samson Bostanci, Yabín Kalab, Juan Carlos Mancera.*

*Cada fracaso supone un capítulo más en la historia de nuestra vida y una lección que nos ayuda a crecer. No te dejes desanimar por los fracasos. Aprende de ellos, y sigue adelante.*

**ÍNDICE.**

	Páginas.
Resumen.	
1. Introducción	1
2. Antecedentes.	4
2.1 Generalidades de la comida y dulces mexicanos.	4
2.1.1 Elaboración y definición de dulces típicos.	5
2.1.2 Elaboración y definición de botanas.	6
2.1.3 Mole y pipián.	10
2.2 Pepita de calabaza.	11
2.2.1 Composición química.	13
2.3 Alteraciones en los alimentos.	13
2.4 Enfermedades transmitidas por alimentos.	15
2.5 Micotoxinas.	15
2.5.1 Principales micotoxinas y su clasificación.	17
2.6 Aflatoxinas.	20
2.6.1 Clasificación.	20
2.6.2 Factores que afectan la presencia de aflatoxinas	21
2.6.3 Estructura química de las aflatoxinas	22
2.6.4 Características químicas y físicas de las aflatoxinas.	22
2.6.5 Toxicidad.	23
2.6.6 Dosis letales.	30
2.6.7 Mecanismos de acción.	30
2.6.8 Detoxificación y descontaminación.	32
2.7 Métodos para la determinación de aflatoxinas.	33
2.8 Regulación del contenido de aflatoxinas.	38
3. Objetivos.	41
3.1 Objetivo general.	41
3.2 Objetivos particulares.	41
4. Metodología experimental.	43
4.1 Cuadro metodológico.	43
4.2 Material biológico.	47
4.3 Tratamiento de las muestras.	47



	Páginas.
4.4 Evaluación física, química y fisicoquímica de pepita verde de calabaza y productos.	47
4.5 Evaluación microbiológica de pepita verde de calabaza y productos.	48
4.5.1. Identificación y purificación de hongos presentes en pepita verde y productos.	49
4.4.1.1 Crecimiento.	49
4.4.1.2 Identificación macroscópica.	49
4.4.1.3 Purificación y aislamiento de los hongos.	49
4.4.1.4 Identificación microscópica.	49
4.6 Determinación e identificación de aflatoxinas presentes en pepita verde de calabaza y productos derivados.	50
4.7 Investigación de campo.	50
4.8 Propuesta para mejorar la calidad del proceso de elaboración del mole.	51
4.9. Técnicas analíticas.	51
4.9.1 Parámetros químicos.	51
4.9.1.1 Proteína.	51
4.9.1.2 Grasa.	52
4.9.1.3 Humedad.	52
4.9.1.4 Cenizas.	53
4.9.2 Pruebas físicas.	53
4.9.2.1 Análisis sensoriales.	53
4.9.3 Parámetros fisicoquímicos.	53
4.9.3.1 pH.	53
4.9.3.2 Ácidez.	54
4.9.4 Parámetros microbiológicos.	54
4.9.4.1 Coliformes totales.	54
4.9.4.2 Mesófilos aerobios.	55
4.9.4.3 Hongos y levaduras.	55
4.9.5 Aflatoxinas.	55



---

	Páginas.
4.9.5.1 Columnas de inmunoafinidad.	55
4.9.5.2 HPLC.	55
4.9.5.2.1 Reactivos.	55
4.9.5.2.2 Equipos.	56
4.9.5.2.3 Preparación de patrones.	56
4.9.5.2.4 Preparación de las muestras.	56
4.5.9.2.5 Derivatización.	57
4.5.9.2.6 Condiciones cromatográficas.	57
4.10 Tratamiento estadístico.	57
5. Resultados y discusión.	58
5.1 Características químicas de la pepita y productos a base de pepita verde de calabaza.	58
5.2 Características físicas de la pepita verde de calabaza y sus productos.	68
5.3 Análisis sensorial.	71
5.4. Evaluación microbiológica de productos a base de pepita verde de calabaza.	74
5.4.1 Coliformes totales.	75
5.4.2 Mesófilos aerobios.	76
5.4.3 Hongos.	78
5.4.3.1 Descripción macroscópica.	80
5.4.3.2 Descripción microscópica.	82
5.5 Aflatoxinas.	84
5.6 Relación de la presencia de aflatoxinas con el proceso artesanal de elaboración de mole verde en San Pedro Atocpan.	89
5.6.1 Proceso de elaboración del mole verde.	89
5.6.2 Descripción del proceso.	90
5.6.3 Utensilios y equipos utilizados en la elaboración de mole verde.	94
5.6.4 Instalaciones.	95
5.6.5 Limpieza del personal.	97





	Páginas.
5.6.5.1 Sistema de limpieza.	97
5.6.6 Calidad de materias primas y productos.	97
5.7 Propuesta para mejorar las condiciones de almacenamiento de la pepita verde de calabaza y de sus productos.	98
5.7.1 Definición del producto.	99
5.7.2 Identificación de peligros y medidas de control.	101
5.7.3 Determinación de puntos críticos de control.	103
5.7.4 Establecimiento de límites críticos.	104
5.8 Propuesta para mejorar la calidad de los productos.	104
5.8.1 Instalaciones.	105
5.8.2 Implementación de buenas prácticas de manufactura.	108
5.9 Control de las micotoxinas en los alimentos.	112
6. Conclusiones.	114
7. Recomendaciones	116
8. Anexos.	117
9. Referencias.	120
10. Abreviaturas	131

**ÍNDICE DE TABLAS.**

	Páginas.
Tabla 1. Dulces típicos.	6
Tabla 2. Botanas a base de la pepita verde de calabaza.	8
Tabla 3. Mole y pipián a base de la pepita verde de calabaza.	11
Tabla 4. Composición química de la pepita verde de calabaza.	14
Tabla 5. Algunos de los principales metabolitos tóxicos producidos por hongos contaminantes de los alimentos.	18
Tabla 6. Clasificación general de micotoxinas.	18
Tabla 7. Propiedades físicas de las aflatoxinas.	23
Tabla 8. Principales efectos fisiopatológicos producidos por las micotoxinas.	27
Tabla 9. Principales aflatoxinas en los alimentos de consumo humano.	29
Tabla 10. Dosis letal de aflatoxina.	31
Tabla 11. Técnicas de extracción y purificación.	34
Tabla 12. Técnicas de presunción o screening.	36
Tabla 13. Técnicas de confirmación.	37
Tabla 14. Limite máximo permisible en distintos países del mundo para aflatoxina B1 y aflatoxinas totales.	38
Tabla 15. Limite máximo permisible en distintos alimentos para AFB <sub>1</sub> (Unión Europea).	39
Tabla 16. Atributos evaluados en pepita verde de calabaza y productos.	53
Tabla 17. Evaluación de la textura en la pepita verde de calabaza y productos.	54
Tabla 18. Características químicas de la pepita verde de calabaza procedente de Cuautitlán (zona 1) y Central de Abastos (zona 2).	59
Tabla 19. pH de las botanas (A), dulces (B), moles (C) comercializados en Cuautitlán (zona1) y Central de abastos de la Ciudad de México (zona 2).	66
Tabla 20. Características físicas en botanas (pepita cruda, con cáscara, salada y en botana) procedentes de Cuautitlán (zona 1) y Central de Abastos (zona 2).	68
Tabla 21. Características físicas de dulces (pepita garapiñada, en jamoncillo y en palanqueta) a base de pepita verde de calabaza procedentes de Cuautitlán (zona 1) y Central de Abastos (zona 2).	69



---

	Páginas
Tabla 22. Características físicas de moles a base de pepita verde de calabaza procedentes de Cuautitlán (zona 1) y central de Abastos (zona 2).	69
Tabla 23. Análisis sensorial del mole y del pipián comercializado en Cuautitlán (zona 1) y en la Central de Abastos (zona 2).	73
Tabla 24. Coliformes totales en la pepita verde de calabaza y sus productos comercializados en Cuautitlán (zona 1) y la Central de Abastos (zona 2).	76
Tabla 25. Mesófilas aerobias en pepita verde de calabaza y de los productos comercializados en Cuautitlán (zona 1) y la Central de Abastos (zona 2).	77
Tabla 26. Hongos presentes en la pepita verde de calabaza y de los productos comercializados en la zona de Cuautitlán (zona 1) y la Central de abastos (zona 2).	79
Tabla 27. Aflatoxinas totales de la pepita verde de calabaza y sus productos comercializados en la zona de Cuautitlán (zona 1) y la Central de abastos (zona 2).	85
Tabla 28. Contenido de aflatoxina G2 en pepita verde de calabaza y productos.	88
Tabla 29. Características de las instalaciones.	96
Tabla 30. Análisis microbiológico de las materias primas y del mole elaborado en San Pedro Atocpan.	98
Tabla 31. Aflatoxinas en las materias primas y del mole elaborado en San Pedro Atocpan.	98
Tabla 32. Descripción del producto.	100
Tabla 33. Lista de materias primas y otros materiales incorporados.	101
Tabla 34. Identificación de peligros y medidas de control.	102
Tabla 35. Determinación de límites críticos.	104
Tabla 36. Plan HACCP.	105

**ÍNDICE DE FIGURAS.**

	Páginas.
Figura 1. Mole poblano.	5
Figura 2. Diagrama de proceso de la elaboración de la pepitoria.	7
Figura 3. Diagrama de proceso de la elaboración del jamoncillo.	7
Figura 4. Diagrama de proceso de la elaboración de la pepita garapiñada.	8
Figura 5. Diagrama de proceso de la elaboración de la pepita en botana.	9
Figura 6. Diagrama de proceso de la elaboración de la pepita con cáscara.	10
Figura 7. Diagrama de elaboración de la pepita salada.	10
Figura 8. Diagrama de proceso de elaboración del pipián.	12
Figura 9. Pepita de Calabaza (Cucurbita pepo).	12
Figura 10. Pepita verde de calabaza.	13
Figura. 11 Fases de crecimiento fúngico y localización de la síntesis de micotoxinas.	17
Figura 12. Estructura química de las aflatoxinas.	22
Figura 13. Metabolismo de la aflatoxina B <sub>1</sub> .	32
Figura 14. Productos a base de pepita de calabaza comercializada en las zonas de Cuautitlán y la Central de Abastos de la Ciudad de México.	48
Figura15. Identificación microscópica.	50
Figura 16. Equipo soxhlet.	52
Figura 17. Cajas de aluminio para humedad.	52
Figura 18. Equipo HPLC.	56
Figura 19. Contenido de humedad de botanas (pepita cruda, pepita con cáscara, salada y en botana) comercializados en Cuautitlán (zona 1) y Central de Abastos de Ciudad de México (zona 2).	60
Figura 20. Contenido de humedad dulces (pepita garapiñada, en jamoncillo y palanqueta) comercializados en Cuautitlán (zona 1) y Central de Abastos de Ciudad de México (zona 2).	61
Figura 21. Contenido de humedad del mole y del pipián comercializados en Cuautitlán (zona 1) y Central de Abastos de Ciudad de México (zona 2).	62



---

	Páginas.
Figura 22. Contenido de grasa de las botanas (pepita cruda, con cáscara, salada y en botana) comercializados en Cuautitlán (zona 1) y Central de Abastos de Ciudad de México (zona 2).	63
Figura 23. Contenido de grasa dulces (pepita garapiñada, en jamoncillo y palanqueta) comercializados en Cuautitlán (zona 1) y Central de Abastos de Ciudad de México (zona 2).	63
Figura 24. Contenido de grasa del mole y del pipián comercializados en Cuautitlán (zona 1) y Central de Abastos de Ciudad de México (zona 2).	64
Figura 25. Acidez titulable de la pepita verde de calabaza y sus productos comercializados en la zona de Cuautitlán (zona 1) y Central de abastos de la Ciudad de México (zona 2).	67
Figura 26. Análisis sensorial de la pepita cruda (A) y la pepita con cáscara (B) comercializada en Cuautitlán (zona 1) y la Central de Abastos (zona 2).	72
Figura 27. Análisis sensorial de la pepita salada (A) y la pepita en botana (B) comercializada en Cuautitlán (zona 1) y la Central de Abastos (zona 2).	73
Figura 28. Análisis sensorial de la pepita garapiñada (A), en jamoncillo (B) y en palanqueta (C) comercializada en Cuautitlán (zona 1) y la Central de abastos (zona 2).	74
Figura 29. <i>Alternaria</i> .	80
Figura 30. <i>A. clavatus</i> .	81
Figura 31. <i>Aspergillus flavus</i> .	81
Figura 32. <i>Aspergillus niger</i> .	81
Figura 33. <i>Fusarium</i> .	81
Figura 34. <i>Penicillium</i> .	82
Figura 35. <i>Rhizopus</i> .	82
Figura 36. <i>Alternaria</i> .	82
Figura 37. <i>Aspergillus clavatus</i> .	83
Figura 38. <i>Aspergillus flavus</i> .	83
Figura 39. <i>Aspergillus niger</i> .	83



	Páginas.
Figura 40. <i>Fusarium</i> .	83
Figura 41. <i>Penicillium</i> .	84
Figura 42. <i>Rhizopus</i> .	84
Figura 43. Cromatógrama de las muestras estudiadas.	87
Figura 44. Diagrama de proceso de mole verde elaborado artesanalmente.	91
Figura 45. Almacenamiento de la materia prima.	90
Figura 46. Cernidor de materias primas para la elaboración de mole.	92
Figura 47. Tostador cilíndrico para el ajonjolí.	92
Figura 48. Perejil y cilantro picados para elaboración de moles.	92
Figura 49. Molienda de los ingredientes en un molino de discos.	93
Figura 50. Molino de discos.	94
Figura 51. Cernidores.	94
Figura 52. Utensilios utilizados en la molienda.	94
Figura 53. Bandejas de aluminio.	95
Figura 54. Árbol de decisiones.	103
Figura 55. Mezcla de la muestra.	119
Figura 56. Filtración de la muestra.	119
Figura 57. Filtración en columnas.	120
Figura 58. Filtración en columnas (2).	120
Figura 59. Arrastre de las aflatoxinas.	120
Figura 60. Aplicación de la solución reveladora.	121
Figura 61. Fluorometro Aflates	121



**RESUMEN**

En el presente trabajo se realizó un estudio de inocuidad de los productos a partir de la pepita verde de calabaza elaborados artesanalmente en México, que permitan evitar problemas de salud pública.

Las zonas de Cuautitlán y la Central de Abastos de la Ciudad de México fueron seleccionadas y se tomaron muestras de: pepita verde de calabaza, con cáscara, salada, en botana, garapiñada, en palanqueta (pepitoria), en jamoncillo, en mole y pipián.

Posteriormente, se realizaron pruebas físicas, químicas y sensoriales a las muestras. Las muestras no tuvieron una humedad superior al 14 % (humedad crítica). Los resultados de pH y acidez que presentaron los productos favorecieron la presencia de hongos. La calidad microbiológica que presentaron los productos procedentes de las dos zonas fue mínima. Se realizó cuenta de microorganismos como: mesófilos aerobios, coliformes totales y hongos, estos últimos se aislaron y se purificaron para la identificación macroscópica y microscópica encontrándose especies de: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Alternaria* y *fusarium*.

Todos los productos mostraron aflatoxinas en un rango de 1 a 205 ppb, sin embargo, solamente los siguientes productos rebasaron los niveles permitidos por la Norma de Oficial Mexicana, de la zona I: pepita salada 86 ppb, mole 24 ppb; y de la zona II: botana y la palanqueta con 205 ppb. Además, se identificaron las aflatoxinas presentes en las muestras de estudio encontrándose la presencia de aflatoxina G<sub>2</sub>.

Se realizó un estudio de campo (San Pedro Atocpan) en una microempresa dedicada a la elaboración artesanal del mole verde para ver las posibles fuentes de contaminación y así realizar una propuesta para minimizar los peligros en la contaminación del producto y evitar problemas de salud pública.

Se concluye que las condiciones de almacenamiento, las características químicas, y mal manejo durante su comercialización hacen que algunos de los productos elaborados artesanalmente sean un riesgo potencial para la salud pública.



---

# INTRODUCCIÓN

---





### 1. INTRODUCCIÓN.

La pepita verde de calabaza es utilizada y consumida tanto en la comida mexicana tradicional (mole verde, pipián, aceites y salsas), en dulces típicos (dulce de palanqueta, jamoncillo, dulce con oblea), en botanas (pepita horneada, salada ó frita). Estos productos se comercializan en distintos lugares como son: restaurantes, mercados, centros comerciales, en puestos ambulantes y en ferias. Lamentablemente la materia prima (pepita verde de calabaza) no siempre se encuentra en condiciones de almacenamiento adecuados ya que ésta puede provenir de diferentes lugares desde el campo, la central de abastos y en los mercados, lugares en donde no se tiene un control de la humedad, contaminación de insectos, heces de ratas entre otros, esto puede ocasionar una contaminación severa ya que podemos contraer enfermedades llamadas ETAs (Enfermedades transmitidas por los alimentos) (Orihuel *et al.*, 2003).

Es perfectamente conocido que diversos agentes patógenos y toxigénicos se transmiten por los alimentos. La contaminación de los alimentos con estos agentes pueden tener lugar desde la granja, durante su industrialización, durante su preparación en servicios de comida colectiva o en el hogar, por ello un alimento puede parecer completamente normal, y estar contaminado por bacterias, hongos o compuestos tóxicos (Howard, 1986; Forsythe, 2003).

Los cereales y las semillas están sujetos a la invasión de hongos y consecuentemente a la contaminación por micotoxinas. Por este motivo, se debe tener un conocimiento amplio de los efectos tóxicos que causan los metabolitos producidos por hongos en los seres humanos, en los animales y en las plantas. Cada día se está en continuo estudio sobre inocuidad alimentaria y cada vez se cuenta con mayor información (Santos, 1999).

Se sabe que el 30% de las cepas de *Aspergillus flavus* producen aflatoxinas y éste se aísla en el suelo, encontrándose tanto en las plantas vivas y muertas, como animales de todo el mundo. El descubrimiento de la toxicidad en hígado y actividad cancerígena de la aflatoxina producida por *Aspergillus flavus* ha demostrado que basta con una pequeña contaminación de los alimentos por hongos para hacerlos inadecuados no sólo para el hombre sino también para los animales (Hayes, 1993; Linder, 1995).



## INTRODUCCIÓN

---

---

La pepita verde de calabaza puede adquirir o tener aflatoxinas que son consideradas como el carcinógeno más potente producido en la naturaleza. Estos tóxicos son considerados mutagénicos, teratogénicos y hepatotóxicos para muchas especies vivas incluyendo los humanos, y se debe proteger al máximo, evitando su consumo o contacto con estas micotoxinas. La producción de aflatoxinas es considerada casi inevitable por encontrarse estos hongos esparcidos en todo el mundo y encontrar fácilmente las condiciones ideales para su producción, especialmente en países tropicales y subtropicales. Además estos metabolitos no pierden su toxicidad ni por tratamiento térmico, ni por acción de enzimas del sistema digestivo (Santos, 1999; Bolet y Socarrás, 2005).

En febrero de 2005 en Purina Venezuela, se presentaron problemas de contaminación en productos, ya que el maíz ingrediente de Dog Chow y Cat Chow alimento de mascotas se encontraba contaminado por aflatoxinas y causó muerte a perros, la intoxicación se produjo por la presencia de un hongo tóxico en una de sus plantas industriales.

La FAO ha estimado recientemente que el 25% de las reservas de grano del mundo están contaminadas por micotoxinas (García, 2005).

En la India, EEUU y Kenia se encontraron brotes de aflatoxicosis provenientes del maíz. En 1974 en el noreste de la India alrededor de 150 poblaciones de los estados de Gujarat y Rajastán se tuvieron una serie de lluvias que afectó la cosecha de maíz. Posteriormente se encontró en este maíz presencia de aflatoxinas en un rango de 6 a 15  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ . Los primeros síntomas de la enfermedad aparecieron a las pocas semanas de la cosecha y hasta llegaron a morir perros de la aldea con los mismos síntomas. La ingesta de la aflatoxina B<sub>1</sub> pudo ser de hasta 55  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  de peso corporal (Peraica *et al.*, 1999; Soriano, 2007).

Tanta es la preocupación por los efectos que pueden causar estas micotoxinas que se han realizado estudios en diferentes productos tales como: pescado, cerdo, cacahuates, pimienta roja, maíz, trigo, centeno, y algunos frutos secos, entre otros productos (FAO, 2003).



## *INTRODUCCIÓN*

---

---

Por dicha razón es de gran importancia identificar los hongos y cuantificar las micotoxinas que son producidas por estos microorganismos en los alimentos, puesto que al establecer la cuenta de estos microorganismos y metabolitos, permite su utilización como un indicador de prácticas sanitarias inadecuadas durante la producción y el almacenamiento de los productos, así como el uso de materia prima inadecuada.

La ingestión de un producto contaminado, que contenga cantidades suficientes de sustancias venenosas o de dichos microorganismos que son patógenos, será una causa de alerta para la salud pública. Cualquier alimento apto para el consumo humano debe ser inocuo, esto implica la seguridad de que lo que consumimos no provoca ninguna enfermedad ni daño a los consumidores (Ducar, 1991; ONU, 2002).

El objetivo del presente estudio fue evaluar la inocuidad de productos a base de la pepita verde de calabaza elaborados artesanalmente, procedentes de Cuautitlán y la Central de Abastos de la Ciudad de México que permita evitar problemas en la salud pública.



# ANTECEDENTES





### 2. ANTECEDENTES.

#### 2.1 Generalidades de la comida y dulces mexicanos.

La cocina mexicana ocupa uno de los primeros lugares entre las gastronomías por su excepcional riqueza y la inmensa variedad de sus ingredientes. Su originalidad está íntimamente ligada a su historia, ya que es resultado de la fusión de dos grandes culturas, la mesoamericana y la española. Sus orígenes se remontan al período prehispánico, a la llamada Cultura del Maíz, ya que en torno a él y complementado con chiles, calabazas, carne de conejo, armadillo y guajolote se elaboraban los más variados platillos, que alcanzarían en ocasiones un carácter ritual al constituir una de las principales ofrendas a los dioses y muertos. A pesar de que los aztecas vivieron rodeados de lagos, su alimentación estuvo constituida en un 75% por organismos terrestres. Dentro de ese porcentaje también incluían diferentes especies de insectos que abundaban en su entorno. Algunas especies se asaban o freían, otras se guisaban con ciertos condimentos y otras se preparaban en tamales o mixiotes (Robles, 2000).

Los chiles enogada, los moles y pipianes son prehispánicos, sin embargo en el siglo XIX las religiosas los adecuaron integrándoles semillas: almendras, nueces, cacahuates éstos últimos que a pesar de ser prehispánicos no se utilizaban en alimentos (Alfaro, 2002). En el México prehispánico había una gran variedad de alimentos elaborados con chiles de diferentes tipos; las salsas con este ingrediente eran parte del menú mexicana. Los aztecas preparaban para los grandes señores un platillo llamado mulli, que era una especie de potaje o mezcla muy compleja que incluía, entre otros ingredientes, chocolate y varias clases de chiles. Tras la llegada de los españoles, a partir del siglo XVI surgió una amplia gama de recetas culinarias, resultado de la fusión de dos culturas, la española y la indígena. Gran parte del éxito de la cocina mexicana se debió al gusto que los indígenas tomaron por las especias que trajeron los españoles del viejo continente, integrándolas al tradicional mulli. Así nació una inigualable propuesta mestiza: el mole. El origen del mole se pierde en la leyenda o se ubica en las grandes cocinas de los conventos poblanos de la Colonia. En dichos conventos se fortaleció y perfeccionó el arte culinario mexicano, pues se agasajaba frecuentemente a las grandes personalidades civiles y religiosas del Virreinato. Allí se disfrutaron por primera vez muchos de los platillos que a la postre dieron fama mundial a la Cocina Mexicana. El más famoso es el Mole Poblano (Fig. 1), creado



en 1680 en la cocina del Convento de Santa Rosa. Se cuenta que, con motivo de la visita del Virrey de la Nueva España, la monja dominica Sor Andrea de la Asunción tenía que agasajarlo con un guiso de su invención. Por orden del obispo Manuel Fernández de Santa Cruz, se creó un plato tan especial que el Señor Virrey quedara asombrado. La Real Academia Española, la palabra mole se deriva del vocablo nahua *mulli*, que significa salsa (González, 2007).



**Figura 1. Mole poblano.**  
**Fuente: González (2007).**

Por otra parte, la dulcería es una añeja tradición mexicana con raíces tanto autóctonas como hispanas ya que están hechos a base de los más variados elementos como frutas, nueces, semillas, cactáceas, etcétera. Por ejemplo, las alegrías hechas a base de semillas de amaranto; las pepitorias (elaboradas con pepita de calabaza); las palanquetas (hechas con nuez o con cacahuate); macarrones de leche azucarada; las cocadas; los variados dulces de leche; los jamoncillos de pepita. Los conventos virreinales son la base de la cocina mestiza, la mayoría de dulces típicos que se conocen actualmente fueron ideados por monjas (Sánchez y Barona, 1994; Alfaro, 2002).

### **2.1.1 Elaboración y definición de dulces típicos.**

Un dulce típico es aquél alimento elaborado de forma artesanal, azucarado y a base de algún fruto seco o semilla oleaginosa. El actual dulce tradicional mexicano tiene el encanto de su sabor matizado por múltiples ingredientes, pero tiene también, como valor agregado, su belleza en formas, texturas y colores. En la tabla 1 se muestran los dulces a base de la pepita verde de calabaza (Martínez, 2003).



El proceso de elaboración de la mayoría de dichos dulces se realiza de manera artesanal.

**Tabla 1. Dulces típicos.**

<b>Dulce</b>	<b>Definición</b>	<b>Ingredientes.</b>
Pepitoria.	Producto elaborado a base de semilla de calabaza tostada entrelazada con piloncillo y azúcar.	Pepita verde de calabaza. Piloncillo. Azúcar.
Jamoncillo.	Producto elaborado a base de la pepita verde de calabaza molida, mezclada con leche y azúcar.	Pepita verde de calabaza. Leche. Azúcar.
Pepita garapiñada.	Producto elaborado a base de pepita verde de calabaza encapsulada con azúcar y piloncillo.	Pepita verde de calabaza. Agua. Azúcar. Piloncillo.

En las figuras 2, 3 y 4 se muestran los procesos de elaboración de la pepitoria, jamoncillo y pepita garapiñada.

### **2.1.2 Elaboración y definición de botanas.**

Las botanas mexicanas son una tradición que se practica en el día a día. En México se acostumbra saborear ricas botanas mexicanas para abrir el apetito. Las botanas mexicanas pueden ser disfrutadas antes de los alimentos, en reuniones con amigos y/o familiares, o simplemente en algún momento de antojo (tabla 2). En las figuras 5, 6 y 7 se muestran los procesos de elaboración de botanas a base de la pepita verde de calabaza.

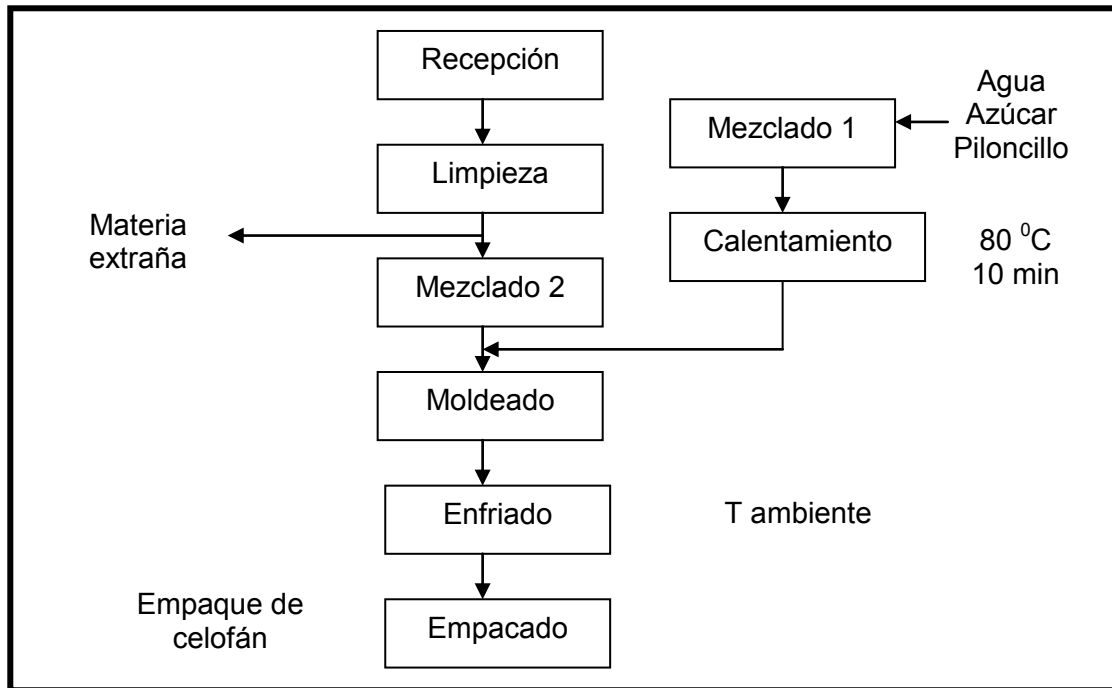


Figura 2. Diagrama de proceso de la elaboración de la pepitoria.  
Fuente: Elaborado a partir de Profeco (2004).

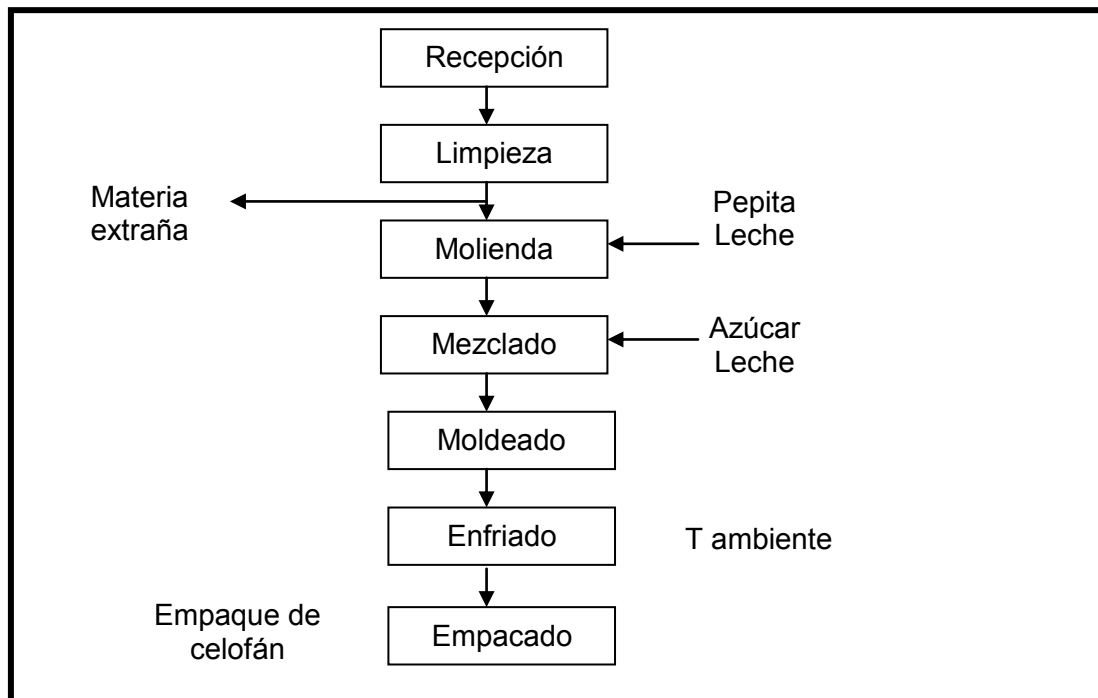


Figura 3. Diagrama de proceso de la elaboración del jamoncillo.  
Fuente: Elaborado a partir de Profeco (2004).



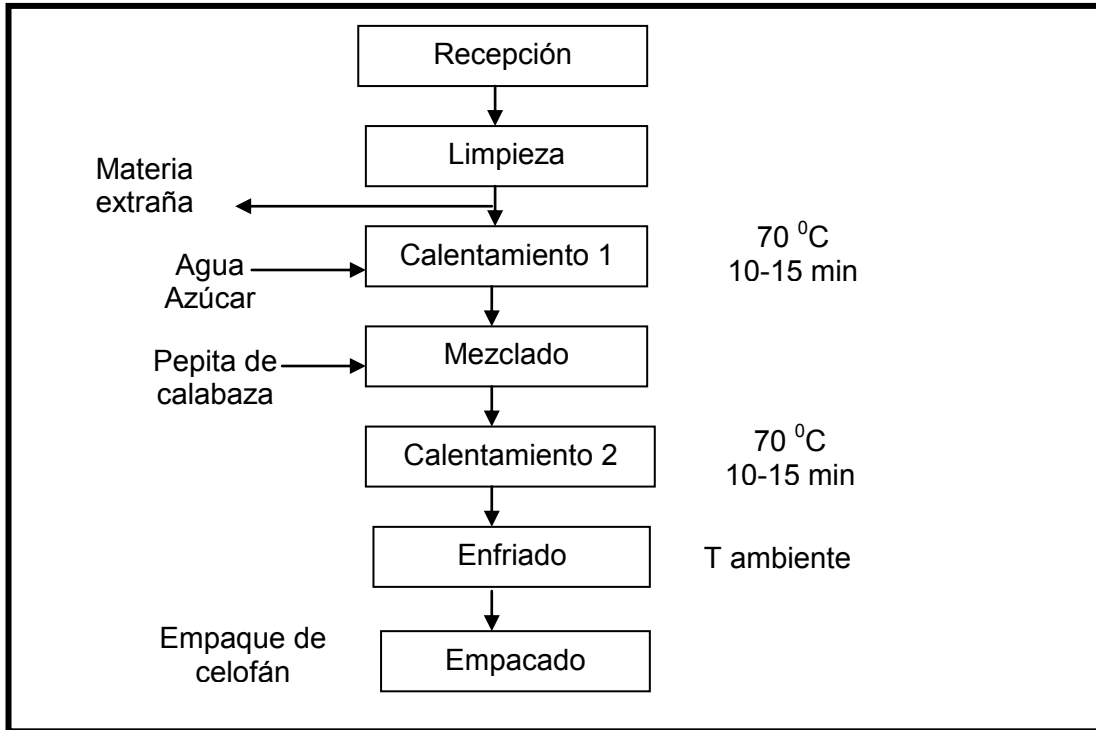


Figura 4. Diagrama de proceso de la elaboración de la pepita garapiñada.

Fuente: Elaborado a partir de información oral (feria nacional del mole en San Pedro Atocpan) y de Profeco (2004).

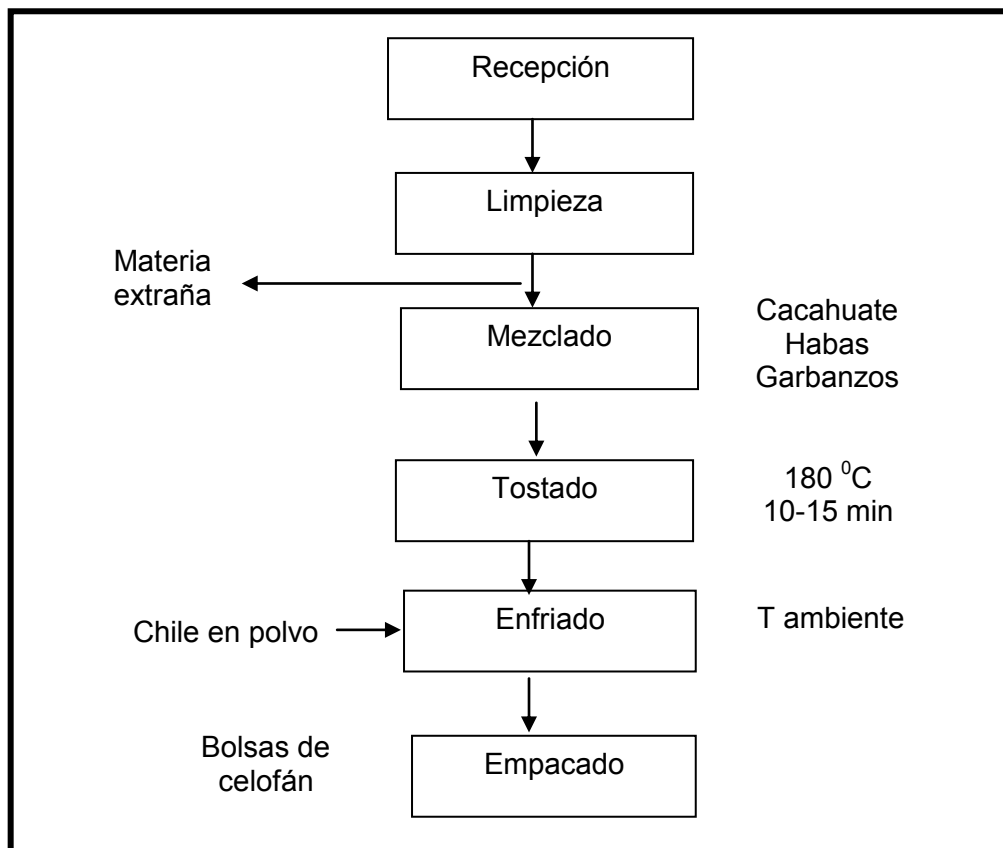
Tabla 2. Botanas a base de la pepita verde de calabaza.

Botana	Definición	Ingredientes.
Pepita con cáscara	Producto elaborado con la pepita de calabaza con cáscara tostada y condimentada con sal	Pepita verde de calabaza con cáscara. Sal.
Pepita salada.	Producto elaborado a base de pepita verde tostada y condimentada con sal	Pepita verde de calabaza. Sal.



**Tabla 2. Botanas a base de la pepita verde de calabaza (Continuación).**

<b>Botana</b>	<b>Definición</b>	<b>Ingredientes.</b>
Pepita en botana.	Producto elaborado a base de una mezcla de semillas como cacahuates, pepitas, habas, garbanzo adicionando chile en polvo	Pepita verde de calabaza. Cacahuates. Habas. Garbanzo. Chile en polvo.



**Figura 5. Diagrama de proceso de la elaboración de la pepita en botana.**  
Fuente: Elaborado a partir de información oral.

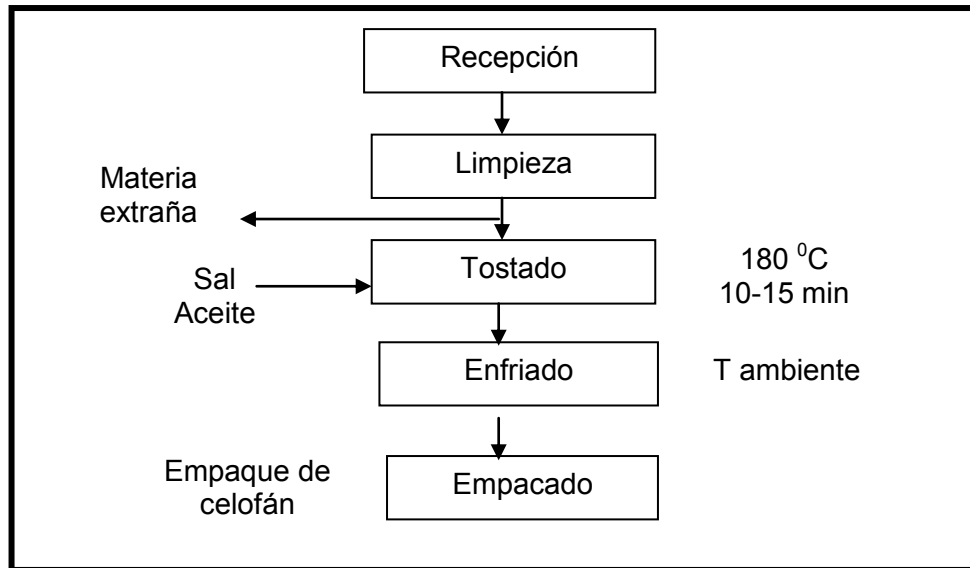


Figura 6. Diagrama de proceso de la elaboración de la pepita con cáscara.  
Fuente: Elaborado a partir de información oral.

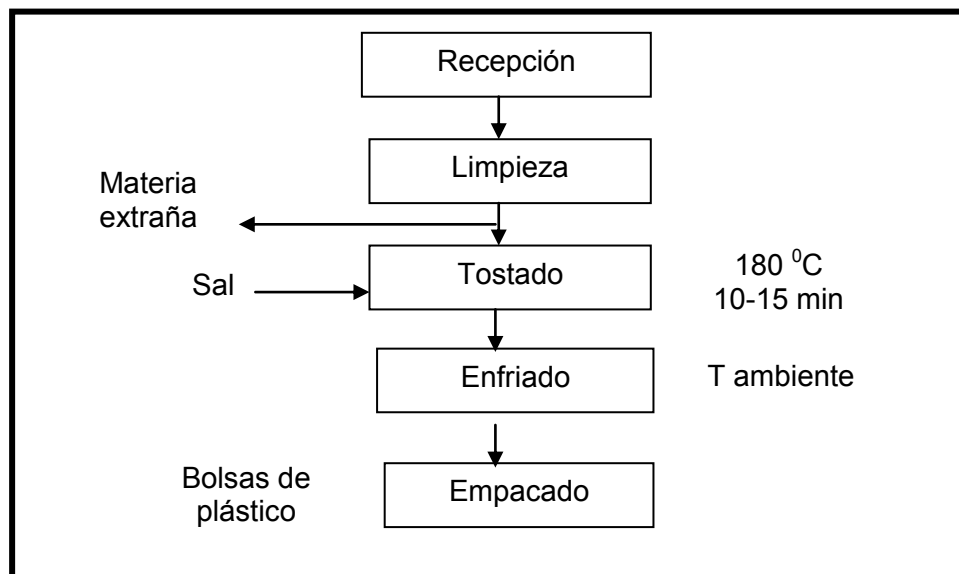


Figura 7. Diagrama de elaboración de la pepita salada.  
Fuente: Elaborado a partir de información oral.

### 2.1.3 Mole y pipián.

El término mole referencia varios platillos de la cocina mexicana. La palabra mole es de origen náhuatl, viene del término molli o mulli y en su acepción original hace referencia a cualquier salsa, aunque en su significado actual se refiere específicamente a un grupo de



platillos que tienen algunos elementos en común, como el hecho de ser a base de carnes o aves, preparados en salsas que pueden ser relativamente simples, hasta bastante complejas en su elaboración (Serrano, 2007) (Tabla 3).

**Tabla 3. Mole y pipián a base de la pepita verde de calabaza.**

Alimento.	Definición.	Ingredientes.
Mole verde.	Producto alimenticio de color y aspecto variable según su composición, que contiene como ingredientes básicos: chiles, agua, aceites y/o grasas comestibles, harinas, féculas, almidones, sal, especias, condimentos, así como otros ingredientes opcionales (cacao, chocolate, cacahuate, nueces, pasas, almendras, avellanas, tortillas, pan, consomé, jitomate y plátano macho). (MNX-F-422-1982) (apartado 5.6.2).	Pepita verde de calabaza. Galletas. Cilantro, perejil. Chiles.
Pipián.	Producto alimenticio de color y aspecto característico, con especias, chiles, semillas de calabaza y grasa.	Pepita verde de calabaza. Chiles. Especias. Grasa.

En la figura 8 se muestra el proceso de elaboración del pipián.

## 2.2 Pepita de Calabaza.

La Calabaza pertenece a la familia de las *Cucurbitaceas*, dentro de ella, se destaca cinco variedades (Saade y Montez , 2002)

- ❖ *Cucurbita argyrosperma* Huber,
- ❖ *C. Ficifolia* Bouche,
- ❖ *C. Moschata* (Duchesne ex Lam.) Duchesne ex Poir.,
- ❖ *C. Maxima* Duchesne ex Poir.,
- ❖ *C. pepo* L.



En este proyecto se trabajó con la variedad *Cucurbita pepo* (Fig. 9).

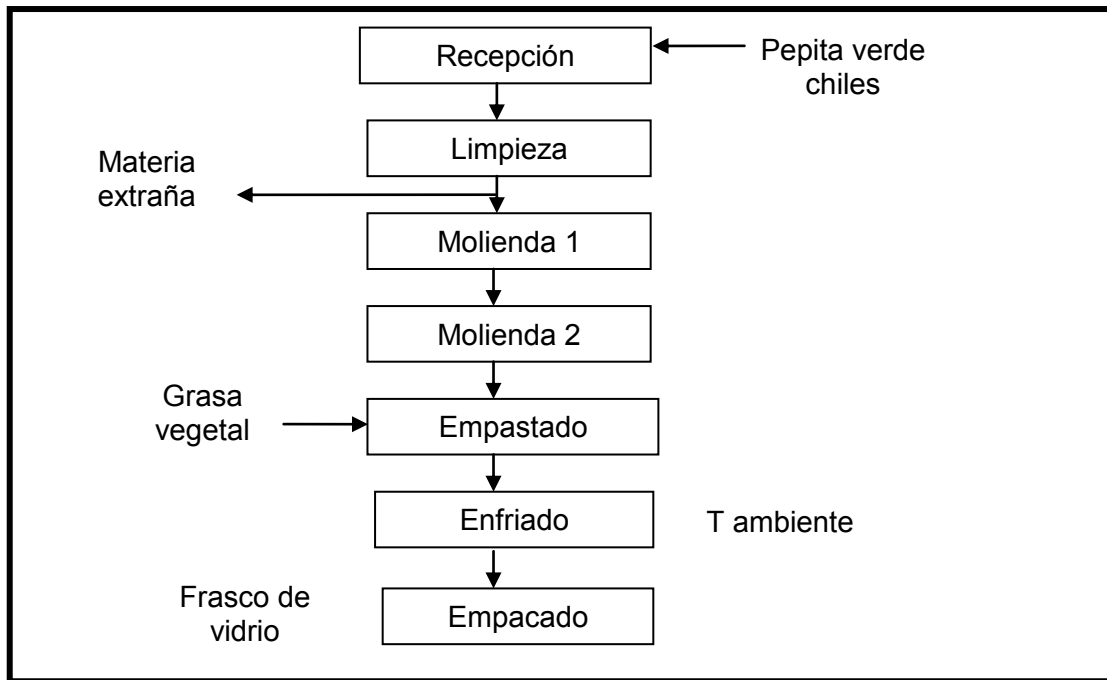


Figura 8. Diagrama de proceso de elaboración del piñón.  
Fuente: Elaborado a partir de Profeco (2004).



Figura 9. Pepita de Calabaza (*Cucurbita pepo*)  
Fuente: Saade y Montez (2002).

Las semillas son el producto más importante, principalmente por su alto contenido de aceite (39 %) y proteína (44 %), y su consumo en zonas urbanas de México y otros países de América Central es bastante común. Contiene ácido linoleico que puede proporcionar bajos niveles de colesterol. Ayuda al metabolismo celular y, en caso de sobrepeso, ayuda a perder grasa corporal. La necesidad diaria de ácido linoleico es de 6 a 10 gramos y debe



ser consumido a través de la alimentación. También es bueno para problemas de la próstata y para los músculos de la vejiga. Contiene minerales como: fósforo, calcio potasio, magnesio, hierro, zinc; vitaminas A, B, y E (FAO, 1993; Instituto Nacional de Nutrición, 1996).

### 2.2.1 Composición química.

La composición química de las semillas (Fig. 10) está determinada por varios factores tales como la genética, los factores ambientales, el tipo de suelo (la presencia de los nutrientes minerales y clima). Se puede hablar por un lado de un conjunto de compuestos que está presente en todos los tejidos y por el otro de un conjunto de compuestos de almacenamiento de reserva. En la tabla 4 se muestra la composición química de la pepita de calabaza.

Como se puede observar la pepita verde de calabaza contiene tanto en proteína y en grasa casi el 50 % de su composición química, por ello se debe tener en buenas condiciones de almacenamiento debido a que la grasa puede sufrir enranciamiento. Y el contenido de humedad es muy bajo, esta semilla no debería tener problemas de contaminación por hongos.



Figura 10. Pepita verde de calabaza (*Cucurbita Pepo*).

### 2.3 Alteraciones en los alimentos.

El deterioro de los alimentos puede originarse por el ataque de insectos y otros animales (roedores), acción de enzimas, reacciones químicas, acción de agentes físicos, proliferación y acción de microorganismos (Cheftel, 1999).



**Tabla 4. Composición química de la pepita verde de calabaza.**

<b>Componente</b>	<b>%</b>
Humedad	4.3
Proteína	36.9
Grasa	44
Carbohidratos.	10
Cenizas	4.8

Fuente: Instituto Nacional de la Nutrición (1996).

La ingestión de un producto contaminado, que contenga cantidades suficientes de sustancias venenosas o de dichos microorganismos que son patógenos, será una causa de alerta para la salud pública. Cualquier alimento debe de ser inocuo y ser apto para el consumo humano y esto implica la seguridad de lo que consumimos no provoque alguna enfermedad y tener perjuicio a los consumidores. Es muy importante separar un alimento que esté descompuesto o que no sea apto para el consumo humano (Ducar, 1991; ONU, 2002).

La contaminación puede producirse en cualquier momento desde su cosecha, pasando por la elaboración a nivel industrial, hasta cuando se prepara la comida en el hogar. La contaminación puede ser:

❖ Física.

Consiste en la presencia de cuerpos extraños en el alimento. Estos son en general mezclados accidentalmente con el alimento durante la elaboración por ejemplos vidrios, metales, polvo, fibras, pelos, entre otros.

❖ Química.

Se debe a la presencia de elementos o sustancias químicas provenientes de desechos de actividades humanas, de la adición deliberada de sustancias a los alimentos, o sustancias



tóxicas de origen natural, que convierten a un alimento en peligroso para la salud como residuos de algún medicamento en animales, pesticidas, aditivos (Brownsell *et al.*, 1993)

❖ **Biológica.**

El deterioro por la acción microbiana es la causa más significativa en los alimentos ya que el crecimiento de estos organismos en los alimentos puede llevar a una posible producción de toxinas o venenos. Esta alteración puede deberse a la presencia de bacterias, hongos, virus y levaduras (Brownsell *et al.*, 1993; Rumbado y Aluffi, 2004).

### **2.4 Enfermedades transmitidas por alimentos.**

Las enfermedades transmitidas por los alimentos causadas por peligros microbiológicos constituyen un problema de salud pública importante y creciente.

La mayoría de los países que cuentan con sistemas para la notificación de casos de enfermedades transmitidas por los alimentos han documentado durante las últimas décadas aumentos significativos en la incidencia de enfermedades causadas por microorganismos en los alimentos (FAO, 2002).

Un brote por ETAs se da cuando dos o más personas sufren una enfermedad similar después de ingerir un mismo alimento y los análisis epidemiológicos señalan al mismo como el origen de la enfermedad. Las enfermedades transmitidas por los alimentos es causada por la contaminación física, química o biológica del alimento que provocan una tasa elevada de fallecimientos (Nicholas, 1999).

La intoxicación alimenticia es un tipo de enfermedad, que puede ser ligera o severa, que va desde una irritación en la piel, hasta provocar vómitos, diarreas, entre otros. Esta suele ser causada por bacterias, virus o toxinas presentes naturalmente en peces o vegetales (Nicholas, 1999).

### **2.5 Micotoxinas.**

La alimentación humana y animal se basa en el consumo de granos y sus derivados, estos son frecuentemente invadidos por hongos, causando diferentes problemas, entre ellos la contaminación con sustancias tóxicas, las micotoxinas (Moreno, 1988).





Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos por diferentes géneros y especies de hongos, dentro de los cuales los principales son *Aspergillus spp.*, *Fusarium spp.* y *Penicillium spp.*, éstos colonizan y contaminan sustratos que son utilizados en la alimentación humana y animal, se estima que el 25 % de la producción mundial de cereales se encuentra contaminada. Las micotoxinas son de bajo peso molecular y son sustancias tóxicas que se originan por el crecimiento del hongo sobre productos (Duarte-Vogelt y Villamil, 2006; Bolet y Socarrás 2005)

Los más susceptibles al ataque de micotoxinas son: el cacahuate, maíz, trigo, cebada, avena, sorgo, arroz, almendra, frijoles, semillas de algodón, girasol, soya, seguidos de frutos secos, frutas deshidratadas, leche y productos lácteos, hierbas, especias, café, cacao, piensos, aceites vegetales, cerveza entre otros; produciendo daño en el organismo del animal y humano, por lo general, suelen formarse en la etapa final de la fase exponencial o al principio de la fase estacionaria del crecimiento del hongo como se muestra en la figura 11 (Bolet y Socarrás, 2005; Soriano, 2007).

Los hongos pueden generarse desde el campo o bien después de la cosecha en el almacenamiento o en el procesamiento de los alimentos. Debido a su amplio rango de efectos tóxicos, las micotoxinas pueden causar severas pérdidas económicas a los productores pecuarios y representan un riesgo para los consumidores de los alimentos que se obtengan de estas explotaciones pecuarias. Por lo tanto, se hace necesario realizar ensayos rutinarios para tener idea del nivel de contaminación por estas toxinas (Medina y Castillo, 2003).

Muchas de las micotoxinas provocan lesiones graves en un sólo tejido o en varios y determinan efectos secundarios en otros tejidos (Derache, 1990).

Existen alrededor de 150 especies de hongos que son capaces de producir micotoxinas cuando se desarrollan en condiciones favorables. En el año de 1977 la FAO reportó las micotoxinas de mayor importancia: aflatoxinas, ocratoxinas, citrinina, zearalenona, patulina, tricotecenos y esyerigmatocistina (Bolet y Socarrás, 2005).



Es importante hacer un análisis detallado y meticuloso de los alimentos sospechosos. Los efectos tóxicos con bajos niveles de contaminación puede tardar varias semanas en aparecer (Perusia y Rodríguez, 2001).

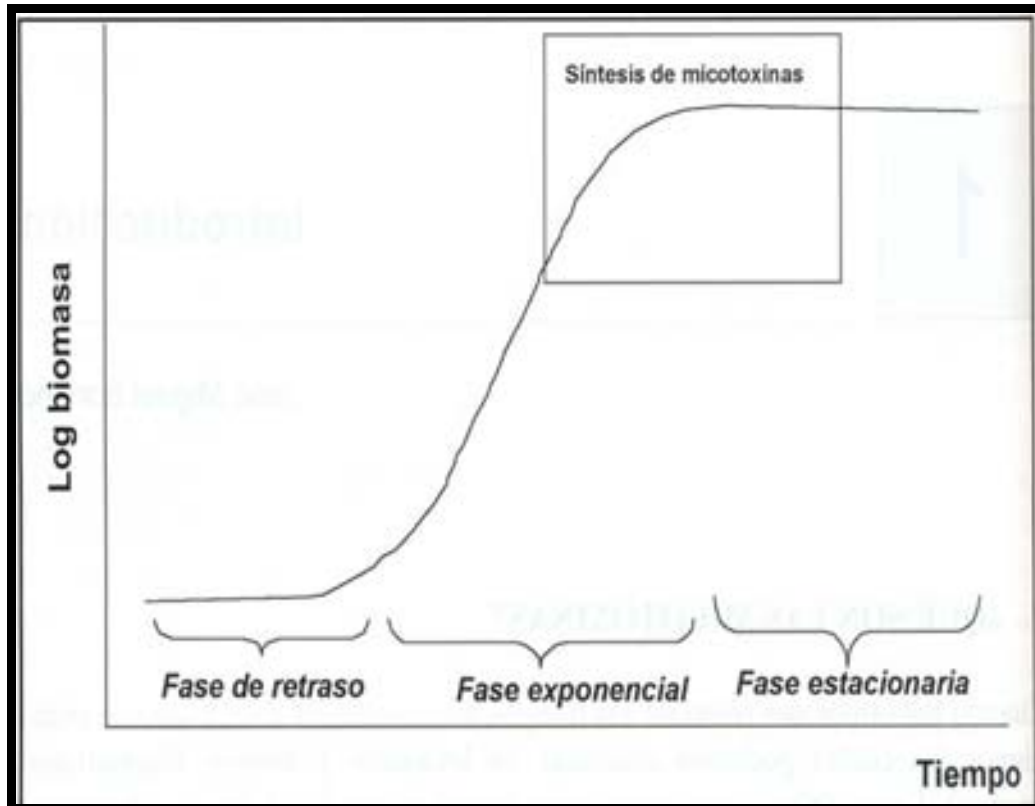


Figura 11. Fases de crecimiento fúngico y localización de la síntesis de micotoxinas

FUENTE: Soriano (2007).

### 2.5.1 Principales micotoxinas y su clasificación.

Las micotoxinas más estudiadas y al mismo tiempo, con una acción conocida en mamíferos y peces son: aflatoxinas, ocratoxina A, patulina, ácido penicilínico, citrinina, zearanelona, alcaloides de ergot y tricotecenos. Su efecto ya conocido en mamíferos hace que su presencia en los alimentos y en los piensos pueda ser importante (Castro, 1994).

En la tabla 5 se resumen los principales metabolitos tóxicos producidos por hongos comunes en la contaminación de los alimentos y en la tabla 6 se muestra la clasificación general de las micotoxinas.



**Tabla 5. Algunos de los principales metabolitos tóxicos producidos por hongos contaminantes de los alimentos.**

Hongos	Principal metabolito tóxico
<i>Aspergillus flavus</i>	Aflatoxinas B, M, G; ácido kojico
<i>A. parasiticus</i>	Aflatoxinas B, M
<i>A. ochraceus</i>	Ocratoxina A
<i>Fusarium tricenectum</i>	T-2 toxina
<i>F. roseum</i>	T-2 toxina
<i>F. moniliforme</i>	Fumonisinias (F-2 toxina)
<i>Gilerella zeac</i>	2-Deoxinivalenol (Don)
<i>Penicillium viridicatum</i>	Ocratoxina A
<i>P. vyclopium</i>	Ocratoxina A

Fuente: Carrillo (2003).

**Tabla 6. Clasificación general de micotoxinas.**

Micotoxina	Clase
Aflatoxina	B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> , G <sub>2</sub> , M <sub>1</sub> , M <sub>2</sub> ,
Ocratoxinas	A, B, C, A metil éster, B metil éster, B etil éster, 4-hidroxi ocratoxina A
Fumonisinias	B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , B <sub>3</sub> , B <sub>4</sub> , C <sub>1</sub> , C <sub>2</sub> , C <sub>3</sub> , C <sub>1</sub> , P
Patulina	Patulina.
Zearalenona	α-zearalenol, α-zearalanol, β-zearalenol, β-zearalanol
Otras	T-2, TH-2, Citrina, ácidonciclopiazónico, deoxinivalenol

Fuente: Soriano (2007).



El autor japonés Yoshio Ueno, ha clasificado a las toxinas más importantes de acuerdo con su afinidad con los organelos celulares, definiendo entonces, características toxicológicas y transformaciones. Según este criterio las micotoxinas se clasifican en (Castro, 1994):

- ❖ Inhibidores de la producción de energía. Actúan inhibiendo la actividad de los adenosintrifosfatasa (ATPasa), inhibiendo en consecuencia, la fosforilación oxidativa celular. Ej.: citreoviridinas; luteoskirina, ergocromos.
- ❖ Modificadores de citoesqueleto. Actúan modificando las funciones de los microfilamentos y microtúbulos celulares. Ej.: griseofulvina, citocalasinas, cloropeptido.
- ❖ Inhibidores de síntesis de proteínas: Actúan inhibiendo ya sea al inicio de la síntesis, tricotecenos tipo I (ej.: verrucarina A, fusarenona-X, nivalenol, etc.), o inhibiendo la elongación y término de la proteína, tricotecenos tipo ET (ej.: deoxinivalenol, crotocina, verruvarol, etc.). Otras micotoxinas inhiben en forma competitiva la actividad de la fenilalanil-t RNA sintetasa (ej.: Ocratoxina A).
- ❖ Micotoxinas estrogénicas. Provocan respuestas de crecimiento de masa en el útero y de alteración de niveles circulantes de hormonas. Ej.: zearalenona.
- ❖ Generadores de temblor (tremorgenos) Actúan sobre el sistema nervioso central induciendo temblores generalizados en animales. Ej.: penitrem A.
- ❖ Micotoxinas cancerígenas. Provocan desarrollo de tumores en hígado y en corteza renal. Ej.: aflatoxinas, esterigmatocistina.

Los factores que pueden influir en la producción de hongos toxigénicos son (González, 1997):

- ❖ Factores biológicos: son aquellas cosechas compatibles y susceptibles al desarrollo de hongos productores de micotoxinas.
- ❖ Infestación por insectos y pájaros: Tienen influencia en el desarrollo de micotoxinas como la humedad, temperatura y los daños ocasionados por los insectos y pájaros.
- ❖ Cosecha caracterizada por su temperatura, humedad, madurez del grano, daño mecánico, su detección y diversificación.



- ❖ Almacenamiento: Se deben considerar varios factores como la infraestructura, temperatura ambiental, humedad, ventilación, condensación, presencia de insectos o plagas, limpieza, tiempo de almacenaje, detección y movimiento.
- ❖ Procesamiento y distribución: Proceso de removimiento de cáscaras y aceites, condiciones de humedad en el proceso de peletizado, empaque adecuado y pruebas de determinación de presencia de micotoxinas, factor importantísimo para el adecuado control de los niveles de micotoxinas, es el muestreo en los embarques y el análisis de las muestras, siendo los principales puntos críticos en el proceso de la recepción del grano, su movimiento, el lavado de la muestra y la representatividad y peso de la muestra según los estándares oficiales del USDA/GIPS.
- ❖ La formación de micotoxinas depende de la composición del sustrato, la capacidad genética de los hongos para producirlas y de factores ecológicos (Bolet y Socarrás, 2005)

### 2.6 Aflatoxinas

Las aflatoxinas son un grupo de metabolitos tóxicos producidos por *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* y *Penicillium puberulum*. Las mismas se hallan contaminando los granos almacenados, sobre todo cuando éstos están en área de excesiva humedad durante un largo tiempo. Los productos más frecuentemente contaminados son el sorgo, maíz, algodón y maní. Dentro del grupo de aflatoxinas la de mayor importancia en salud pública es la aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), ésta se relaciona con el desarrollo de carcinoma hepatocelular en poblaciones que consumen alimentos contaminados. El cacahuate es el alimento más afectado comúnmente, también se ha descubierto en frutas secas, particularmente en el higo (Duarte-Vogelt y Villamil, 2006 y Nicholas, 1999).

#### 2.6.1 Clasificación.

Las principales aflatoxinas son cuatro: B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> siendo la M<sub>1</sub> y la M<sub>2</sub> derivadas del metabolismo de AFB<sub>1</sub>. La AFB<sub>1</sub> se encuentra en concentraciones mayores con respecto a las otras, y se le considera la más potente, siendo carcinogéna, teratógena, y mutágena. Para identificar a las principales aflatoxinas producidas por el *Aspergillus flavus*, se realiza principalmente por la fluorescencia ya que al tener una excitación con la luz ultravioleta



presentan fluorescencia azul (Aflatoxina B1, B2) o verde (Aflatoxina G1, G2) (Moreno, 1988; Derache, 1990).

### 2.6.2 Factores que afectan la presencia de aflatoxinas

El crecimiento se ve afectado por la termohigrotropía, es decir que responde al estímulo de la temperatura y la humedad relativa de la atmósfera y del sustrato. El crecimiento del hongo se ve favorecido si los granos están dañados por insectos o roedores. Pero, aún en ausencia de estas condiciones, si ya han germinado algunas esporas en el sustrato, se pueden formar "nichos ecológicos" que favorecen el desarrollo de sectores con micelios generadores de aflatoxinas porque al crecer produce agua por respiración aumentando así la humedad de algunas semillas o granos (S.E.C, 2006).

La capacidad de producción de aflatoxinas está condicionada por (Moreno, 1988):

1. El tipo de hongo
2. Las características del sustrato
3. Las condiciones externas tales como humedad, temperatura y luz.
4. La microflora asociada

Las condiciones térmicas para que se produzcan las aflatoxinas son:

12° C temperatura mínima,  
27-30° C la óptima,  
40-42° C la máxima.

*Aspergillus flavus* y el *Aspergillus parasiticus* están considerados como hongos termotolerantes y microtermofílicos. Las temperaturas de crecimiento para *Aspergillus flavus* son:

Mínima de 6- 8° C,  
Óptima de 36-38° C,  
Máxima 44-46° C

La composición química de las aflatoxinas varía con las cepas, el sustrato o materia orgánica sobre el cual crece y las condiciones ambientales del crecimiento del hongo.



### 2.6.3 Estructura química de las aflatoxinas

Todas las aflatoxinas tienen una estructura específica que es la cumarina con dos grupos hidrofuranos en una configuración *cis*. Químicamente las aflatoxinas son derivados difuranocumarínicos. Son estables al calor por lo que se pueden encontrar en alimentos completamente procesados (Fig. 12).

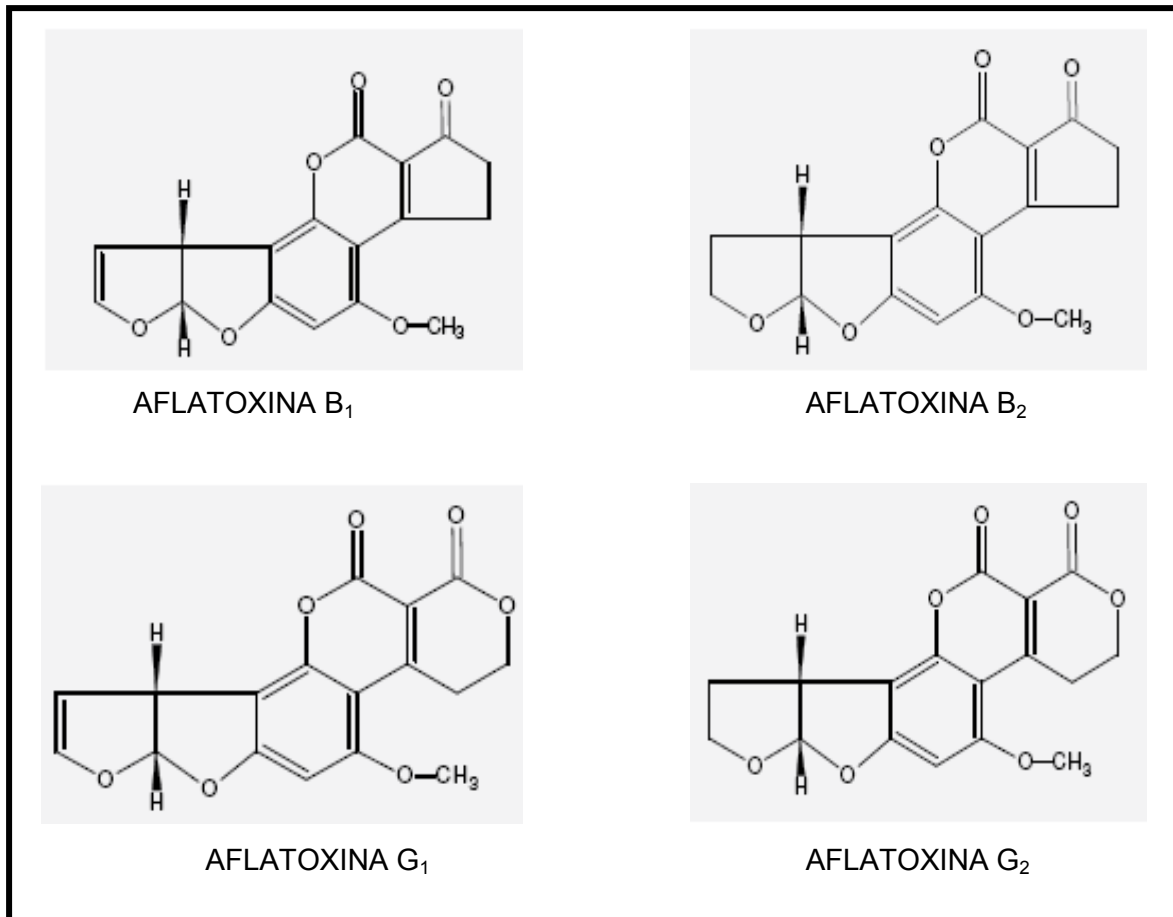


Figura 12. Estructura química de las aflatoxinas.

Fuente: Urrego y Días (2006).

### 2.6.4 Características químicas y físicas de las aflatoxinas.

Las principales características químicas y físicas de las aflatoxinas son las siguientes (Castro y Ahumada, 1994):

- ❖ Baja solubilidad en agua (10–30 µg/ml)



- ❖ Solubles en cloroformo, soluciones acuosas de metano, acetonitrilo, acetona, debido a que los cristales de aflatoxinas no tienen las mismas propiedades de las aflatoxinas naturales.
- ❖ Relativamente inestables al estado de sustancia pura, a la luz y al aire.
- ❖ Susceptibles a la hidrólisis alcalina.
- ❖ Son afectadas al tratarse con amoníaco o con soluciones de hipoclorito de sodio (pH>10.5)
- ❖ Son termorresistentes.
- ❖ Estables en un rango de pH entre 3 y 10.

En la tabla 7 se muestran las propiedades físicas de las aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub>.

**Tabla 7. Propiedades físicas de las aflatoxinas.**

	<b>Forma</b>	<b>Punto de Fusión (°C)</b>	<b>Fluorescencia</b>	<b>UV máx (nm)</b>	<b>Peso Molecular (g/mol)</b>	<b>Formula molecular</b>
B <sub>1</sub>	cristales	268–269	Azul	362	312.06	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>
B <sub>2</sub>	cristales	286–289	Azul	363	314.08	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>
G <sub>1</sub>	cristales	244–246	Verde	362	328.06	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>
G <sub>2</sub>	cristales	237–240	Verde	363	330.07	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>

Fuente: Castro y Ahumada (1994).

### 2.6.5 Toxicidad.

Desde hace siglos el hombre ha utilizado los hongos que se desarrollan en los alimentos para obtener otros alimentos (quesos roquefort) con características organolépticas diferentes al original. No obstante algunos hongos crecen sobre materiales vegetales producen toxinas con efectos indeseables para plantas y animales. Se debe de tener en cuenta que la presencia de micotoxinas en los alimentos puede ser individual o simultánea con otras, lo que puede provocar efectos sinérgicos en su acción sobre el organismo aumentando así su toxicidad (Soriano, 2007).

El estudio de los hongos como tóxicos se inició en los años 60 con una intoxicación masiva que provocó la muerte de 100000 aves de Inglaterra por la ingesta de pienso





preparado con harina de maíz contaminada con *Aspergillus flavus*, detectándose un metabolito altamente tóxico al que denominaron Aflatoxina, que poco tiempo después causó la muerte a 106 personas de 397 que se intoxicaron (Bolet y Socarrás, 2005).

Los efectos tóxicos de las aflatoxinas dependen de las dosis y del tiempo de ingestión. También la especie y la edad son importantes. La dosis letal 50 (DL 50) está establecida en la intoxicación aguda para patos y perros que es, aproximadamente 1 mg/kg. Los efectos adversos pueden afectar a distintos órganos, aparatos o sistemas, siendo el hígado el más afectado sin olvidar que también producen tumores en el riñón, colon y pulmón (Soriano, 2007; Bolet y Socarrás, 2005).

Se ha demostrado una estrecha relación entre la ingesta de aflatoxinas y la aparición de cáncer al hígado en diferentes especies animales. El tóxico puede penetrar a través de la mucosa intestinal sobre todo si es liposoluble (Castro, 1994; Derache, 1990).

La toxicidad de las aflatoxinas se puede clasificar en tres categorías (Adrian *et al.*, 2000):

- ❖ Mutagenicidad: es la capacidad de ciertos factores físicos y de numerosas sustancias químicas para provocar mutaciones en el ámbito celular, es decir, confiere a la célula nuevas características biológicas y metabólicas por modificaciones genéticas
- ❖ Teratogenecidad: son aquellas sustancias que a consecuencia de una exposición inhalatoria, oral, o cutánea pueden producir o aumentar las posibilidades de alguna alteración genética en las células embrionarias.
- ❖ Cancerogenicidad: son aquellas sustancias que a consecuencia de una exposición inhalatoria, oral, o cutánea pueden producir o aumentar las posibilidades de contraer cáncer.

El hombre con una dieta deficiente nutricionalmente es más susceptible a los efectos tóxicos de las aflatoxinas, que pueden ejercerse directamente y provocar toxicosis aguda o toxicosis crónica subletal que tiene como manifestación el cáncer. Estudios recientes reportan aflatoxinas en cerebro y pulmones de niños fallecidos por Kwashiorkor y en niños controles que habían muerto por otras enfermedades. Esto podía deberse a un



desequilibrio metabólico o al fracaso de los mecanismos excretorios en los niños con enfermedades como el sarampión (que precede al Kwashiorkor en 25% de los casos) , insuficiencia renal, estenosis pilórica o gastroenteritis, y a menor depuración de las aflatoxinas en las neuropatías (Bolet y Socarrás, 2005).

Se considera a la aflatoxina B1 como el más poderoso agente cancerígeno conocido, ya que en dosis muy pequeñas (15 µg/kg), produce hepatomas en ratas.

La Comisión Especial de las Naciones Unidas (United Nations Special Commission, UNSCOM) en Irak mencionó el posible uso como arma a una aflatoxina. En su informe sinóptico de enero de 1999, afirmó que la “pregunta sigue abierta en relación con los objetivos y las razones de la selección de la aflatoxina como un agente”. Sin embargo, continuó y reportó que un documento iraquí se refiere a los requisitos militares para producir cáncer hepático usando aflatoxinas y la eficacia contra blancos militares y civiles. Se argumentó el uso de los tricotecenos como armas (lluvia amarilla) en Kampuchea y Laos durante 1975–1984, lo cual fue posteriormente desvirtuado.

Los efectos nocivos de la intoxicación por aflatoxinas en los animales (y presumiblemente en humanos) ha sido clasificada en dos formas generales:

1. Se produce la aflatoxicosis aguda cuando se consumen niveles medios a altos de aflatoxinas. Los efectos de esta intoxicación pueden incluir hemorragia, daño agudo del hígado, el edema, la alteración en la digestión, la absorción y/o el metabolismo de alimentos, y posiblemente la muerte.
2. La aflatoxicosis crónica resulta del consumo de niveles bajos a moderados de aflatoxinas. Los efectos son generalmente subclínicos y difíciles de reconocer. Algunos de los síntomas comunes son una difícil y deteriorada absorción de los alimentos e índices de crecimiento más lento (Bolet y Socarrás, 2005; Soriano 2007).



La aflatoxicosis en humanos se asocia con el consumo de aflatoxina de comida contaminada con el hongo *Aspergillus flavus*. Los síntomas asociados con la aflatoxicosis son ictericia, fiebre, ascitis, edema de los pies y vómito.

Las Aflatoxinas también reducen la resistencia orgánica a ciertas enfermedades infecciosas. Está demostrado que alimentos con 0.25-0.50 ppm reducen en pollos la resistencia a algunas bacterias (*Salmonella*, *coccidios*, *candidiasis*), protozoarios y hongos. Hay reducción de la resistencia de los pavos (vacunados) a *Pasteurella multocida* con un no aparente descenso de sus anticuerpos; pero la exposición a la aflatoxina debe ser simultánea o anterior a la vacunación. Este efecto inmunológico de las aflatoxinas parece ser una depresión humoral no específica y en parte produce una alteración en los anticuerpos tisulares (Perusia y Rodríguez, 2001).

Por trabajos experimentales se determinó que las aflatoxinas incrementan los requerimientos de vitamina D en pollos. En ratas y cerdos las aflatoxinas inducen al carcinoma hepático y al hepatoma. También hay otras micotoxinas tumorígenas y cancerígenas.

Las micotoxicosis son las intoxicaciones provocadas por micotoxinas. La incidencia de micotoxicosis aguda es un problema de salud animal, mientras que para el hombre tiene mayor importancia en la intoxicación crónica (Soriano, 2007).

En la tabla 8 se presentan algunos efectos fisiológicos producidos por las micotoxinas.

En 397 pacientes que se calculó habían consumido 2 a 6 mg de aflatoxina diariamente durante un mes, se presentaron 106 muertes. También se presentaron muertes después de la ingestión calculada de 12 mg/kg de aflatoxina B1. Los seguimientos a cinco años de sobrevivientes de intoxicación aguda (incluso con biopsias de hígado) mostraron una recuperación casi completa. La principal preocupación con la aflatoxina (particularmente B1) es la posibilidad del cáncer hepático asociada con el consumo crónico de comida contaminada con hongos (OMS, 2004)



**Tabla 8. Principales efectos fisiopatológicos producidos por las micotoxinas.**

<b>Micotoxinas</b>	<b>Efectos fisiopatológicos</b>
Esterigmatocistina	Hepatotóxica, nefrotóxica, causa alteración pulmonar y diarreas; mutágenas in vivo, inductoras de tumores y teratógenas.
Aflatoxinas B y G	Daño hepático agudo, cirrosis, inducción de tumores, disminución de la eficacia del sistema inmunitario, teratogénesis, excreción por la leche, acumulación en tejidos.
Citrinina	Nefrotóxica. Toxicidad renal en monogástricos (poliuria, proteinuria, creatinuria, glucosuria, enzimuria y aumento de nitrógeno ureico en sangre), temblores corporales, inmunosupresión.
Fumonisinias	Neurotóxicos (leucoencefalomalacia), nefrotóxicos, edema pulmonar y cerebral, hepatotóxicos y lesiones cardíacas. Los órganos afectados son: cerebro, pulmón, hígado, riñón y corazón. Excreción en leche.
Ocratoxinas	Nefropatía endémica de los Balcanes, acumulación en riñón, tubulonefritis, hígado y músculo, vómitos, teratogénesis, mutagénesis, embriotóxicas.
Zearalenona	Síndrome estrogénico, problemas reproductivos, excreción por leche junto con sus derivados $\alpha$ y $\beta$ -zearalenol.



**Tabla 8. Principales efectos fisiopatológicos producidos por las micotoxinas**  
(Continuación).

<b>Micotoxinas</b>	<b>Efectos fisiopatológicos</b>
Rubratoxina	Gran congestión (con hemorragias) de hígado, riñón, glándulas suprarrenales, pulmón, bazo, tracto gastrointestinal y congestión vascular en los tejidos subcutáneos y hemorragias en viscera abdominal, inmunosupresión.
Tricotecenos: toxina T2, nivalenol, deoxinivalenol y diacetoxiscirpenol	Vómitos, taquicardia, diarrea, pérdida de la atención, hemorragias, edemas, necrosis de los tejidos cutáneos, destrucción de los tejidos hematopoyéticos, disminución de los glóbulos blancos y plaquetas circulares, meninges hemorrágicas (cerebro), alteración del sistema nervioso, rechazo del alimento, lesiones necróticas en diferentes partes de la boca, degeneración patológica de las células de la médula ósea, nódulos linfáticos e intestino.
Patulina	Trastornos gastrointestinales y neurológicos, temblores corporales, mutagénesis, embriotóxicas.

FUENTE: Soriano (2007).

En la tabla 9 se muestran las principales aflatoxinas detectadas en diversos alimentos para consumo humano.

**Tabla 9. Principales aflatoxinas en los alimentos de consumo humano.**

<b>Alimento</b>	<b>Tipo de aflatoxina</b>	<b>Referencia</b>
<i>Pistache</i>	B <sub>1</sub> , G <sub>1</sub> y G <sub>2</sub>	Aran <i>et al.</i> (1994)
Leche líquida	M <sub>1</sub>	Bagócsi <i>et al.</i> (2000) Barros <i>et al.</i> (2003) Blanco <i>et al.</i> (1989) Hernández y Sanz (1990)
Cacahuete	B <sub>1</sub> y G <sub>1</sub>	Barros <i>et al.</i> (2003) Stoloff y Trucksess (1996) Jiménez <i>et al.</i> (1991) Viñas <i>et al.</i> (1999)
Frutos secos	B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> y G <sub>2</sub>	González (2001) Barros <i>et al.</i> (2003)
Queso	B <sub>1</sub> y B <sub>2</sub>	Blanco <i>et al.</i> (1989) Bécquer <i>et al.</i> (2003) Medina <i>et al.</i> (1998)
Huevo	M <sub>1</sub> y M <sub>2</sub>	Casanova (1995)
Formulas infantiles	M <sub>1</sub>	Dobson <i>et al.</i> (1998) Domínguez <i>et al.</i> (1994)
Trigo	G <sub>1</sub> y G <sub>2</sub>	Barros <i>et al.</i> (2003) Hernández y Sanz (1990)
Semillas de algodón	B <sub>1</sub>	Doyle <i>et al.</i> (1997)
Leche en polvo	M <sub>1</sub>	Dobson <i>et al.</i> (1998)
Yogurt	M <sub>1</sub>	Dobson <i>et al.</i> (1998)
Embutidos	B <sub>1</sub>	Barrea <i>et al.</i> (1992)

**Tabla 9. Principales aflatoxinas en los alimentos de consumo humano.**

(Continuación).

<b>Alimento</b>	<b>Tipo de aflatoxina</b>	<b>Referencia</b>
Pescado	B1, B2, G1 y G2	Barros et al. ( 2003)
Maíz	B <sub>1</sub> y B <sub>2</sub>	Bagócsi <i>et al.</i> (2000) Lee y Hagler ( 1991) Castillo <i>et al.</i> ( 2004) Molina y Giannuzz ( 2002) Lumbreras <i>et al.</i> ( 1997) Hernández y Sanz (1990)

**2.6.6 Dosis letales.**

Las dosis letales para las micotoxinas son: Aflatoxina 2.5 µg/Kg; Ocratoxina A 50 µg/Kg; Citrinina 6 µg/Kg; Zearalenona 80 µg/Kg; T-2 280 µg/Kg; Patulina 150 µg/Kg. En la tabla 10 se muestran las dosis letales de diferentes aflatoxinas.

La patología y/o la respuesta de cada persona depende de factores como: dosis, toxicidad del compuesto, factores intrínsecos del huésped como: edad, sexo, estado endocrino, factores nutricionales y periodos de exposición de la aflatoxina (Dvoradcova, 1990).

**2.6.7 Mecanismos de acción.**

El descubrimiento de la toxicidad para el hígado y actividad cancerígena de la aflatoxina del *Aspergillus flavus* ha demostrado que basta una pequeña contaminación de los alimentos por hongos productores de estas sustancias para hacerlos inadecuados no sólo para el hombre sino también para los animales (Linder, 1995).

En 1966 se demostró que el mecanismo de acción de las aflatoxinas incluía la inhibición del DNA y el RNA, (mediante la unión covalente) la inhibición de la mitosis y la producción de alteraciones cromosómicas, lo que evidenció su efecto como agente carcinogénico,



teratogénico y mutagénico. Por esto, se ha planteado que las aflatoxinas son un factor de inducción de neoplasia en el hombre (Bolet y Socarrás, 2005).

**Tabla 10. Dosis letal de aflatoxina.**

Aflatoxina	LD50 (mg/ Kg peso)
B1	0.364
G1	0.784
M1	1.228
B2	1.696
G2	3.450

Fuente: Pérez (1991)

La aflatoxina una vez absorbida en el intestino delgado es transportada por los glóbulos rojos y las proteínas plasmáticas hasta el hígado vía portal, donde es metabolizada por las enzimas oxidasas que las biotransforman en metabolitos, algunos altamente reactivos que tienen la capacidad de unirse covalentemente con centros nucleofílicos de macromoléculas celulares como el DNA, RNA, y proteínas. Esto implica un riesgo biológico para la célula (Bolet y Socarrás, 2005).

Las aflatoxinas son eliminadas por la leche, orina y materia fecal. Su eliminación completa puede precisar de varios días, no obstante que estas micotoxinas no se almacenan en ningún tejido en particular. También pueden actuar sobre el metabolismo de glúcidos y lípidos. Sobre el metabolismo de los glúcidos actúan la ocratoxina A, citrinina, aflatoxina B<sub>1</sub> y rubratoxina, mientras que en los lípidos actúan las aflatoxinas, ocratoxinas, citrinina y tricocentenos (Soriano, 2007).





La química y el metabolismo de las aflatoxinas están bien descritos. La AFB<sub>1</sub> es metabolizada por los sistemas microsómicos a un rango de metabolitos. El metabolito activo se supone que es el 8-9 epóxido de la AFB<sub>1</sub>. La inactivación depende de la conjugación del glutatión y la susceptibilidad a la intoxicación aguda depende de la actividad de la enzima glutatión-S-transferasa. El epóxido B<sub>1</sub> se une en forma covalente a un rango de proteínas que tienen tanto actividades estructurales como enzimáticas. La fosforilación de las proteínas también se altera con la aflatoxina B<sub>1</sub>. Todas las aflatoxinas son genotóxicas. (OMS, 2004). En la figura 13 se muestra el metabolismo de la AFB<sub>1</sub>.

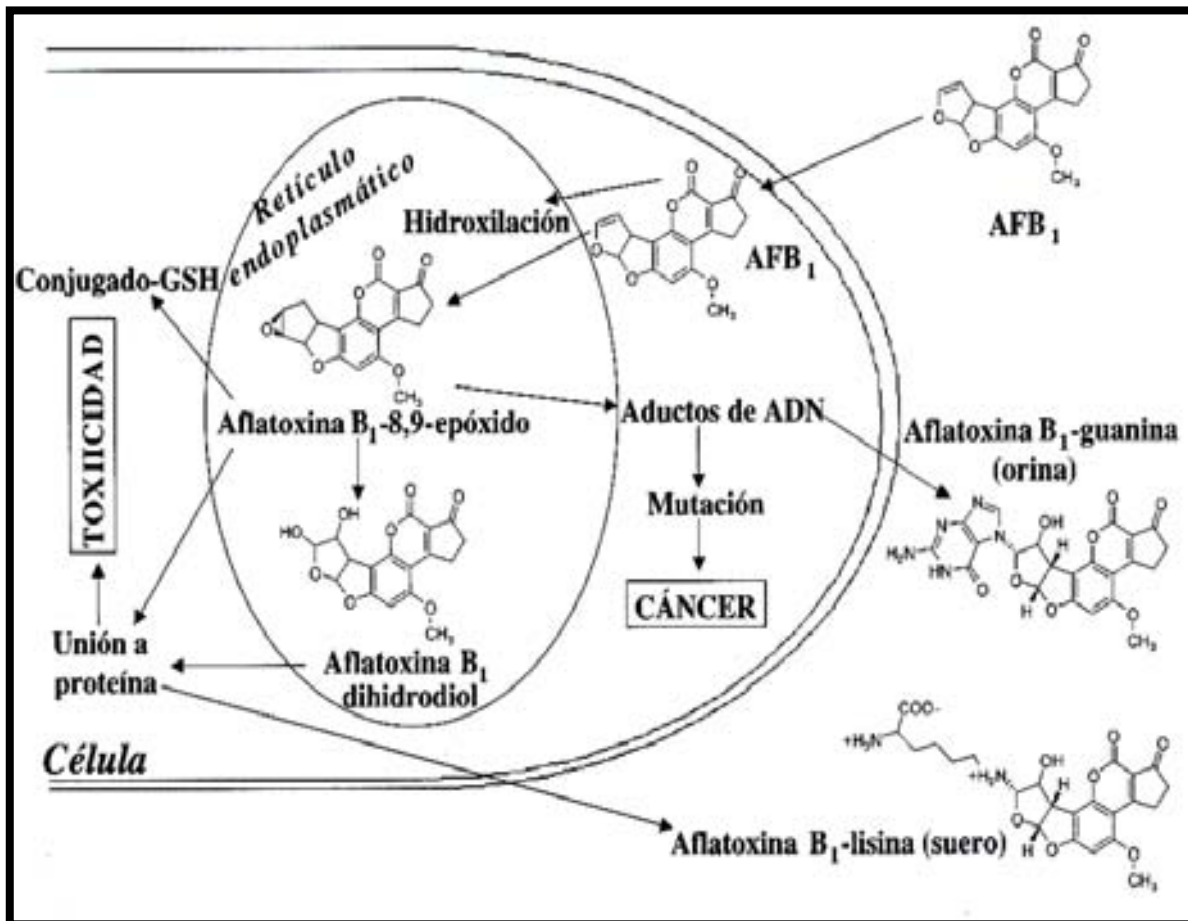


Figura 13. Metabolismo de la aflatoxina B<sub>1</sub>.  
Fuente: Soriano (2007).

### 2.6.8 Detoxificación y descontaminación.

La detoxificación se refiere a los procedimientos para reducir o eliminar las propiedades tóxicas y la descontaminación son los métodos por los cuales las micotoxinas son



eliminadas o neutralizadas en los alimentos. Los métodos deben de ser fáciles de usar, económico, no tiene que formar compuestos más tóxicos que el original y sobre todo no deben de alterar las propiedades organolépticas ni nutricionales de los alimentos. Algunos métodos tradicionales de elaboración son útiles para separar físicamente las toxinas o para desactivarlas químicamente. Sin embargo, la eficacia de cada método de elaboración deberá evaluarse para el producto en cuestión y para la toxina presente en el sistema. Entre los criterios específicos para la evaluación y aceptación de determinados procedimientos de reducción de las micotoxinas o de descontaminación, se incluyen los siguientes (Soriano, 2007; Abecia, 2005):

- ❖ Inactivar, destruir o eliminar las toxinas.
- ❖ No producir ni dejar residuos tóxicos en los alimentos/piensos.
- ❖ Conservar el valor nutritivo y la aceptabilidad del producto para alimento o pienso.
- ❖ No alterar de modo apreciable las propiedades tecnológicas del producto. Si es posible, destruir las esporas de los hongos.

Los métodos de descontaminación son (Márquez y Vera, 2000; Millán y Martínez, 2003):

- ❖ Químicos: plaguicidas, fungicidas, nixtamalización, amonio y bisulfito de sodio, uso de ácidos (propionico, sórbico y formico), alcalis o agentes oxidantes (ozonos peróxidos), sustancias inertes (carbón activado, polímeros de pirrolidona, alimosilicatus, bentonita) amonificación (reduce la toxicidad de AFB<sub>1</sub> mediante su conversión en aflatoxina D<sub>1</sub>).
- ❖ Biológicos: adición de bacterias, levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*), enzimas, otras cepas de hongos.
- ❖ Físicos: radiaciones como: rayos x y cobalto.

### **2.7 Métodos para la determinación de aflatoxinas.**

La importancia del análisis de micotoxinas en alimentos reside en el cumplimiento de las reglamentaciones y en la verificación de los sistemas de control de seguridad alimentaria con el fin de preservar la salud de la población (Soriano, 2007).

Desafortunadamente los ensayos para micotoxinas encierran diferentes problemas que abarcan desde contar con un laboratorio perfectamente bien equipado, en cuanto a



instrumentación y capacidad analítica y personal con la suficiente experiencia en el manejo de muestras y estándares de referencia por ello es necesario plantear un método rápido para la cuantificación de las aflatoxinas (Medina, 2003).

Actualmente 56 países han estado buscando y considerando la introducción de nuevas regulaciones que controlen la cantidad de aflatoxinas que entra en la cadena alimenticia (Bradburn, 1994).

Los análisis de micotoxinas requieren un alto grado de exactitud, precisión y reproducibilidad. Las técnicas analíticas más empleadas en el análisis de micotoxinas se dividen en tres bloques (Soriano, 2007):

1. Extracción y purificación:

La alta complejidad de los alimentos, donde se encuentran cantidades importantes de proteínas, lípidos, hidratos de carbono, agua y otros componentes minoritarios, se requiere una purificación para eliminar las sustancias interferentes. Algunas técnicas se muestran en la tabla 11.

**Tabla 11. Técnicas de extracción y purificación.**

Extracción con columnas Mycosep	Es una mezcla de varios absorbentes (carbón, celita, resinas, entre otras) empaquetadas en un tubo de plástico. Estas son introducidas a la muestra y se lleva la separación en 10 a 30 segundos.
Extracción en fase sólida convencional	Las micotoxinas son disueltas en una matriz acuosa al atravesar un soporte sólido, son retenidas y se eluyen con disolventes.

**Tabla 11. Técnicas de extracción y purificación (Continuación).**

<b>Técnicas.</b>	<b>Fundamento</b>
Dispersión de la matriz en fase sólida	La muestra se dispersa con una fase sólida como C <sub>18</sub> octilsilíce (C <sub>8</sub> ), aminopropilsilíce (NH <sub>2</sub> ), etc., para conseguir una mezcla homogénea, se introduce en una columna de vidrio y se purifica la muestra.
Microextracción en fase sólida	La absorción de las micotoxinas sobre una fase absorbente emplazada en el extremo de una microjeringa, las cuales se desorben posteriormente en el inyector de un cromatógrafo de gases o de líquido. La extracción se realiza por inmersión directa de la fibra en la muestra líquida o por un sistema cerrado, donde la fibra se encuentra suspendida sobre la muestra.
Extracción asistida por microondas	Se basa en la absorción de energía de microondas por disolventes y la muestra, produciéndose un incremento en la temperatura que facilita la difusión de compuestos desde la matriz al disolvente.
Extracción con columnas de inmunoafinidad	La micotoxina se une a anticuerpos monoclonales fijados en la columna de inmunoafinidad y mediante un lavado se eliminan restos de la muestra.

Fuente: Soriano (2007).

**2. Técnicas de presunción o screening:**

La finalidad de ésta técnica es la de descartar, de manera rápida, las muestras negativas y reducir al máximo el número de análisis. Estos métodos son relativamente sensibles, pero poco selectivos. Las técnicas más empleadas son: inmunoensayos y Biosensores (tabla 12).

**Tabla 12. Técnicas de presunción o screening.**

<b>Técnicas.</b>	<b>Tipo.</b>	<b>Fundamento.</b>
Inmunoensayos	Radio Immuno Assay (RIA)	Es un método que se basa en la formación específica de los complejos Antígeno-Anticuerpo (Ag-Ac) lo que le dota de una gran especificidad unido a la sensibilidad de los métodos radiológicos.
	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)	Se basa en la reacción específica antígeno-anticuerpo y puede ser de tipo competitivo directo o indirecto
Biosensores	Óptico	Se basa en la medición de las variaciones que se producen en las propiedades de la luz como consecuencia de la interacción física o química entre la micotoxina a detectar y el elemento biológico de reconocimiento del biosensor
	Piezoeléctrico	Estos miden cambios directos de masa inducidos por la formación del complejo antígeno-anticuerpo.

Fuente: Soriano (2007).



### 3. Técnicas de confirmación:

Estas pruebas tienen como objetivo verificar y confirmar los resultados. La elección de la técnica utilizada para la confirmación depende de la disponibilidad, el tiempo y costos. Pueden ser cuantitativos y/o cualitativos (Fig. 13).

**Tabla 13. Técnicas de confirmación.**

<b>Técnicas</b>	<b>Fundamento.</b>
Cromatografía en capa fina.	Se basa en la diferencia entre las fuerzas de adhesión de las moléculas de los componentes a una fase móvil (normalmente, un disolvente) y a una fase estacionaria (la llamada capa fina, que puede ser papel o gel de sílice). Esta diferencia se traduce en un mayor o menor desplazamiento o movilidad de cada componente individual, lo cual permite su separación e identificación.
Cromatografía líquida de alta resolución.	Es un método físico de separación basado en la distribución de los componentes de una mezcla entre dos fases inmiscibles, una fija o estacionaria y otra móvil. La cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) son los más utilizados en la actualidad. Se caracterizan por (Docon <i>et al.</i> , 2003): gran sensibilidad, capacidad para proporcionar determinaciones cuantitativas exactas, gran utilidad a la hora de separar sustancias no volátiles, o termolábiles.
Electroforesis capilar.	Se basa en la migración de las moléculas polares en el interior de un capilar en cuyo interior fluye disolución tampón, cuando se le aplica una corriente eléctrica. La migración de un determinado ion depende de la relación carga-tamaño
Cromatografía de gases.	Se basa en la separación de compuestos en función de su volatilidad y afinidad por la fase estacionaria.

Fuente: Soriano (2007).



### **2.8 Regulación del contenido de aflatoxinas.**

En todo el mundo existen regulaciones importantes sobre la presencia de aflatoxinas en el alimento para consumo humano y animal. En la tabla 14 se muestran los límites permisibles de aflatoxinas en diferentes países.

El nivel de acción del gobierno federal de los Estados Unidos para aflatoxinas en alimentos para el consumo humano o en alimento es de 20 ppb.

**Tabla 14. Limite máximo permisible en distintos países del mundo para aflatoxina B1 y aflatoxinas totales.**

<b>País</b>	<b>Límite máximo permisible</b>
Dinamarca, Gran Bretaña, Finlandia, Polonia, Suecia.	5 ppb de B <sub>1</sub>
Francia	30 ppb en general
Alemania Federal	10 ppb como totales 5 ppb de B <sub>1</sub>
Canadá	20 ppb como totales 5 ppb de B <sub>1</sub>
E.E.U.U.	20 ppb como totales (suma de B <sub>1</sub> + B <sub>2</sub> + G <sub>1</sub> + G <sub>2</sub> ).
México.	20 ppb totales

Fuente: Castro (1994).

En México la NOM 188-SSA1-2002 sobre control de aflatoxinas en cereales para consumo humano y animal, tiene como limite 20 ppb para consumo directo o como parte de alimentos procesados (Secretaría de salud, 2002).



La Comisión europea tiene niveles de acción para las aflatoxinas en cereales para el consumo humano directo o para ingredientes en productos alimenticios son de 4 ppb de aflatoxinas totales y 2 ppb de AFB<sub>1</sub> (tabla 15). Los límites máximos en µg/Kg (ppb) se refieren a alimentos con una humedad de 12% (Gimeno, 2004).

**Tabla 15. Limite máximo permisible en distintos alimentos para AFB<sub>1</sub> (Unión Europea).**

<b>Alimento.</b>	<b>Límite.</b>
Todas las materias primas para alimentación animal	20 ppb
Alimentos completos para cerdos, aves de corral, bovinos, ovinos y caprinos (excepto los animales de producción lechera y animales jóvenes)	20 ppb
Alimentos completos para ganado lechero	5 ppb
Alimentos completos para terneros y borregos.	10 ppb
Alimentos complementares para cerdos, aves de corral, bovinos, ovinos e caprinos (excepto alimentos complementares para ganado lechero, terneros, borregos y otros animales jóvenes.	20 ppb
Otros alimentos complementares	5 ppb
Otros alimentos completos	10 ppb

Fuente: Gimeno (2004).

Con respecto a las micotoxinas en alimentos para humano, la UE tiene legislación para las aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, M<sub>1</sub>, ocratoxina A y Patulina.

- ❖ Cacahuets, frutos de cáscara, frutos secos y productos derivados de su transformación, destinados al consumo humano directo o usados como





- ingredientes en los productos alimenticios: 2 ppb (aflatoxina B1) y 4 ppb (total aflatoxinas).
- ❖ Cacahuets destinados a ser sometidos a un proceso de selección, u otro tratamiento físico, antes del consumo humano directo o de su uso como ingredientes de productos alimenticios: 8 ppb (aflatoxina B1) y 15 ppb (total aflatoxinas).
  - ❖ Frutos de cáscara y frutos secos destinados a ser sometidos a un proceso de selección, u otro tratamiento físico, antes del consumo humano directo o de su uso como ingredientes de productos alimenticios: 5 ppb (aflatoxina B1) y 10 ppb (total aflatoxinas).
  - ❖ Cereales (incluido el alforfón, *Fagopyrum sp.*) y productos derivados de su transformación, destinados al consumo humano directo o a ser usados como ingrediente en los productos alimenticios: 2 ppb (aflatoxina B1) y 4 ppb (total aflatoxinas).
  - ❖ Cereales (incluido el alforfón, *Fagopyrum sp.*), salvo el maíz destinado a ser sometidos a un proceso de selección, u otro tratamiento físico, antes del consumo humano directo o de su uso como ingrediente en los productos alimenticios: 2 ppb (aflatoxina B1) y 4 ppb (total aflatoxinas).
  - ❖ Maíz destinado a ser sometido a un proceso de selección, u otro tratamiento físico, antes del consumo humano directo o de su uso como ingrediente en los productos alimenticios: 5 ppb (aflatoxina B1) y 10 ppb (total aflatoxinas).
  - ❖ Para los siguientes tipos de especias: - *Capsicum spp.* (frutos desecados, enteros o triturados, con inclusión de los chiles, el chile en polvo, la cayena y el pimentón), *Piper spp.* (frutos, con inclusión de la pimienta blanca y negra), (*Myristica fragans* (nuez moscada), *Zingiber officinale* (jengibre), *Curcuma longa* (cúrcuma): 5 ppb (aflatoxina B1) y 10 ppb (total aflatoxinas).



---

# OBJETIVOS

---



### 3. OBJETIVOS.

#### 3.1 Objetivo general.

Establecer los parámetros físicos, químicos y microbiológicos relacionados con la calidad de productos a base pepita verde de calabaza que permita realizar una propuesta, que contribuya a mejorar la inocuidad de los productos elaborados artesanalmente en México.

#### 3.2 Objetivos particulares

1. Realizar un muestreo en la zona de Cuautitlán y en la Central de Abastos de la Ciudad de México para evaluar la calidad de los productos obtenidos de la pepita verde de calabaza.
2. Evaluar las características físicas en la pepita verde de calabaza y de los productos procedentes de la zona de Cuautitlán y la Central de Abastos de la Ciudad de México.
3. Determinar los parámetros químicos, fisicoquímicos y físicos de la pepita verde de calabaza procedente de la zona de Cuautitlán y la Central de Abastos de la Ciudad de México.
4. Determinar los parámetros químicos, fisicoquímicos y físicos a los productos procedentes de zona de Cuautitlán y la Central de Abastos de la Ciudad de México.
5. Establecer la calidad microbiológica de la pepita verde de calabaza y sus productos procedentes de la zona de Cuautitlán y la Central de Abastos de la Ciudad de México.
6. Determinar el contenido total e identificar a las aflatoxinas presentes en la pepita verde de calabaza y sus productos procedentes de la zona de Cuautitlán y la Central de Abastos de la Ciudad de México.



## ***OBJETIVOS***

---

---

7. Realizar un estudio de campo en la elaboración de un producto elaborado artesanalmente (mole) a base de pepita verde de calabaza para determinar la posible fuente de contaminación con aflatoxinas.
  
8. Realizar una propuesta para mejorar las condiciones de almacenamiento de la pepita verde de calabaza y de sus productos que eviten problemas de salud Pública.



---

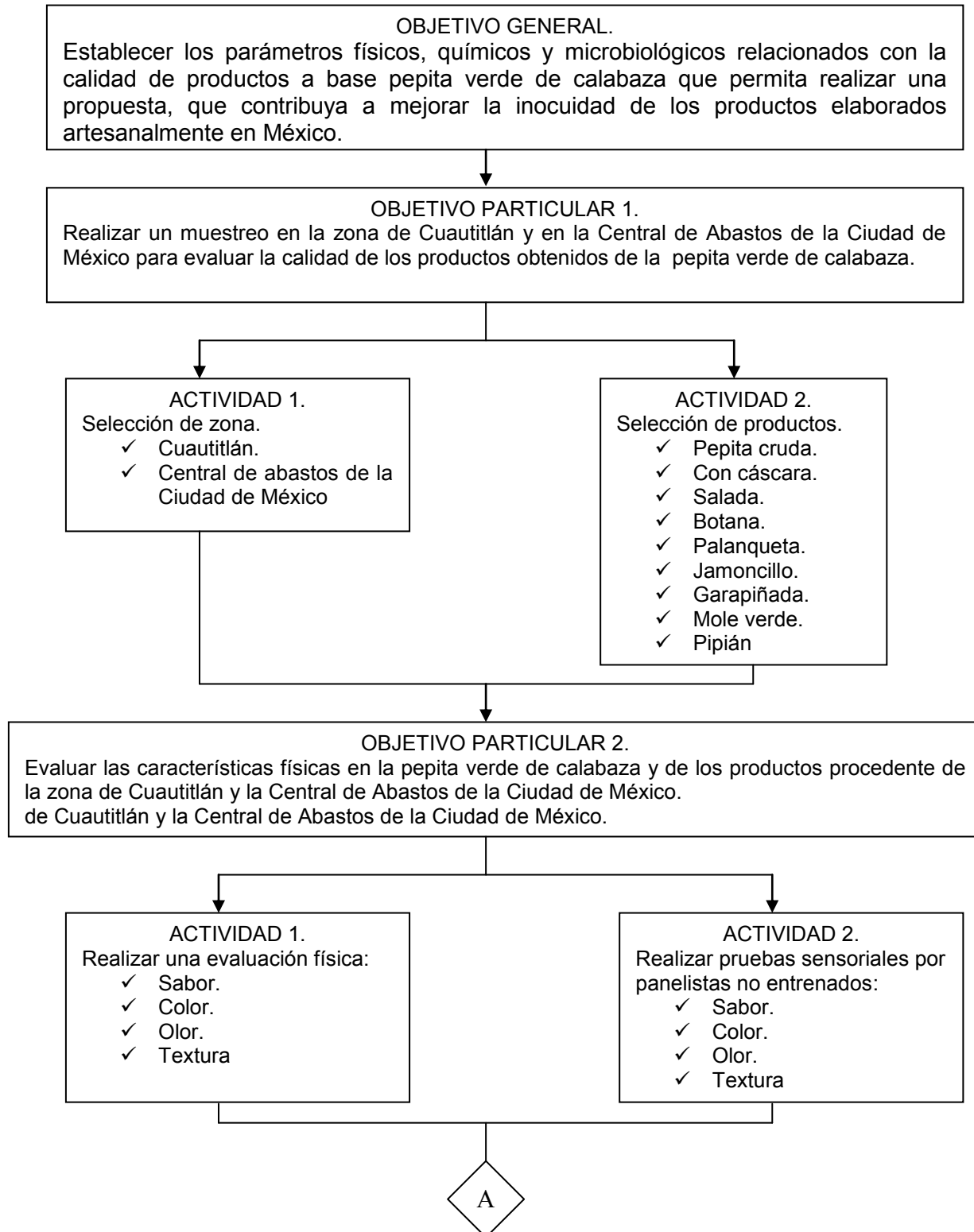
# **METODOLOGÍA EXPERIMENTAL**

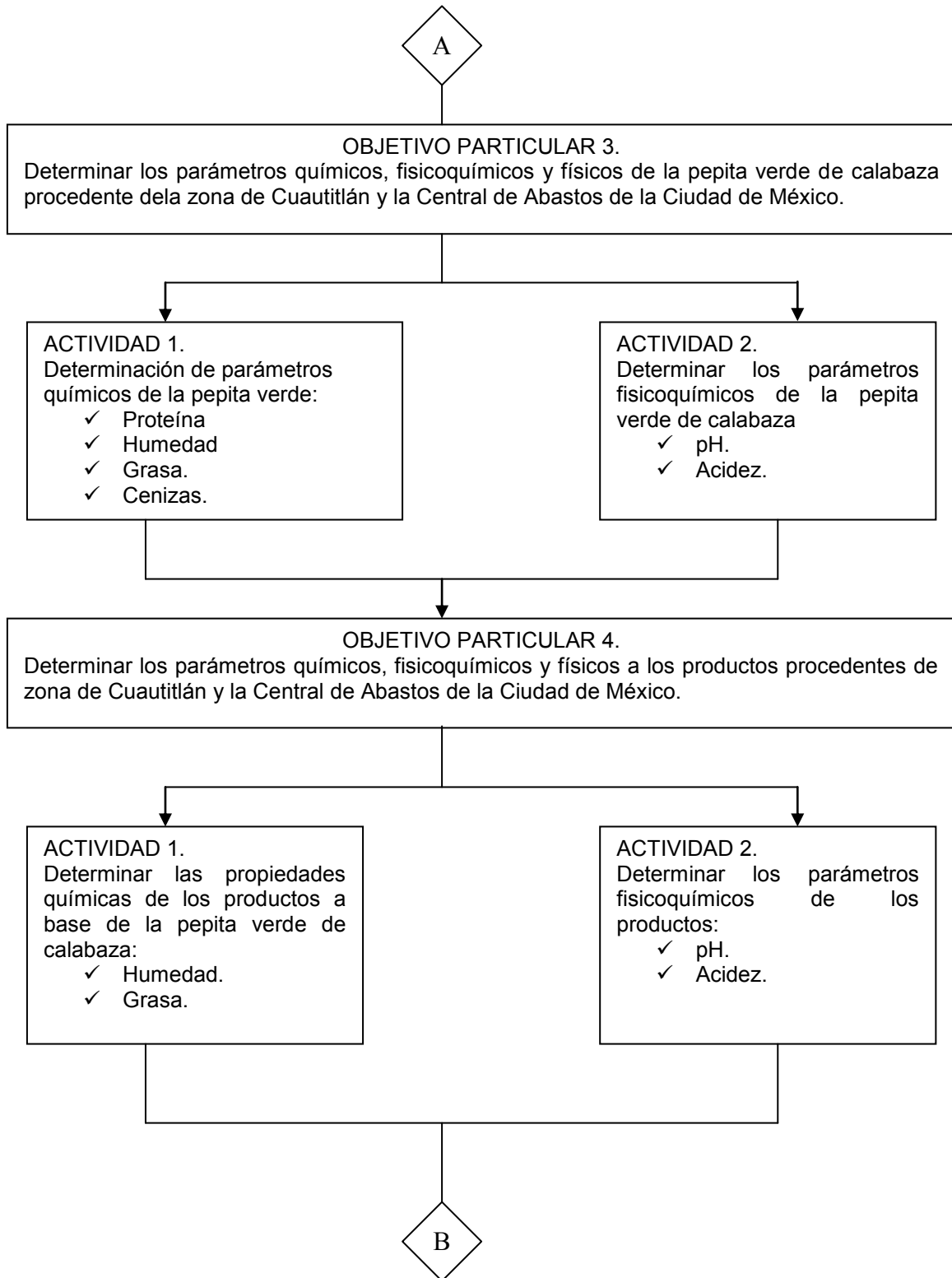
---

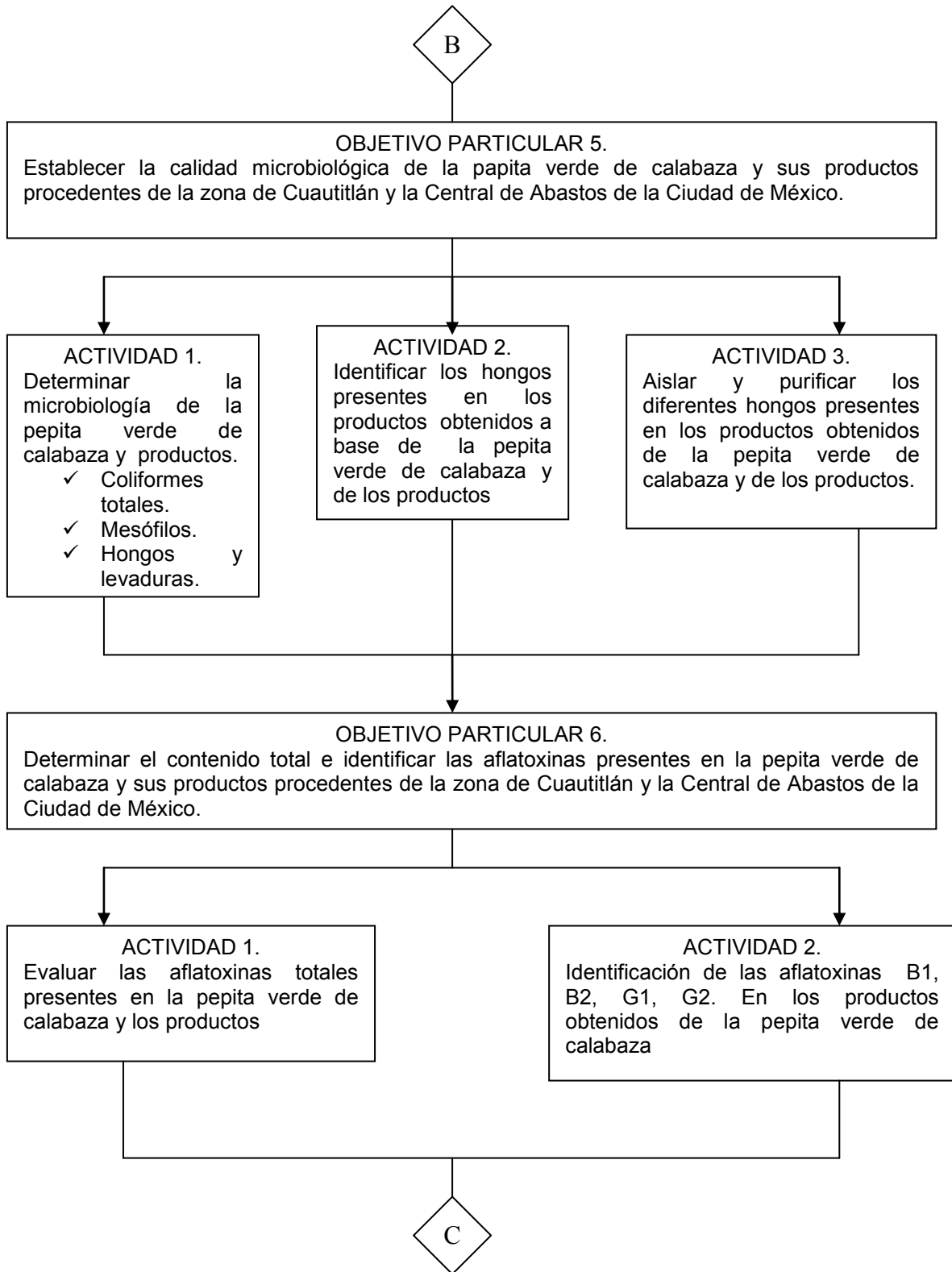


**4. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.**

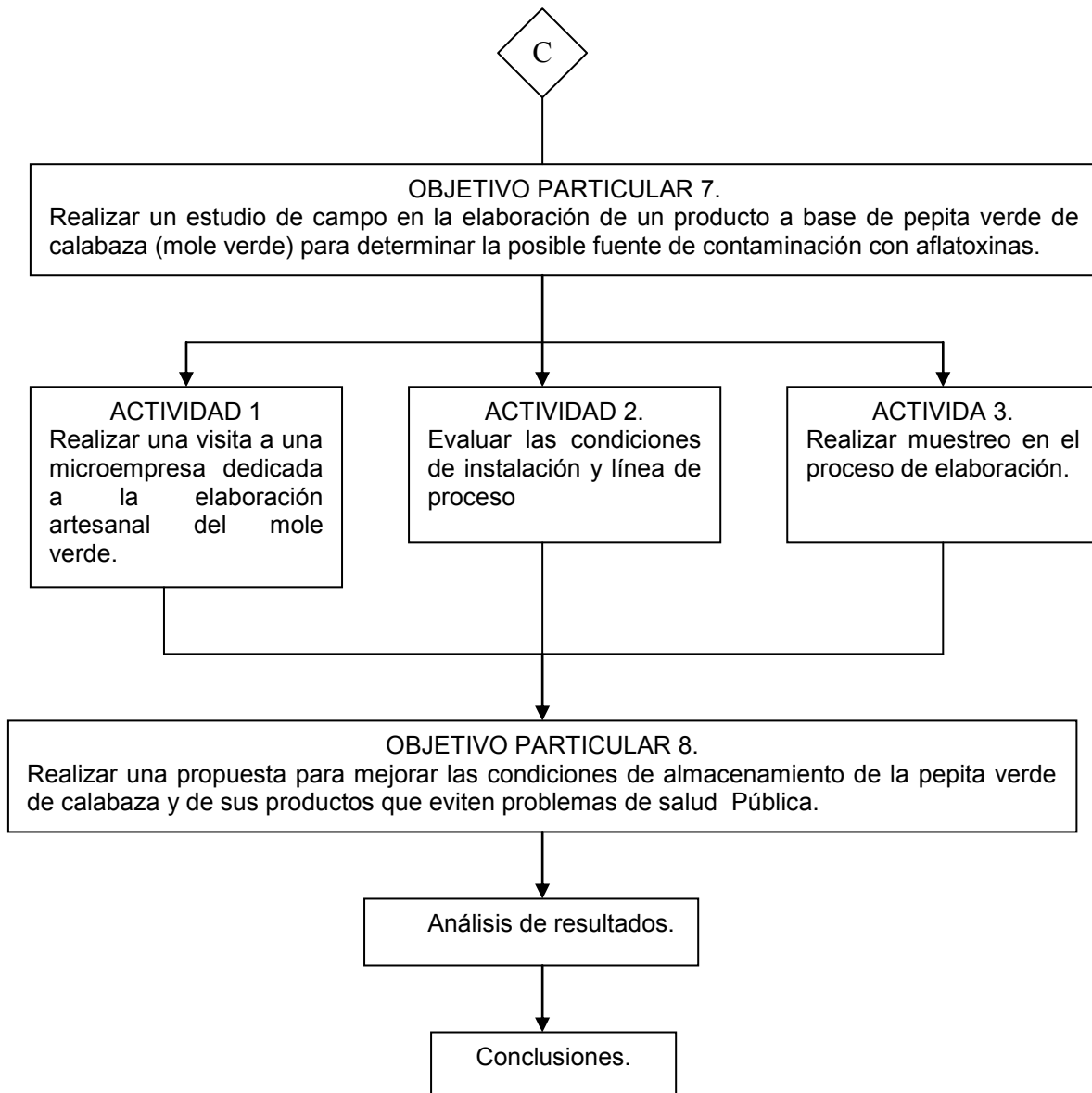
**4.1 Cuadro metodológico.**













### **4.2 Material biológico.**

Se trabajó con pepita verde de calabaza y sus productos obtenidos de 2 mercados (Romero de Cuautitlán y El Carmen) de la zona de Cuautitlán (zona 1) y en 4 bodegas de la Central de Abastos de la Ciudad de México (zona 2). Cada muestreo se realizó con un kilogramo de producto y se llevaron a cabo dos réplicas. Los productos estudiados fueron: pepita cruda, con cáscara, salada y en los siguientes productos donde la pepita verde es ingrediente importante: semillas secas para botanas, garapiñada, dulce de jamoncillo, palanqueta, mole verde y polvo para pipián (Fig. 14).

### **4.3 Tratamiento de las muestras.**

Al llegar las muestras al laboratorio de Postcosecha de Productos Vegetales del Centro de Asimilación Tecnológica de la FESC-UNAM, se almacenaron en envases herméticos, en un lugar seco y a temperatura ambiente para evitar una posible contaminación de los productos y de algunas reacciones de descomposición. Previamente a los diferentes análisis las muestras se pulverizaron en un pulverizador marca KRUPS, se guardaron en bolsas herméticas para su uso posterior y se tomó la cantidad requerida para cada prueba.

### **4.4. Evaluación física, química y fisicoquímica de pepita verde de calabaza y productos.**

La pepita verde de calabaza procedente de las dos zonas estudiadas: Cuautitlán y Central de Abastos fue evaluada en parámetros químicos: proteína, cenizas, humedad y grasa de acuerdo a las técnicas descritas en el apartado (4.9). Los productos a partir de la pepita (con cáscara, salada, en botana, garapiñada, pepitoria, jamoncillo, mole verde y pipián) fueron evaluados en dos de los más importantes parámetros químicos: humedad y grasa, de acuerdo a las técnicas descritas en el apartado de métodos analíticos. También fueron evaluados los parámetros fisicoquímicos: pH, acidez de pepita verde y todos los productos.

Para la determinación de las características sensoriales se realizó una encuesta con 15 panelistas no entrenados en donde se evaluaron: sabor, olor, color y textura de las muestras obtenidas en los diferentes puntos del mercado y de las bodegas. Esto con el fin



de detectar desde el inicio de la experimentación posibles alteraciones por mal manejo de los productos adquiridos.



**Figura 14. Productos a base de pepita de calabaza comercializada en las zonas de Cuautitlán y la Central de Abastos de la Ciudad de México.**

#### **4.5 Evaluación microbiológica de pepita verde de calabaza y productos.**

La pepita verde de calabaza y de sus productos procedentes de las dos zonas estudiadas fueron evaluadas microbiológicamente para establecer otro de los parámetros de calidad de estos productos. Se determinó la presencia de hongos y levaduras, coliformes totales y mesófilos aerobios de acuerdo a las técnicas descritas en métodos analíticos (4.9.4).



### **4.5.1. Identificación y purificación de hongos presentes en pepita verde y productos.**

#### **4.5.1.1 Crecimiento.**

Para el crecimiento de los hongos se preparó agar papa dextrosa (marca BD Bioxon), se dejó enfriar a temperatura de 37 °C y se le agregaron 0.05 g de antibiótico cloranfenicol esterilizado y ácido tartárico (se adicionaron después de la esterilización). Se vaciaron en las cajas de petri. Se realizó la prueba de esterilidad por 24 horas a 25°C. Posteriormente se realizó la siembra directa y se colocaron 4 semillas en tres cajas y se dejó en incubación durante 5 días a 23°C. En el caso de las muestras de mole, pipián, y del jamoncillo se realizó por diluciones de  $10^{-1}$  a  $10^{-4}$  por superficie.

#### **4.5.1.2 Identificación macroscópica.**

Para la identificación macroscópica se observó el crecimiento micelial, el anverso y el reverso de la colonia en la caja petri. En el anverso se describe el tamaño de la colonia (si está limitada ó se expande en todo el medio de cultivo), el color, su forma y su textura. Por la parte el reverso se describe si es un hongo que presenta pigmentación en el medio de cultivo Silva, 2007).

#### **4.5.1.3 Purificación y aislamiento de los hongos.**

Para la purificación y aislamiento de los hongos obtenidos de la pepita verde de calabaza y de los productos se realizó sobre una caja petri con PDA (marca BD Bioxon), se coloca una pequeña muestra proveniente de las cajas con las muestras con agar de manera que quede centrada para favorecer el crecimiento, se incubó a 25°C.

#### **4.5.1.4 Identificación microscópica.**

Se realizó con la técnica scotch, lo cual consiste en: (Koneman, 1992).

Con una pinza se tomó cinta adhesiva clara, se cortó y se tomó una muestra del hongo a identificar presionándolo suavemente para recoger una porción del micelio. Se colocó una gota de azul de algodón lactofenol sobre un portaobjetos y encima de la gota se colocó la muestra tomada y se coloca nuevamente una gota de azul de algodón lactofenol y se cubre con un cubreobjetos, posteriormente se identificó en el microscopio óptico (marca Fisher Scientific) (Fig. 15).



**Figura15. Identificación microscópica.**

#### **4.6 Determinación e identificación de aflatoxinas presentes en pepita verde de calabaza y productos derivados.**

La determinación de aflatoxinas se realizó para establecer la calidad de los productos y materias primas. De esta manera se estableció si cada uno de los productos comercializados en la Central de Abastos y en Cuautitlán son aptos para el consumidor y si cumplen con la norma NOM-188-SSA1-2002.

El contenido de aflatoxinas totales se realizó de acuerdo a la técnica descrita en el apartado de métodos analíticos (4.9.5). Cada determinación se realizó por duplicado. En las muestras que presentaron un alto contenido de aflatoxinas y sobrepasó el límite establecido por la norma se procedió a la identificación del tipo de aflatoxina por el método de cromatografía líquida de alta resolución descrito en el apartado de técnicas analíticas.

#### **4.7 Investigación de campo.**

Se contactó con una empresa dedicada a la elaboración de mole artesanalmente en San Pedro Atocpan perteneciente a la delegación Mipa Alta para conocer las condiciones de elaboración de éste producto. Se visitó las instalaciones y se observaron las condiciones de higiene tanto del establecimiento como de los operadores, las condiciones del proceso; con el fin de ver las posibles fuentes de contaminación microbológica y presencia de las aflatoxinas. Se realizó un muestreo durante el proceso de elaboración de mole verde, la toma de muestra fue de 1 Kg, se guardaron en bolsas herméticas y fueron llevadas al laboratorio de Postcosecha de la UNAM para su análisis de calidad (microbiológicos y contenido de aflatoxinas).



Esto se realizó para establecer las condiciones de operación en los procesos de elaboración del mole y relacionarlos con la posible presencia de aflatoxinas. El material fue muestreado en los puntos críticos del proceso de acuerdo al análisis de riesgos y control de puntos críticos. Así como de producto terminado para su posterior evaluación microbiológica y su contenido de aflatoxinas de acuerdo a las técnicas descritas.

#### **4.8 Propuesta para mejorar la calidad del proceso de elaboración del mole.**

De acuerdo con los resultados obtenidos en los objetivos estudiados se realizó una propuesta para mejorar la calidad en la elaboración y comercialización de la pepita verde de calabaza y de sus productos elaborados artesanalmente en México. Dicha propuesta contiene sugerencias en el manejo de la materia prima (almacenamiento) como la higiene, condiciones de almacenamiento, que puedan ayudar a reducir y/o a eliminar la presencia de aflatoxinas, y de esta manera contribuir a la disminución de los problemas de salud pública.

#### **4.9. Técnicas analíticas.**

##### **4.9.1 Parámetros químicos**

##### **4.9.1.1 Proteína.**

La técnica de Lowry es un método espectrofotométrico de valoración cuantitativa de proteínas, donde las proteínas reaccionan con cobre en solución alcalina (pH 10-10.5) y mediante reducción de reactivo de Folin Cioalteau o heteropolibdeno debido a la oxidación de los aminoácidos aromáticos, reacción catalizada por el cobre (Lowry *et al.*, 1951).

Se realizó una extracción de la proteína con ácido tricloroacético (TCA) al 72%; se colocó en un tubo de microcentrifuga marca Daigger 4350 Daigger Company Inc, 100  $\mu$ l de TCA con 100 mg de muestra, se aforó a 1ml con agua y se agitó por 1minuto. Se dejó en reposo en agua con hielo por 20 min. Posteriormente se centrifugó a 3000 rpm/15min, al término de ésta se eliminó el sobrenadante quedándose con el pellet y se realizó un lavado con agua (1ml) y se volvió a centrifugar. Estos lavados se realizaron de 3 a 4 veces. Los valores de concentración de proteína se determinaron por interpolación gráfica



en una curva patrón de albúmina sérica bovina al 0.1%, obtenida a una longitud de onda de 720 nm. Los resultados se expresaron en mg de proteína por ml de extracto.

### 4.9.1.2 Grasa.

En el método de Soxhlet (Fig. 16), la grasa se extrajo con éter de petróleo a partir del residuo desecado, el solvente se eliminó por evaporación y se pesó el residuo de grasa (Pearson, 1998). Los resultados se expresaron en g/100 g de muestra.



Figura 16. Equipo Soxhlet.

### 4.9.1.3 Humedad.

Para el contenido de humedad se utilizó el método de secado utilizando una estufa marca Quincy lab Inc con circulación de aire, en el cual se elimina el agua por efecto del calor (Fig. 17). Calculando el contenido de agua en la muestra por pérdida de peso debido a la evaporación por calentamiento a 130°C (Pearson, 1998). El resultado se expresó en porcentaje.



Figura 17. Charolas de aluminio para humedad.





#### **4.9.1.4 Cenizas.**

##### **FUNDAMENTO**

El método se basa en la obtención del residuo inorgánico que queda después de la incineración de la materia orgánica a 550°C. Los resultados se expresaron en g/100 g de muestra (Pearson, 1998)

#### **4.9.2 Pruebas físicas.**

##### **4.9.2.1 Análisis sensoriales.**

Estos parámetros físicos fueron evaluados considerando color, sabor olor y textura característicos de la pepita verde de calabaza y sus productos. Para el color, sabor y olor se tomó en cuenta la escala que se muestra en la tabla 16 y en la tabla 17 se muestra la escala de textura.

**Tabla 16. Atributos evaluados en pepita verde de calabaza y productos**

<b>Escala hedónica</b>	<b>Categoría</b>	<b>Color</b>	<b>Sabor</b>	<b>Olor</b>
1	Muy desagradable			
2	Desagradable			
3	No agrada ni desagrada			
4	Agradable			
5	Muy agradable			

#### **4.9.3 Parámetros fisicoquímicos.**

##### **4.9.3.1 pH**

Logaritmo común del número de litros de disolución que contienen un equivalente gramos de iones hidrógeno. El potenciómetro mide la diferencia de potencial entre un electrodo patrón de calomelanos y un electrodo de vidrio por balanceo (Pearson, 1998).





Se pesaron 10 g de la muestra homogenizada, se mezclaron con 90 ml de agua. Se filtró a través de papel filtro, se tomó una alícuota y se determinó la lectura con el potenciómetro manual (marca Hanna). Se realizó por triplicado.

**Tabla 17. Evaluación de la textura en la pepita verde de calabaza y productos.**

<b>Escala hedónica</b>	<b>Categoría</b>	<b>Textura</b>
1	Muy dura	
2	Dura	
3	Ni dura un suave	
4	Suave	
5	Muy suave	

#### **4.9.3.2Acidez.**

De la misma muestra obtenida de la prueba de pH se tomó una alícuota de 10ml se le colocó 3 gotas de fenolftaleína y se tituló con NaOH al 0.1 N. Los resultados se expresaron en ml de NaOH gastados (Pearson, 1998).

#### **4.9.4 Parámetros microbiológicos.**

##### **4.9.4.1 Coliformes Totales.**

El método se basa en inocular una cantidad conocida de muestra en un medio de cultivo (Agar MacConkey marca BD Bioxon), incubado a una temperatura de 37°C, durante 24-48 horas, dando como resultado el crecimiento de colonias características para este tipo de microorganismos (NOM-113-SSA1-1994).

Se preparó el medio MacConkey y se esterilizó en autoclave a 121°C por 15 min. Se esperó a que se enfriaran a temperatura de 37 °C. Se vació a las cajas petri y se le hicieron pruebas de esterilidad dejándolas en la incubadora por 24 horas a 25°C. La siembra se realizó por superficie y con diluciones de 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-4</sup> y se dejó incubar por 32 horas a 32-35°C.



### 4.9.4.2 Mesófilos aerobios.

El método se basa en inocular una cantidad conocida de muestra en un medio de cultivo (Agar Nutritivo marca BD Bioxon), incubado a una temperatura de 37°C, durante 24-48 horas, dando como resultado el crecimiento de colonias características para este tipo de microorganismos (NOM-092-SSA1-1994).

Se preparó el agar Nutritivo y se esterilizó en autoclave a 121°C por 15 min. Se esperó a que se enfriaran a temperatura de 37 °C. Se vació a las cajas petri y se le hicieron pruebas de esterilidad dejándolas en incubadora por 24 horas. La siembra se realizó por superficie y con diluciones de 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-4</sup> y se dejó incubar por 32 horas a 32-35°C.

### 4.9.4.3 Hongos y levaduras.

El método se basa en inocular una cantidad conocida de muestra en un medio de cultivo (agar papa dextrosa marca BD Bioxon) acidificado a un pH 3,5 e incubado a una temperatura de 25 ± 1°C por 3-5 días, dando como resultado el crecimiento de colonias características para este tipo de microorganismos (NOM-255-SSA1-1994).

## 4.9.5 Aflatoxinas.

### 4.9.5.1 Columnas de inmunoafinidad.

Para el análisis de aflatoxinas totales tanto en la materia primas como en los productos con los cuales se experimento, se utilizó un método de cromatografía de afinidad con anticuerpos Este método utiliza columnas de afinidad desarrolladas con anticuerpos monoclonales altamente específicos para cada micotoxina, en este caso se habla de Aflatest porque cuantifica aflatoxinas: elusión de la toxina con metanol grado HPLC y fluorometría. Los resultados se expresaron como ppb aflatoxinas totales (Vicam Science Technology, 1999) (anexo).

### 4.9.5.2 HPLC.

#### 4.9.5.2.1 Reactivos.

Se utilizó como fase móvil acetonitrilo y metanol grado HPLC (marca J. T. Baker). Ácido trifluoroacético y ácido acético glacial para la derivatización de las aflatoxinas (marca J. T.



Baker). Los patrones de aflatoxina B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> fueron proporcionados por Sigma-Aldrich Química.

### 4.9.5.2.2 Equipos.

Se utilizó el equipo de Cromatografía de líquidos de alta resolución marca Shimadzu, acoplado a un detector de fluorescencia con una longitud de onda de excitación de 360 nm (xenón ión láser) y una onda de emisión de 440 nm y un programa LC solution para procesar los datos (Fig. 18). Se utilizó una columna LC 18- DB 4.6x250 mm con un tamaño de partícula de 5 µm, marca Supelco. Para la extracción del analito se utilizó columnas de inmunoafinidad (marca AFLATEST).



Figura 18. Equipo HPLC

### 4.9.5.2.3 Preparación de patrones.

La preparación de las soluciones estándar de aflatoxina B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub>, se realizó disolviendo cada uno de los estándares con una mezcla de benceno:acetonitrilo (98:2). De ésta solución se tomaron 10 ml y se aforaron a 100 ml con la mezcla de benceno:acetonitrilo. De dicha solución se realizó la curva patrón.



### 4.9.5.2.4 Preparación de muestras.

Las AF fueron extraídas de la muestra con metanol al 80%, el extracto fue filtrado, diluido con agua y pasado a través de una columna de inmunoafinidad, la cual contiene un anticuerpo monoclonal específico para AF B1, B2, G1 y G2. Fueron aisladas, purificadas y concentradas en la columna y posteriormente fueron eluidas con acetonitrilo. El eluido fue derivatizado con ácido trifluoroacético.

### 4.9.5.2.5 Derivatización de las aflatoxinas B1 y G1.

La derivatización de los estándares se realizó tomando 100  $\mu$ l de las soluciones estándar de AFB1 y AFG1, se le agregó 350  $\mu$ l de la solución derivatizadora (10 ml ATF, 5 ml ácido acético glacial y 35 ml de agua desionizada), se agitó con vortex durante 30 segundos. Posteriormente se llevaron a baño maría a una temperatura de 65 °C durante 10 minutos. Una vez transcurrido el tiempo se enfriaron a chorro de agua fría. Al usar ATF transforma a las aflatoxinas en hemiacetales G2a B1 a los cuales fluorescen altamente y el orden es: G<sub>1</sub>, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>2</sub>, (NOM 188; Jaimez, 2000).

### 4.9.5.2.6 Condiciones cromatográficas.

Se utilizó una fase móvil de agua:acetonitrilo:metanol (60:20:20). La columna se mantuvo a temperatura ambiente con un flujo de la fase móvil de 1.0 ml/min. Con una longitud de onda de excitación de 360 nm y una emisión de 440 nm. El volumen de inyección de la muestra fue de 20  $\mu$ l.

### 4.10 Tratamiento estadístico.

Las determinaciones se realizaron tres veces para poder realizar los análisis estadísticos de los datos obtenidos. Los datos fueron analizados mediante análisis de variancia (ANOVA) y Pruebas de rango múltiple de Duncan/Tuckey con una ( $P \leq 0.05$ ) empleadas para determinar la diferencia estadísticas entre las medias. Para estos análisis se utilizó el programa estadístico SPSS (Statistical Package for the Social Sciences versión 9.0, Student).



---

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---



### 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

#### 5.1 Características químicas de la pepita y productos a base de pepita verde de calabaza.

Las semillas, como la pepita verde de calabaza, poseen ciertas características que los hacen ser diferentes al resto de los productos vegetales. Su composición química las hace especialmente susceptibles al deterioro bioquímico, a la deshidratación y al desarrollo de hongos; son mayoritariamente susceptibles cuando están descascaradas y/o partidas, lo que limita su utilización en el consumo fresco e industrial.

En este trabajo se decidió realizar un análisis químico de la pepita verde de calabaza, así como de los productos a base de esta semilla, ya que en su gran mayoría no se cuenta con información bibliográfica por ser productos elaborados en su mayoría de manera artesanal y ser productos típicos de regiones específicas del país.

Se realizó un análisis químico (humedad, grasa, proteínas, cenizas, carbohidratos) de la pepita verde de calabaza (*cucurbita pepo*) y de diversos productos a base de pepita (humedad y grasa) comercializada en los mercados de Cuautitlán y en la Central de Abastos de la Ciudad de México para conocer el material de estudio, así como de los componentes mayoritarios que existen y para inferir las condiciones en las cuales son almacenados durante su comercialización.

Las semillas oleaginosas son un producto de mayor importancia, por lo general son utilizadas para la extracción de aceites debido a su contenido alto de grasas ya que el 50% de su composición química son lípidos. La pepita verde de calabaza a diferencia de muchas semillas como el girasol, cártamo, o maíz su uso es principalmente en consumo como ingrediente para algunas comidas típicas de México, como botanas, con cáscara y sal, o como ingrediente mayoritario de dulces.

En el tabla 18 se puede observar los componentes de la pepita verde de calabaza procedente de dos zonas de comercialización: Cuautitlán y la Central de Abastos.



**Tabla 18. Características químicas de la pepita verde de calabaza procedente de Cuautitlán (zona 1) y Central de Abastos (zona 2).**

Componente	Zona 1 (%)	Zona2 (%)	Referencia bibliográfica (%)
Proteína <sup>1</sup>	35.42 ± 1.98 a	32.87 ± 9.29 a	36.9
Humedad <sup>2</sup>	2.58 ± 0.12 a	4.59 ± 0.12 b	4.3
Grasa <sup>3</sup>	46.26 ± 0.34 a	51.46 ± 1.23 b	44
Cenizas <sup>4</sup>	9.43 ± 0.85 a	9.15 ± 0.97 a	4.8
Carbohidratos <sup>5</sup>	6.31 a	1.93 b	10

<sup>1</sup>: Método de Lowry <sup>2</sup>: Método de secado, <sup>3</sup>: Método de Soxhlet; <sup>4</sup>: Método de Klem, <sup>5</sup>: Por diferencia.

Los datos representan la media de tres repeticiones ± desviación estándar. Letras diferentes en cada fila indican que existe diferencia significativa entre las dos zonas ( $P \leq 0.05$ ).

Se puede observar que el contenido de proteína en la pepita verde de calabaza comercializada en la zona 2 fue ligeramente menor que la zona 1. La humedad de la pepita de la zona 2 fue mayor que la zona 1, encontrándose diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ); las cenizas para ambas zonas se encuentran en un rango similar; mientras que el contenido de grasa presentó diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) entre las dos zonas estudiadas, éste componente fue el mayoritario, siendo esta semilla es de gran utilidad en la industria aceitera. La muestra de la zona 1 presentó una mayor cantidad de carbohidratos que en la zona 2 encontrándose una diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ).

El contenido de agua es una de las características más importantes en las semillas, por su efecto en los mismos durante los diferentes procesos de cosecha y poscosecha. Es necesario conocer el contenido de humedad para los procesos de secado, durante el almacenamiento y para el procesamiento de semillas. Por su estrecha relación con el crecimiento de microorganismos e insectos en semillas, es indispensable tener un control



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

adecuado del contenido de agua en los mismos para disminuir los daños producidos por estos organismos. Este parámetro es de mucha importancia debido a que si no se llega a controlar desde el inicio de la cosecha, durante el almacenamiento podría estar contaminado con algún hongo.

Es importante para el tiempo de almacenamiento de los granos y semillas, a medida que la humedad aumenta el tiempo de almacenamiento se acorta. El contenido de humedad tiene un efecto en el predominio y en la actividad de insectos y hongos durante el almacenamiento (Casini y Rodríguez, 2004).

En la figura 19 se muestran los contenidos de humedad para la pepita verde, con cáscara, salada y en botana, los tres primeros presentaron una diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) entre ambas zonas. La muestra que presentó un mayor contenido de humedad fue la pepita cruda de la zona 2, y la pepita con cáscara de la misma zona presentó un menor porcentaje. La pepita en botana no presentó diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) para las zonas estudiadas.

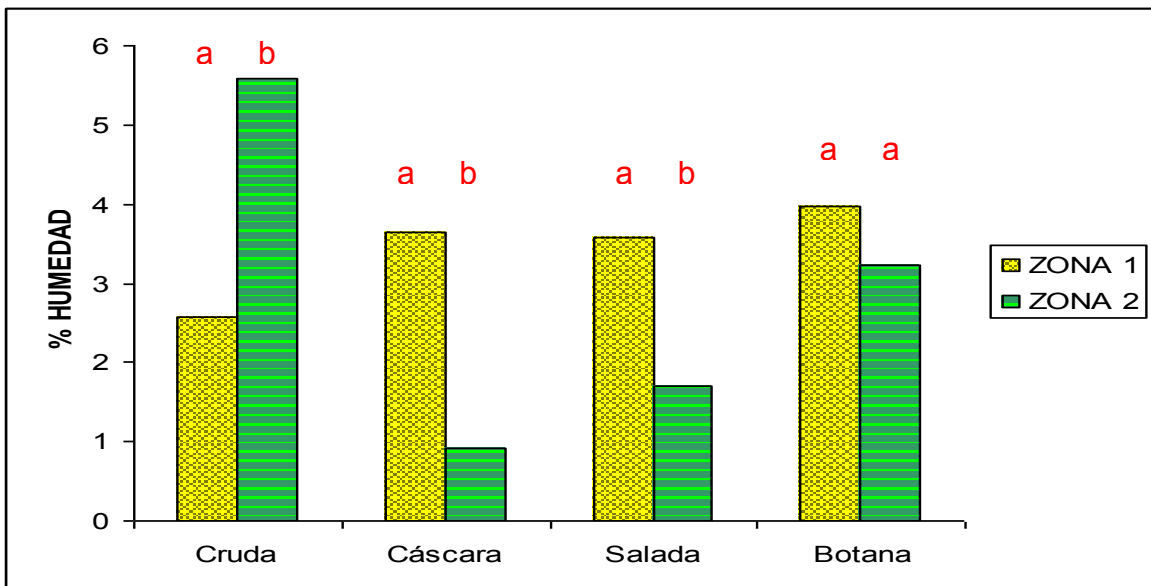


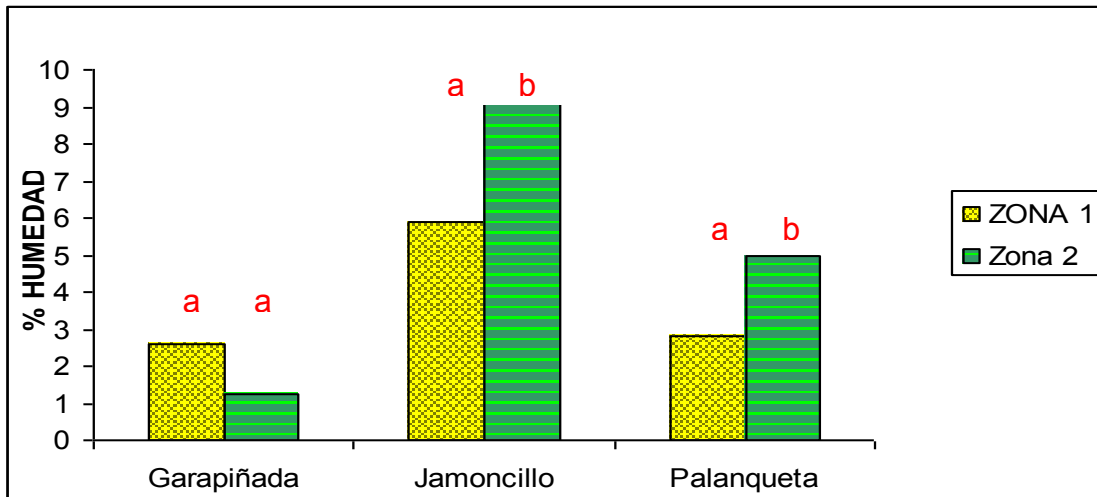
Figura 19. Contenido de humedad de botanas (pepita cruda, pepita con cáscara, salada y en botana) comercializados en Cuautitlán (zona 1) y Central de Abastos de Ciudad de México (zona 2).





Es importante que estos productos sean de alta calidad y que el contenido de humedad sea bajo para poderse almacenar durante un periodo largo.

Otro de los productos importantes son los dulces debido al consumo que se realiza en tiempos variados del día, consumiéndose desde los niños hasta los mayores de edad, por ello es importante que se realicen con un cuidado y un estricto control de calidad. En la figura 20 se muestra el contenido de humedad para los dulces. La pepita garapiñada para las dos zonas estudiadas fue el único producto que no presentó una diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ), el jamoncillo y la pepita en palanqueta de la zona 2 presentó un mayor contenido de humedad con respecto a la zona 1 encontrándose diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ). El jamoncillo de la zona 2 presentó un contenido de humedad cercano al 10 %.



**Figura 20. Contenido de humedad dulces (pepita garapiñada, en jamoncillo y palanqueta) comercializados en Cuautitlán (zona 1) y Central de Abastos de Ciudad de México (zona 2).**

El mole verde y el pipián son platillos típicos de las regiones de Puebla, Oaxaca, Michoacán y Guerrero, distribuyéndose por toda la región del país. Dichos productos deben de tener un mínimo de humedad, libres de cualquier microorganismo que pueda dañar y causar problemas de salud. En la figura 21 se puede ver que el mole de la zona 2 presentó una humedad del 11.8 % y no cumple con la norma mexicana (NMX-F-442-1982) que establece como máximo el 8%, provocando así que el producto sea susceptible al ataque de microorganismos, mientras que el proveniente de la zona 1 (4.8%) cumple



con el límite máximo. Sin embargo, el pipián no se encontró diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) para ambas y su humedad fue del 3%.

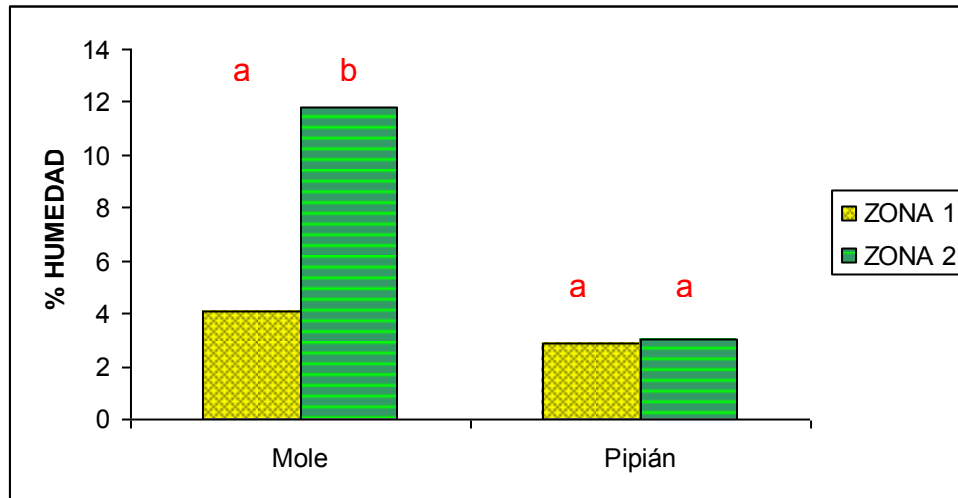


Figura 21. Contenido de humedad del mole y del pipián comercializados en Cuautitlán (zona 1) y Central de Abastos de Ciudad de México (zona 2).

Otro parámetro químico importante fue la grasa, ya que en este tipo de productos es un componente que se ve muy afectado en la calidad cuando se lleva a cabo un mal almacenamiento y/o proceso. El aceite de las pepitas de calabaza está considerado como una de las grasas vegetales más valiosas. Aproximadamente el 80 % de los ácidos grasos son insaturados, de los que entre el 50 y el 60 % son incluso polinsaturados. Los ácidos grasos polinsaturados de necesidad vital, están contenidos en alta medida y son un importante complemento para una alimentación integral. En la figura 22 se muestra el contenido etéreo de la pepita verde, con cáscara, salada y en botana, encentrándose en un rango del 30 al 60%. La pepita cruda presentó un contenido de grasa del 60 % y 45 % para la zona 2 y zona 1 respectivamente, mientras que la pepita en botana presentó un contenido de 40 y 60 % para el producto procedente de la zona 1 y zona 2, respectivamente. En ambos productos se encontró diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ). La pepita con cáscara y la salada no presentaron diferencia ( $p \leq 0.05$ ) entre las dos zonas estudiadas.

En los dulces (Fig. 23), el contenido de grasa fue en un rango del 20-40%. Para los diferentes productos no se encontró diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) entre el jamoncillo ni



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

la palanqueta de las diferentes zonas. Sin embargo, la pepita garapiñada de la zona 2 presentaron un contenido de grasa del 40 %, mientras que la zona 1 fue del 20 % solamente.

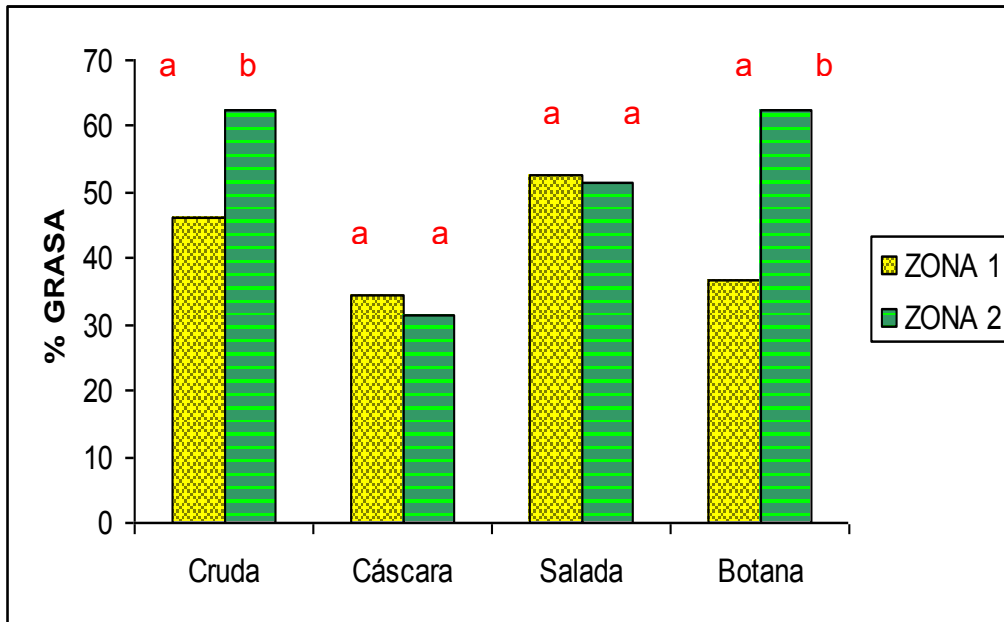


Figura 22. Contenido de grasa de las botanas (pepita cruda, con cáscara, salada y en botana) comercializados en Cuautitlán (zona 1) y Central de Abastos de Ciudad de México (zona 2).

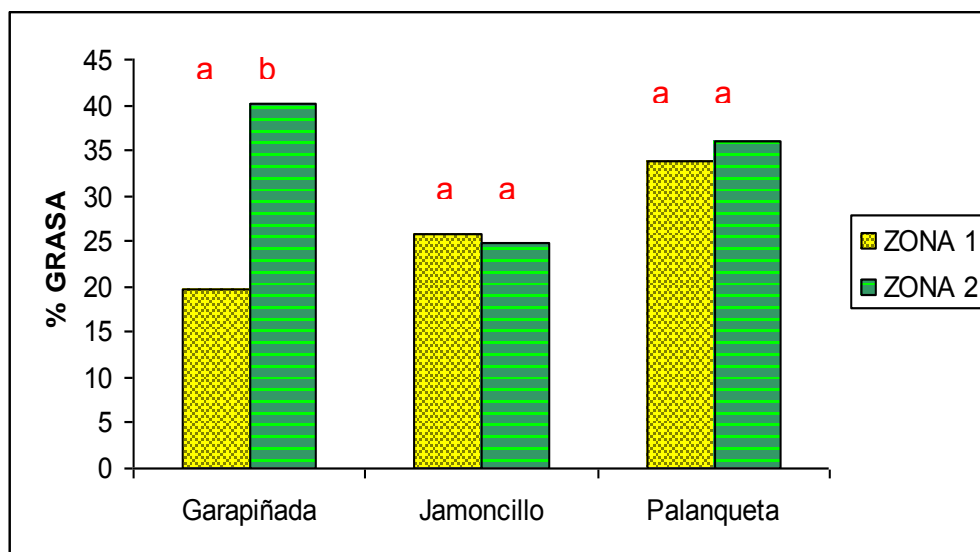


Figura 23. Contenido de grasa dulces (pepita garapiñada, en jamoncillo y palanqueta) comercializados en Cuautitlán (zona 1) y Central de Abastos de Ciudad de México (zona 2).



El mole y el pipián (Fig. 24) rebasaron el límite permitido según la Norma Mexicana (8%). Todos estos productos presentaron un contenido de grasa del 20-27 %. No se encontró diferencia ( $p \leq 0.05$ ) entre los dos productos de las zonas estudiadas.

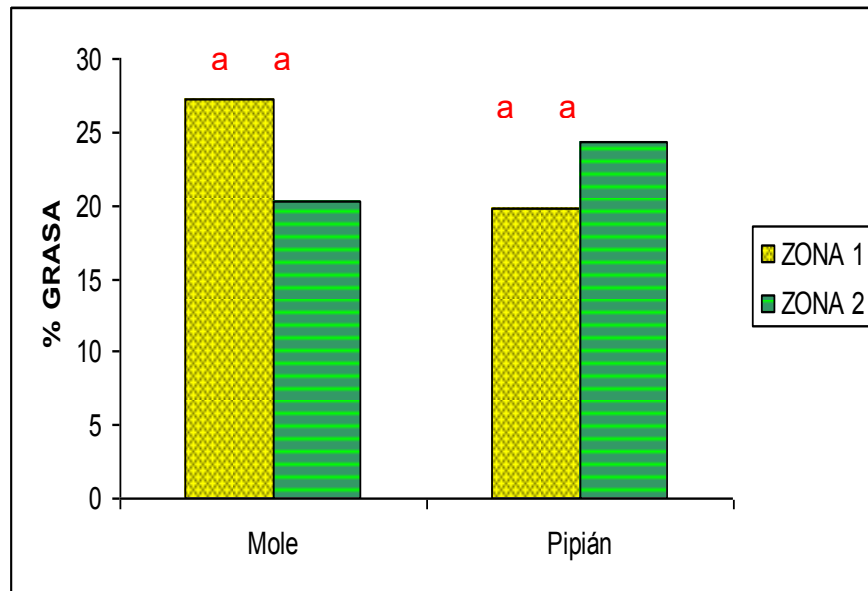


Figura 24. Contenido de grasa del mole y del pipián comercializados en Cuautitlán (zona 1) y Central de Abastos de Ciudad de México (zona 2).

Las diferencia en el contenido de grasa entre un mismo producto procedente de diferentes zonas, indica que en productos elaborados artesanalmente, la composición química varía ampliamente debido a los procesos no estandarizados, y esto se refleja en la vida útil del producto y la calidad final.

Un aspecto importante que puede afectar el contenido de grasa es la forma de secado al que fue sometido el producto. El contenido de humedad afectará la relación entre los componentes químicos de los productos, por lo que un mal almacenamiento que provoque la hidratación puede afectar el contenido de lípidos totales.

Las semillas que se encuentran mal preservados o fuertemente contaminados por hongos tienden a contener menos grasa. La grasa puede ser modificada por enzimas generadas por hongos (lipasas) o por el mismo grano (Serna-Saldivar, 2001).



Adams y Moss (1997) reportó que a una determinada  $a_w$ , las semillas ricas en aceites, por ejemplo los cacahuates, tienen un contenido de agua mucho menor que los cereales, de modo que los cacahuates con un contenido de humedad del 7.2% tienen una actividad de agua de aproximadamente 0.5-0.7 a 25°C. A parte del problema de la formación de micotoxinas en las semillas oleaginosas enmohecidas, varias especies de mohos tienen una intensa actividad lipolítica que ocasiona la contaminación de los aceites extraídos con ácidos grasos libres que, a su vez, pueden experimentar una oxidación para formar productos que coadyuvan a la rancidez. Los mohos lipolíticos más importantes son las especies de *Aspergillus* (*A niger*, y *A tamarii*), *Penicillium* y *Paecilomyces*, si bien a actividades de agua más elevadas las especies de *Rhizopus* también pueden ser importantes.

Los productos almacenados con un contenido alto de lípidos y niveles bajos de carbohidratos solubles son más sensibles a la alteración, esto significa que los aumentos ligeros en el contenido de humedad ocasionan aumentos bruscos del  $a_w$ , estos aumentos se deben a los desplazamientos de la humedad causado por temperaturas de almacenamiento irregulares (Internacional Comisión on Microbiological Specifications for Food, 2001).

El contenido de grasa es un factor importante que es utilizado como un indicador para las alteraciones bioquímicas y microbiológicas ya sea desde la cosecha, el transporte, el almacenamiento, la manipulación y durante el procesamiento de las materias primas.

El pH y la acidez de los alimentos son parámetros de gran importancia para el desarrollo y crecimiento de los microorganismos. En ocasiones, el efecto del pH también va ligado a la producción de las micotoxinas. Para las bacterias el pH para su desarrollo es de 4.5 a 8. Los hongos son capaces de crecer en amplios rangos de pH (3 a 8), habitualmente el óptimo es de 5 (Soriano, 2007). El pH puede modificar el sistema enzimático y el transporte de nutrientes en la célula microbiana. Como respuesta de los microorganismos cuando se encuentran fuera de su pH óptimo de crecimiento estos tienden a aumentar su fase de adaptación y con ello la posibilidad de una mejor supervivencia (Quintanar-Vidal, 2005).



En el tabla 19 se muestran los valores de pH de productos a base de pepita verde de calabaza procedente de dos zonas de comercialización. En las botanas (pepita cruda, con cáscara, salada y en botana) se presentaron valores del 4.8 al 6.6 y no se encontraron diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) entre ambas zonas. En los dulces los valores fueron del 6.1-6.7 y tampoco se encontró diferencia ( $p \leq 0.05$ ) significativa. Las muestras de pipián son las únicas que presentaron una diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) entre las dos zonas estudiadas. Los productos y la materia prima se encontraron en un rango de pH que facilitó el crecimiento de bacterias y hongos, por ello se verá reflejado en el contenido de hongos encontrados y por consiguiente en el contenido total de aflatoxinas.

**Tabla 19. pH de las botanas (A), dulces (B), moles (C) comercializados en Cuautitlán (zona1) y Central de abastos de la Ciudad de México (zona 2).**

<b>(A) Muestra Botanas</b>	<b>Zona 1 pH</b>	<b>Zona 2 pH</b>
Cruda	5.8 + 0.05 a	6.6 + 0.05 a
Cáscara	6.4 + 0.1 a	6.4 + 0.05 a
Salada	6.26 + 0.11 a	6.6 + 0 a
Botana	5.2 + 0 a	4.8 + 0.2 a
<b>(B) Muestra Dulces</b>	<b>Zona 1 pH</b>	<b>Zona 2 pH</b>
Garapiñada	6.1 + 0.11 a	6.2 + 0.05 a
Jamoncillo	6.6 + 0 a	6.7 + 0 a
Palanqueta	6.3 + 0.1 a	6.5 + 0.05 a
<b>(C) Muestra Moles</b>	<b>Zona 1 pH</b>	<b>Zona 2 pH</b>
Mole	6.4 + 0.1 a	6.4 + 0.03 a
Pipián	6.1 + 0.15 a	5.8 + 0 b

Los datos representan la media de tres repeticiones  $\pm$  desviación estándar.

Letras diferentes en cada fila indican que existe diferencia significativa entre las dos zonas ( $P \geq 0.05$ ).

Los parámetros de pH y la acidez de un producto es de suma importancia ya que este es un factor que favorece el desarrollo y el crecimiento de microorganismos ya sea desde el



almacenamiento hasta el procesamiento, y las características organolépticas de los productos.

En la figura 25 se muestra el contenido de acidez titulable en muestras de pepita verde de calabaza y productos procedentes de dos zonas de comercialización. Se encontró que los productos procedentes de la zona 2 presentaron un mayor contenido de acidez que los procedentes de la zona 1, esto indicó que se tuvo un mal almacenamiento y como consecuencia de esto se tuvo un gran número de microorganismos no deseados para el consumo de dichos productos.

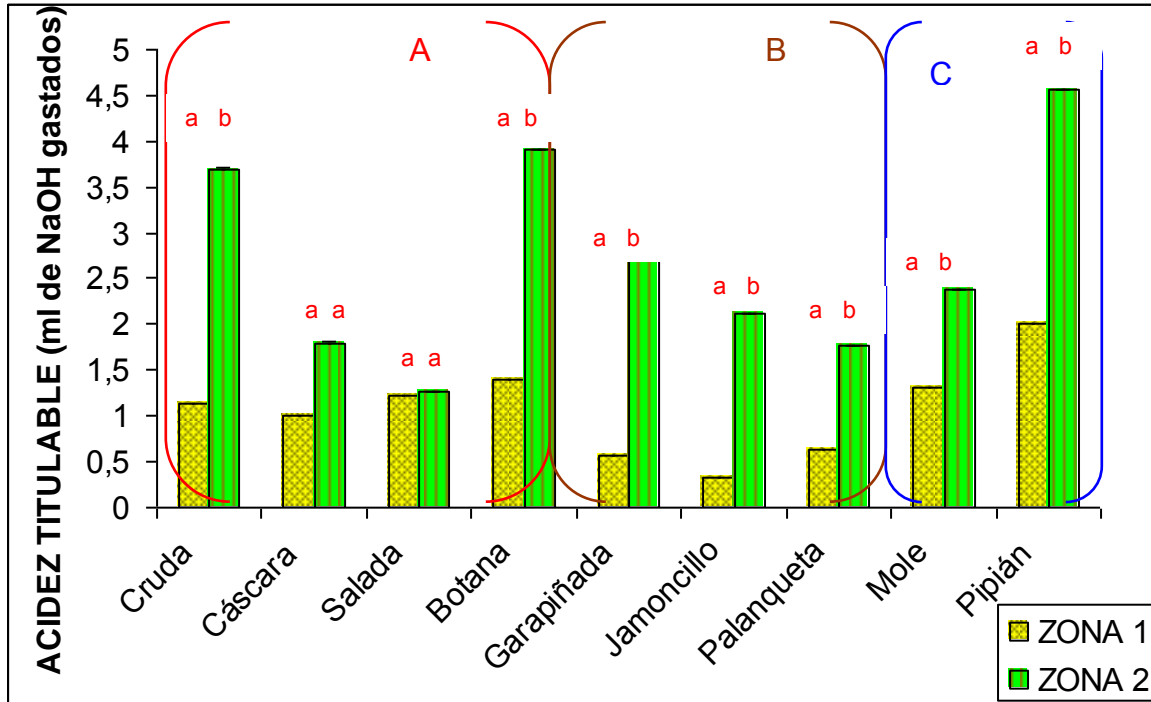


Figura 25. Acidez titulable de la pepita verde de calabaza y sus productos comercializados en la zona de Cuautitlán (zona 1) y Central de abastos de la Ciudad de México (zona 2).

La única muestra que presentó una diferencia significativa fue el pipián ( $p \leq 0.05$ ) para dichas zonas de comercialización. La acidez es un elemento favorable para el desarrollo micótico y formación de esporas.



**5.2 Características físicas de la pepita verde de calabaza y sus productos.**

Los parámetros físicos de la pepita verde de calabaza y de los productos procedentes de Cuautitlán y de la Central de abastos de la Ciudad de México fueron evaluados al llegar al laboratorio. Los atributos o características evaluados fueron: color, olor, sabor y textura. En las tablas 20, 21 y 22 se muestran las características de los diferentes productos evaluados a base de la pepita verde de calabaza.

**Tabla 20. Características físicas en botanas (pepita cruda, con cáscara, salada y en botana) procedentes de Cuautitlán (zona 1) y Central de Abastos (zona 2).**

Muestra	Color		Sabor		Olor		Textura	
	Zona 1	Zona 2	Zona 1	Zona 2	Zona 1	Zona 2	Zona 1	Zona 2
Cruda	Verde característico	Verde característico	Excelente	Bueno	Característico	Característico	Ni suave, ni duro	Ni suave, ni duro
Cáscara	Crema	Crema	Bueno	Bueno	Característico	Característico	Ni suave, ni duro	Ni suave, ni duro
Salada	Verde claro	Verde característico	Malo	Bueno	Ligeramente rancio	Característico	Suave	Ni suave, ni duro
Botana	Verde Característico	Verde Característico	Excelente	Excelente	Característico	Característico	Suave	Suave

En las muestras de la pepita cruda, con cáscara y en botana para las dos zonas estudiadas presentaron características físicas de buena calidad. En tanto la pepita salada de la zona de Cuautitlán (zona 1) presentaron sabor y olor a rancidez posiblemente a que las grasas contenidas en ellas se oxidaron provocando estos sabores y olores característicos de la reacción (tabla 20).

En el tabla 21 se muestran los dulces típicos analizados encontrándose con un buen estado físico ideal para el consumo, no se presentaron ninguna alteración en los cuatro parámetros estudiados.





**Tabla 21. Características físicas de dulces (pepita garapiñada, en jamoncillo y en palanqueta) a base de pepita verde de calabaza procedentes de Cuautitlán (zona 1) y Central de Abastos (zona 2).**

Muestra	Color		Sabor		Olor		Textura	
	Zona 1	Zona 2	Zona 1	Zona 2	ZONA 1	ZONA 2	ZONA 1	ZONA 2
Garapiñada	Dorado claro	Dorado claro	Excelente	Excelente	Característico	Característico	Crujiente	Crujiente
Jamoncillo	Característico	Característico	Excelente	Excelente	Característico	Característico	Suave	Suave
Palanqueta	Verde fuerte	Verde fuerte	Excelente	Excelente	Característico	Característico	Ni dura ni suave	Crujiente

Del mismo modo en el tabla 22 se muestran el mole y el pipián analizados encontrándose con un buen estado físico ideal para el consumo, no se presentaron ninguna alteración en los cuatro parámetros estudiados.

**Tabla 22. Características físicas de moles a base de pepita verde de calabaza procedentes de Cuautitlán (zona 1) y central de Abastos (zona 2).**

Muestra	Color		Sabor		Olor		Textura	
	Zona 1	Zona 2	Zona 1	Zona 2	ZONA 1	ZONA 2	ZONA 1	ZONA 2
Mole verde	Verde fuerte	Verde claro	Bueno	Bueno	Característico	Característico	Granuloso	Granuloso medio
Pipián	Rojo fuerte	Rojo fuerte	Bueno	Bueno	Característico	Característico	Suave	Suave

Diversos estudios han demostrado que la aceptación de un producto por parte del consumidor depende en buena medida de su apariencia y, por tanto, también de su color. Los alimentos naturales tienen su propio color, pero circunstancias como la variabilidad de las materias primas utilizadas en la elaboración de algunos productos y los procesos tecnológicos empleados (calor, acidez, luz, conservantes), provocan que el color sea distinto en cada lote de producción o bien que las sustancias colorantes naturales terminen por destruirse (Rodríguez, 2002). En este caso de la pepita verde de calabaza la clorofila es la responsable de dar el color característico. La clorofila puede sufrir distintos



tipos de alteraciones. La más frecuente, y la más perjudicial para el color de los alimentos vegetales que la contienen, es la pérdida del átomo de magnesio, formando la llamada feofitina, de un color verde oliva con tonos marrones, en lugar del verde brillante de la clorofila. Esta pérdida del magnesio se produce por sustitución por dos iones  $H^+$  y consecuentemente se ve favorecida por el medio ácido (Calvo, 2003).

Por otra parte, los alimentos no tienen en general un sabor único: lo que se percibe suele ser una sensación compleja originada por uno o más de los gustos básicos: ácido, salado, dulce y amargo. Los productos que presentan gustos ácidos, salados y dulces permiten -en general- establecer reglas asociadas a las funciones químicas o a la estructura química del producto. Los gustos salinos provienen en general de sales inorgánicas; los gustos dulces pueden predecirse a partir de la estructura química; los gustos ácidos están definidos por funciones carboxílicas en productos orgánicos y en el gusto característico de los ácidos inorgánicos. El sabor puede generarse mediante reacciones térmicas entre precursores durante la cocción, fritura u horneado. Deben existir moléculas volátiles para producir aroma y moléculas solubles en agua para generar gusto o pungencia (Novarom, 2000). La textura responde a un concepto muy antiguo. Para algunos autores es el conjunto de propiedades que se derivan de la especial disposición que tienen entre sí las partículas que integran los alimentos. Para otros, son las propiedades de un alimento capaces de ser percibidas por los ojos, el tacto, los músculos de la boca incluyendo sensaciones como aspereza, suavidad, granulosis. O también percepciones que tienden a constituir una valoración de las características físicas del alimento que se perciben a través de la masticación y también una valoración de las características químicas que se perciben a través del gusto.

Dichos parámetros están asociados a la calidad organoléptica y física de los productos alimenticios. Al consumir o al elegir un producto uno siempre se ve atraído por el color debido a que puede estar asociado con el estado de madurez; en el olor se puede distinguir si el alimento ya presentó algunas reacciones de deterioro; el sabor se perciben sustancias también indeseables y relacionados con el deterioro del mismo, del mismo modo al ingerir los alimentos podemos catalogar la consistencia que se tiene.



Debido a que la materia prima y los productos fueron evaluados al principio todos presentaron una buena calidad física excepto la pepita salada de la zona 1 que presentó un sabor y olor a rancidez.

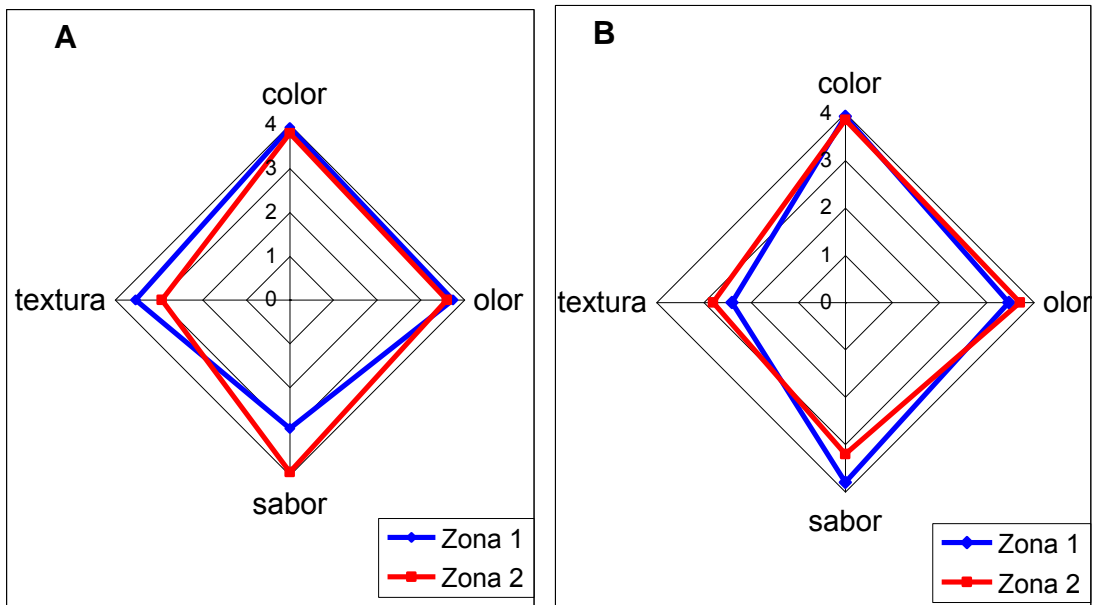
### 5.3 Análisis sensorial.

Toda empresa tiene como objetivo común lograr llegar al consumidor para que elija, entre miles de productos, el propio, y que vuelva a repetir, porque considera que es un producto adecuado para él.

El análisis sensorial es casi la única forma de eliminar o controlar errores superfluos. Proporciona respuestas a preguntas acerca de la calidad del producto. El color y la apariencia son el primer contacto que tiene el consumidor con un alimento, condicionando sus preferencias e influenciando su elección. El color está relacionado con las cualidades sensoriales, la composición química y, por lo tanto, uno de los factores que define la calidad de un producto alimentario. El sabor y la textura son dos criterios que se utilizan para caracterizar y aceptar o rechazar los alimentos. Se realizó un análisis sensorial a la pepita verde de calabaza y los productos procedentes de las dos zonas comercializadas con panelistas no entrenados calificando los atributos de: color, olor, sabor y textura utilizando una escala hedónica.

En la figura 26 se muestran los resultados obtenidos para las muestras de la pepita cruda y la pepita con cáscara, observando que la muestra de la pepita cruda de la zona 1 y la zona 2 presentaron olor y color semejantes, mientras que en el sabor la muestra de la zona 1 obtuvo una calificación de 2.9, ni agrada ni desagrada, en tanto que en la de la zona 2 obtuvo una puntuación de 3.9 como agradable. Para la textura las muestras de la zona 1 fueron evaluadas como suaves y en la zona 2 fue calificado como ni dura ni suave.

Para la pepita con cáscara color y el olor fue agradable para las dos zonas, mientras que para el sabor fueron evaluadas como agradable (3.8) y la textura se calificó como ni dura ni suave (2.8).



**Figura 26. Análisis sensorial de la pepita cruda (A) y la pepita con cáscara (B) comercializada en Cuautitlán (zona 1) y la Central de Abastos (zona 2).**

En la figura 27 la pepita salada para las dos zonas la textura y el color fueron semejantes; el sabor para la zona 1 y la zona 2 se calificó como ni agrada ni desagrada, mientras que el olor para la zona 1 se calificó como agradable (2.3) y la zona 2 como desagradable (4.3). En la pepita en botana para ambas zonas el olor fueron semejantes; color la zona 1 se calificó como ni agrada ni desagrada, mientras que la zona 2 fue agradable; en la textura las dos zonas fueron evaluadas como duras; el sabor para ambas zonas fue agradable.

En la figura 28 se puede observar que la pepita garapiñada y la pepita en palanqueta para ambas zonas fueron semejantes en todos los atributos calificados, mientras que la pepita en jamoncillo para ambas zonas el sabor, ni agrada ni desagrada, color fue agradable, la textura fue calificado como suave, y olor para la zona 1 se calificó como desagradable, mientras que el de la zona 2 como ni agrada ni desagrada.

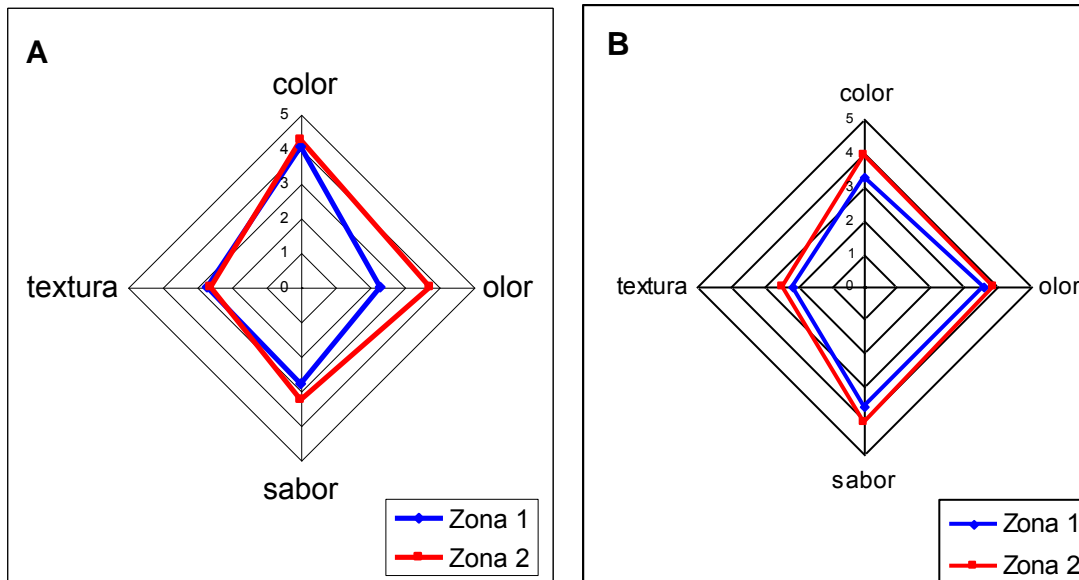


Figura 27. Análisis sensorial de la pepita salada (A) y la pepita en botana (B) comercializada en Cuautitlán (zona 1) y la Central de Abastos (zona 2).

En cuanto al mole y al pipián sólo se calificaron color y olor (tabla 23). El mole para ambas zonas fue calificado en color y olor, ni agrada ni desagrada; mientras que el pipián en el color fue semejante (ni agrada ni desagrada, con una calificación de 3.9) y en el olor para la zona 1 se calificó como desagradable, y la zona dos como ni agrada ni desagrada.

Tabla 23. Análisis sensorial del mole y del pipián comercializado en Cuautitlán (zona 1) y en la Central de Abastos (zona 2).

Atributo	Mole		<i>Pipián</i>	
	Zona 1	Zona 2	Zona 1	Zona 2
Color	3.6	3.6	3.9	3.9
Olor	3.6	3.5	2.7	3.5

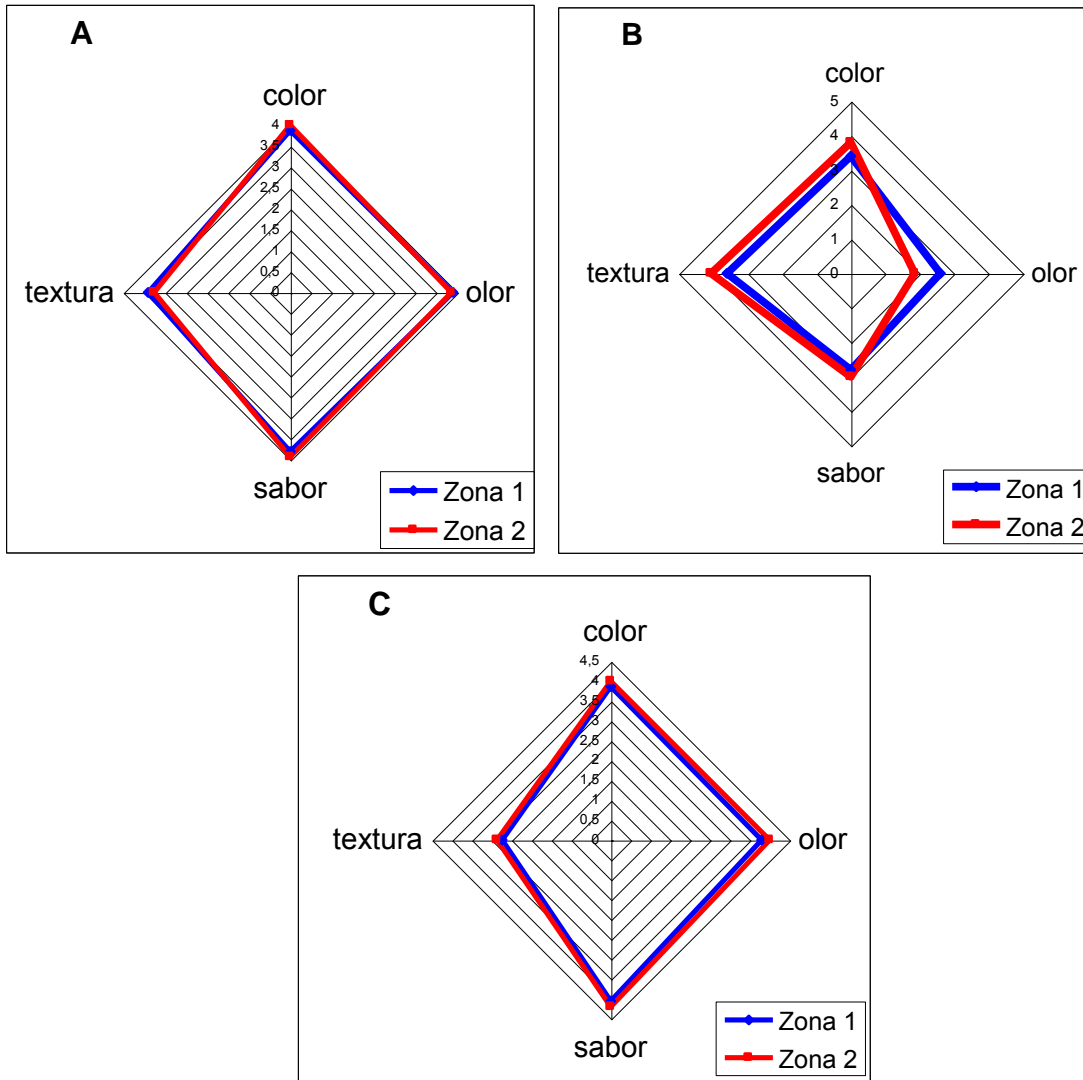


Figura 28. Análisis sensorial de la pepita garapiñada (A), en jamoncillo (B) y en palanqueta (C) comercializada en Cuautitlán (zona 1) y la Central de abastos (zona 2).

#### 5.4. Evaluación microbiológica de productos a base de pepita verde de calabaza.

Los parámetros microbiológicos son muy importantes dentro de la calidad de un producto debido a su importancia dentro de la inocuidad. Las enfermedades transmitidas por los alimentos causadas por peligros microbiológicos constituyen un problema de salud pública importante y creciente.



La mayoría de los países cuentan con sistemas para la notificación de casos de enfermedades transmitidas por los alimentos y han documentado durante las últimas décadas aumentos significativos en la incidencia de enfermedades causadas por microorganismos en los alimentos, incluyendo *Salmonella spp.*, *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes* o *E. coli* O157, entre otros.

La OMS ha investigado 391,383 casos de enfermedades transmitidas por los alimentos. En aproximadamente 23.538 brotes se identificó el agente causante *Salmonella spp.*, siendo responsable del 77% de ellos. Otros agentes causantes investigados incluyeron: *Staphylococcus aureus* (4%), *Trichinella* (3%), *Shigella* (3%), *Clostridium perfringens* (2%), hongos tóxicos (2%), *Campylobacter* (1%), virus (1%) y otro (7%) (OMS, 2002).

Diversos microorganismos se utilizan como organismos indicadores y son de gran utilidad para la determinación de la calidad bacteriológica de los alimentos (Thatcher, 1973).

Estos parámetros microbiológicos también indican la forma de manipulación que se realizó durante su proceso de producción y del contacto que puede tener dicho alimento con tierra, heces fecales u otra sustancia extraña que sea maligna para el hombre.

### 5.4.1 Coliformes totales.

Los coliformes fecales y *Escherichia coli* se utilizan en primer lugar para indicar una contaminación en principio potencialmente peligrosa. Dicha contaminación se produce de modo general por deficiencias en la limpieza y desinfección de las industrias y por falta de higiene de los operadores (Thatcher, 1973).

En la tabla 24 se observa que la pepita cruda procedente de la zona de Cuautitlán presentó 65000 UFC/g, en el pipián fue de 10000 UFC/g, mientras que en la zona de la Central de Abastos solamente en el pipián presentó 62000 UFC/g, lo que indicó que en la Central de Abastos se tiene una menor contaminación de estos microorganismos en la materia prima y en los productos.



En los productos procedentes de las dos zonas que no se detectaron coliformes totales fueron: pepita con cáscara, salada, botana, garapiñada, jamoncillo, palanqueta y moles. Mientras, que en el pipián de las dos zonas presentaron coliformes totales. El pipián de la zona 1 cumple con la norma de productos regionales (NMX-F-422-1982), mientras que el de la zona 2 rebasa el límite marcado. La presencia de coliformes puede deberse a la contaminación con heces fecales de algunos animales o de las mismas personas que se encuentran laborando en la zona. En el caso de la pepita cruda solamente se registró presencia en la zona 1, no se tiene norma para este tipo de semillas.

**Tabla 24. Coliformes<sup>a</sup> totales en la pepita verde de calabaza y sus productos comercializados en Cuautitlán (zona 1) y la Central de Abastos (zona 2).**

Muestra	Zona 1 (UFC/g)	Zona 2 (UFC/g)
Cruda	65000	NP
Cáscara	NP	NP
Salada	NP	NP
Botana	NP	NP
Garapiñada	NP	NP
Jamoncillo	NP	NP
Palanqueta	NP	NP
Mole verde	NP	NP
Pipián	10000	62000

NP: No presentaron coliformes totales.

<sup>a</sup>: Crecimiento en agar Mac Conkey e incubados a 37 °C durante 48 horas en diluciones de hasta 10<sup>-3</sup>.

### 5.4.2 Mesófilas aerobios.

La mayoría de los alimentos se consideran como no aptos para el consumo cuando contienen un gran número de microorganismos, aún cuando se sepa que estos





microorganismos no son patógenos y que no alteran los caracteres organolépticos del alimento.

En la tabla 25 se muestra el contenido de las bacterias mesófilas en la pepita verde de calabaza y sus productos.

**Tabla 25. Mesófilas aerobias<sup>a</sup> en pepita verde de calabaza y de los productos comercializados en Cuautitlán (zona 1) y la Central de Abastos (zona 2).**

<b>Muestra</b>	<b>Zona 1 (UFC/g)</b>	<b>Zona 2 (UFC/g)</b>
Cruda	258000	4600
Cáscara	NP	NP
Salada	3700	540
Botana	330	460
Garapiñada	590	400
Jamoncillo	NP	NP
Palanqueta	NP	410
Mole verde	950000	950000
Pipián	70000	870000

NP: No presentaron mesófilos aerobios.

<sup>a</sup>:Crecimiento en agar nutritivo, incubados a 35 °C durante 48 horas en diluciones de hasta 10<sup>-3</sup>.

Las muestras de pepita con cáscara y jamoncillo de ambas zonas no presentaron mesófilos aerobios, la pepita en palanqueta de la zona 1 no presentó, mientras que en la zona 2 fue de 410 UFC/g; la pepita cruda presentó 258,000 UFC/g y 4,600 UFC/g para la zona 1 y 2, respectivamente. La pepita salada de la zona 1 presentó una mayor concentración (3700 UFC/g) que la zona 2 (540 UFC/g). El mole para ambas zonas presentaron la misma concentración de mesófilos aerobios con 950,000 UFC/g y el pipián en la zona 2 presentó una mayor concentración con 870,000 UFC/g, ambos productos presentaron un alto contenido de mesófilos aerobios. Los recuentos altos indican que las



materias primas estaban contaminadas, y/o que la limpieza y desinfección no fueron las correctas, así como condiciones inadecuadas de los tratamientos térmicos durante proceso.

### 5.4.3 Hongos.

Las micotoxinas pueden ser producidas por muchos tipos de mohos sin embargo, la mayoría vienen de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, y *Fusarium*. No todos los hongos producen micotoxinas y un moho puede producir diferentes tipos de micotoxinas, lo que hace difícil generalizar acerca de su efecto en la salud humana.

En la tabla 26 se muestran los diferentes hongos que se identificaron en la pepita verde de calabaza y en los diferentes productos de las dos zonas estudiadas. Los hongos identificados fueron: *Rhizopus*, *Penicillium*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. clavatus*, *Alternaria* y *Fusarium*.

El jamoncillo fue el único producto que no presentó hongos posiblemente por la concentración de azúcares que tienen estos productos, provocando que el agua salga de las células reduciendo así el crecimiento de hongos debido a la presión osmótica (Nicholas, 1999). En el caso de la pepita garapiñada se identificó *Alternaria* en la zona 1, sin embargo, este hongo no es productor de aflatoxinas por lo que no existe riesgo para el consumidor. La *Alternaria* es un hongo que se encuentra presente por contaminación en el campo.

En la pepita salada de la zona 1 se identificaron *A. flavus*, *A. niger*, *Penicillium* y *Alternaria*, mientras que en la zona 2 presentaron además de éstos *Rhizopus* y *Fusarium*. Siendo de relevancia el *A. flavus*, que es hongo productor de aflatoxinas B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub>.

Cabe mencionar, que el producto de la zona 2 presentó una gran variedad de hongos, provocado seguramente por un mal almacenamiento. La presencia de *Alternaria* y *Fusarium* se deben principalmente a una mala manipulación en el campo. *Fusarium* es un género de hongo que en ocasiones causan enfermedades infecciosas como queratitis, onicomycosis, etc. Sin embargo, cada vez se describen más infecciones graves.



Tabla 26. Hongos<sup>a</sup> presentes en la pepita verde de calabaza y de los productos comercializados en la zona de Cuautitlán (zona 1) y la Central de abastos (zona 2).

Muestra	Zona 1	Zona 2
Cruda	<i>Rhizopus, Penicillium</i>	<i>Rhizopus</i>
Cáscara	<i>A. flavus, Penicillium, Rhizopus,</i>	NP
Salada	<i>A. flavus, A. niger, Penicillium, Alternaria.</i>	<i>A. flavus, A. niger, Penicillium, Rhizopus, Fusarium.</i>
Botana	<i>A. flavus, Rhizopus.</i>	<i>Rhizopus.</i>
Garapiñada	<i>Alternaria.</i>	NP
Jamoncillo	NP	NP
Palanqueta	<i>A. flavus, Penicillium, Rhizopus.</i>	<i>A. flavus, Rhizopus.</i>
Mole verde	<i>A. flavus, A. niger, Penicillium, Alternaria, Fusarium.</i>	<i>A. flavus, A. niger, Alternaria, Fusarium</i>
Pipián	<i>A. flavus, A. niger, Rhizopus.</i>	<i>A. flavus, Rhizopus.</i>

PN: No presentaron hongos.

<sup>a</sup>:Crecimiento en agar dextrosa papa, incubados a 25 °C durante 5 días.

En 1973 se describe la primera infección diseminada en un paciente con leucemia aguda. Desde entonces se han descrito muchos casos, especialmente en pacientes con alteraciones de la respuesta inmune, diabéticos, quemados, con heridas abiertas y contaminadas con tierra, con trastornos inmunológicos o con tratamiento inmunosupresor. Se han detectado concentraciones elevadas de anticuerpos frente a polisacáridos extracelulares en los sujetos sanos, lo que sugiere que existe un contacto frecuente con el hongo. Este tipo de hongo puede aislarse en la piel, en la córnea, esputo, hueso, sangre.



Por otra parte algunas variedades de *Rhizopus* también causan enfermedades como la Mucormycosis, enfermedad de Rhinocerebral es la forma más común, otros síndromes importantes incluyen enfermedades pulmonares, cutáneas, gastrointestinal y del riñón. Esta enfermedad tiene un índice de mortalidad muy alto de 50-85%. Las enfermedades pulmonares y gastrointestinales tienen un índice de mortalidad incluso más alto.

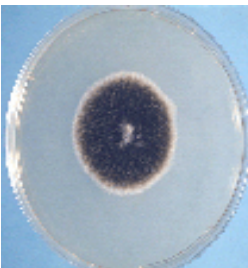
Los productos procedentes de la zona 1, presentaron una mayor presencia de hongos y en particular del hongo productor de aflatoxinas, en los únicos productos en los que no se detectó *A. flavus* fueron la pepita garapiñada, cruda y el jamoncillo.

En el caso de los productos procedentes de la zona 2, en los que no se identificó *A. flavus* fueron: pepita con cáscara, pepita en botana, pepita garapiñada y jamoncillo. Estos productos deberán ser analizados y la probabilidad de una contaminación por aflatoxinas es sumamente grande. Por otra parte, la presencia de *Penicillium* y *Fusarium* requiere de una identificación de la especie, ya que *Penicillium verrucosum* y *Fusarium sporotrichioides* son productores de ocratixina A y toxina T-2, respectivamente.

### 5.4.3.1 Descripción macroscópica.

El desarrollo de colonias sobre superficies de agar permitió identificar los microorganismos debido a que las especies forman a menudo colonias con una forma y aspecto característico (Lansing, 2002)

Para la identificación del hongo a nivel macroscópica se tuvo que analizar primero el lado anverso, observando el crecimiento de la colonia hongo si es radial, su forma y aspecto, es decir, si es algodonosa, pulverulenta, aterciopelada; y por último el reverso para determinar la pigmentación.

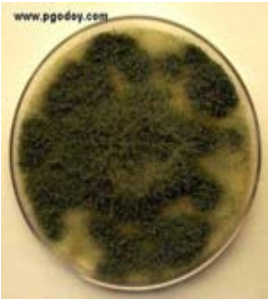


#### *Alternaria.*

Anverso: Colonia ilimitada, aquí está limitada. El color de la colonia fue café oscuro casi negro. Su forma y aspecto fue plana aterciopelada y está cubierta con un ligero vello blanco.

Reverso: Presentó una pigmentación café oscuro que difunde al

Figura 29. *Alternaria.* Medio.



**Figura 30. *A. clavatus*.**

*Aspergillus clavatus*.

Anverso: Su colonia fue ilimitada puede invadir todo el medio de cultivo, en este caso la colonia estaba limitada por otros hongos; el color fue verde azulado presentando un ligero halo blanco micelial. Su forma y apariencia fue granulosa y plana.

Reverso: No presentó pigmentación.



**Figura 31. *Aspergillus flavus*.**

*Aspergillus flavus*.

Anverso: Su colonia fue ilimitada puede invadir el medio de cultivo, en este caso estaba limitada por otros hongos. El color fue verde amarillento y presentó un halo blanco micelial en su periferia. Su forma y apariencia fue plana granulosa fina casi terrosa.

Reverso: No presentó pigmentación.

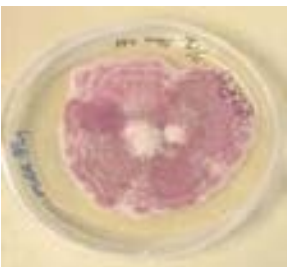


**Figura 32. *Aspergillus niger*.**

*Aspergillus niger*.

Anverso: Su colonia fue ilimitada puede invadir el medio de cultivo, en este caso esta limitada por otros hongos. Su color fue negro con un poco de amarillo verdoso a la periferia. Su forma y apariencia fue granulosa.

Reverso: No presentó pigmentación.



**Figura 33. *Fusarium*.**

*Fusarium*.

Anverso: El tamaño fue ilimitado, limitado por otros hongos. Su color fue rosa. Su aspecto y forma fue vellosa.

Reverso: Presentó una pigmentación naranja.

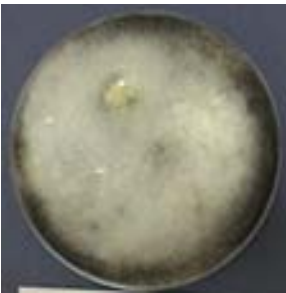


**Figura 34. *Penicillium*.**

*Penicillium.*

Anverso: Tamaño ilimitado. Su color fue verde azul y presentó un halo blanco en la periferia. Su aspecto y forma fue aterciopelada y plana.

Reverso: No presentó pigmentación.



**Figura 35. *Rhizopus*.**

*Rhizopus.*

Anverso: El tamaño fue ilimitado. El color negro. Su forma y aspecto fue vellosa algodonosa.

Reverso: No presentó pigmentación.

**5.4.3.2 Descripción microscópica.**

Una vez identificado el hongo macroscópicamente se realizó una identificación microscópica (con una cámara digital marca Minolta) para poder distinguir mediante su morfología de las colonias los diferentes géneros que podrían presentarse en cada muestra del alimento.



**Figura 36. *Alternaria*.**

*Alternaria.*

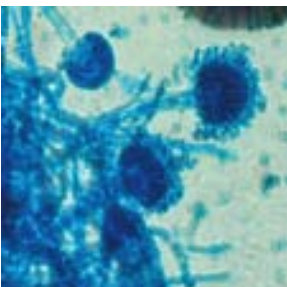
*Sus hifas son segmentadas, los macroconidios son multicelulares con segmentaciones transversales y longitudinales en forma de granada o de palillos de tambor.*



*Aspergillus clavatus.*

Sus hifas son hialinas, su vesícula claviforme (tiene la estructura de un cerillo).

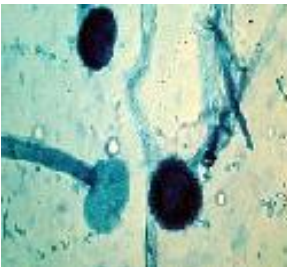
**Figura 37. *Aspergillus clavatus.***



*Aspergillus flavus.*

Sus hifas son hialinas y segmentadas, sus conidios se encuentran uniseriada y biseriada

**Figura 38. *Aspergillus flavus.***



*Aspergillus niger.*

*Sus hifas son hialinas, sus conidioforos son largos, el conidio es oscuro y su vesícula es grande y redonda.*

**Figura 39. *Aspergillus niger.***



*Fusarium.*

Los macroconidios son curvados pluriseptados, con una célula apical más o menos puntiaguda

**Figura 40. *Fusarium.***



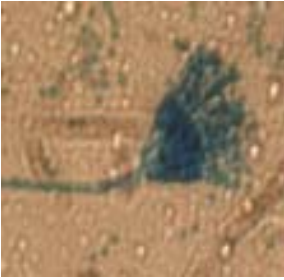


Figura 41. *Penicillium*.

### *Penicillium*.

Sus hifas son hialinas y segmentadas, los conidioforos dan lugar a las fialides ramificadas que forman un cepillo.



Figura 42. *Rhizopus*.

### *Rhizopus*.

Los esporangioforos son largos y emergen de rizoides; los esporangios son oscuros.

## 5.5 Aflatoxinas.

A pesar de que en México, la Norma indica niveles de 20 ppb, existen muchos productos como los del presente estudio, que no cumplen lo establecido. En el tabla 27 se muestran los resultados obtenidos de aflatoxinas totales por columnas de inmunoafinidad presentes en la pepita verde de calabaza y de sus productos procedentes de la Central de Abastos de la ciudad de México y de Cuautitlán. Se muestra que todos los productos a base de pepita verde de calabaza presentaron aflatoxinas totales, con niveles desde 1 hasta 205 ppb. Los productos de la zona I que rebasaron los niveles permisibles fueron la pepita salada con 86 ppb y el mole con 24 ppb. Mientras que, en la zona II la pepita en botana y la palanqueta presentaron 130 y 205 ppb, respectivamente.

Si se tomará como referencia la legislación de la Unión Europea el límite permisible de las aflatoxinas para alimentos de consumo humano sería de 4 ppb, por lo que casi todas las muestras del presente estudio no son aptas para el consumo humano. Sin embargo, la FDA y la NOM-188-SSA1-2002 permiten niveles más altos. Se puede observar que la Unión Europea tiene un estricto control en la calidad de los alimentos, por lo que estos productos no podrían ser comercializados en esos países por no cumplir con la norma.





Tabla 27. Aflatoxinas totales de la pepita verde de calabaza y sus productos comercializados en la zona de Cuautitlán (zona 1) y la Central de abastos (zona 2).

MUESTRA	ZONA 1 (ppb)	ZONA 2 (ppb)
Cruda	3 ± 1 a	2 ± 0.5 a
Cáscara	9 ± 1 a	5 ± 0.47 a
Salada	86 ± 24 a	16 ± 0 b
Botana	7 ± 0.5 a	130 ± 30 b
Garapiñada	4 ± 0 a	1 ± 0 a
Jamoncillo	5 ± 2 a	2 ± 1 a
Palanqueta	5 ± 3 a	205 ± 35 b
Mole verde	24 ± 2 a	7 ± 1.5 a
Pipián	7 ± 2 a	5 ± 0.5 a

Letras iguales para cada producto indican que no existe diferencia significativa entre las zonas de comercialización ( $p \geq 0.05$ ).

La materia prima (pepita verde de calabaza) no presentó diferencia significativa ( $p \geq 0.05$ ) entre las dos zonas de estudio. Mientras que, la pepita salada de la zona 1 rebasó las 20 ppb, en esta muestra se detectó la presencia de *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Fusarium*, éstos hongos son productores de aflatoxinas como aflatoxina B1, B2, G1, G2, Ocratoxina A, Fumonisina A, Toxina T2, Desoxinivalenol.

El contenido de aflatoxinas en la pepita en botana presentó estadísticamente una diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) ya que se obtuvieron 7 ppb en la zona 1 y para la zona 2 130 ppb, a pesar de que el producto de esta zona no presentó hongos productores de aflatoxinas, la presencia de estos metabolitos se puede explicar ya que el hongo pudo morir en el proceso, mientras que la toxina es termoresistente. La existencia de hongos en alimento no indica necesariamente una contaminación con micotoxinas, pero sí es un



factor de riesgo importante para que estas se produzcan, del mismo modo, puede detectarse una aflatoxina sin la presencia del hongo productor, ya que éste pudo haber sido inactivado por tratamientos térmicos o alteración de factores ambientales. Como fue el caso del jamoncillo y el garapiñado.

Uno de los productos que presentó una gran cantidad de aflatoxinas totales con 205 ppb fue la pepita en palanqueta de la zona 2, presentando diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) con respecto a la zona 1. Las condiciones en las que se encuentran estos productos en la Central de abastos de la Ciudad de México no son las adecuadas ya que los establecimientos no se tiene un control de la temperatura ni de la humedad y esto provoca que los productos se contaminen durante su comercialización.

El mole es alimento de gran importancia a nivel cultural presentó 24 y 7 ppb en la zona 1 y 2, respectivamente. El mole procedente de zona 1 rebasa los límites de la norma por lo que no sería apto para consumo humano.

Por otra parte, fue necesario realizar la identificación del tipo de aflatoxina presente, ya que la toxicidad de cada una es diferente y por lo tanto, no será lo mismo tener un alimento con 20 ppb de aflatoxina B1 que B2.

Se realizó la identificación de las aflatoxinas presentes en las muestras que rebasaron el contenido de 20 ppb de aflatoxinas totales, por el método de HPLC encontrándose sólo la presencia de la aflatoxina G<sub>2</sub>. Ésta aflatoxina es obtenida a partir de la G<sub>1</sub>, en medios fuertemente ácidos y la G<sub>1</sub> es el resultado del metabolismo de los hongos micotoxigénicos.

En la figura 43 se muestra el cromatograma de las diferentes muestras del estudio conteniendo la AFG<sub>2</sub>. En la Tabla 28 se muestra el contenido de aflatoxina G<sub>2</sub> en las muestras que rebasaron el contenido de 20 ppb de aflatoxinas totales. Se procedió a identificar a la aflatoxina presente en los productos que no cumplieron con los límites de la Norma, encontrándose que los niveles de AFG<sub>2</sub> fueron para la palanqueta de 143 ppb. Los demás productos presentaron niveles ligeramente inferiores al registrado por el método de columnas de inmunoafinidad. Esto se debió al proceso de almacenamiento



que sufrieron las muestras, ya que no fueron inmediatamente analizadas como se indica en la bibliografía analítica.

Todas las muestras presentaron la misma aflatoxina, G2, coincidiendo con trabajos en productos secos como: pistache, frutos secos y trigo (Aran *et al.*, 1994; González, 2001; Barros *et al.*, 2003; Hernández y Sanz (2003).

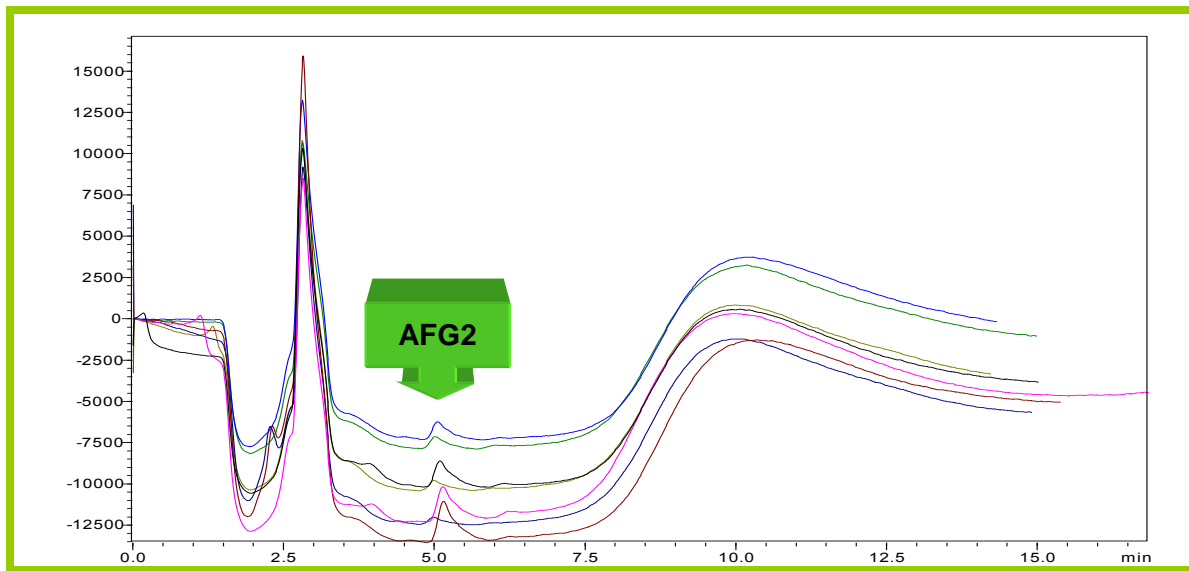


Figura 43. Cromatógrama de las muestras estudiadas.

- salada (zona 1)
- Mole (zona 1)
- P. salada (zona 2)
- P. en palanqueta (zona 2)
- P. en botana (zona 2)
- P. con cáscara (San Andrés Atocpan)
- Mole (San Andrés Atocpan).

El Comité Científico de la Alimentación Humana de la UE señala que la AFG2 ha sido estudiada sólo en animales, resultando que las pruebas de toxicología fueron insuficientes como para que esta aflatoxina sea clasificada como cancerígena a diferencia de la AFB1 que existen suficientes evidencias a cerca de su carácter carcinogénico para el hombre. Sin embargo, el que la AFG2 no sea considerada como carcinogénica no implica que no provoque daños a la salud, diversos autores señalan algunos efectos fisiopatológicos por la ingesta de aflatoxinas G, como daño hepático agudo, inducción de tumores, disminución de la eficacia del sistema inmunitario y acumulación en tejidos (Soriano, 2007).



**Tabla 28. Contenido de aflatoxina G2 en pepita verde de calabaza y productos (HPLC).**

Muestra	AFG2 (ppb)
Pepita salada (zona 1)	69.87
Mole (zona 1)	25.97
Pepita salada (zona 2)	7.496
Pepita en botana (zona 2)	98.61
Palanqueta (zona 2)	143.36

Los resultados indicaron que la zona de comercialización, las condiciones del proceso, y almacenamiento fueron factores importantes en la calidad de estos productos, y se requiere encontrar las fuentes de contaminación para eliminar los riesgos y peligro para la salud de los consumidores de estos productos.

No se han encontrado trabajos donde reporten presencia de aflatoxinas en la pepita verde de calabaza ni en productos elaborados artesanalmente (moles y dulces), sin embargo, Bankole *et al.* (2006) reportaron que de 137 muestras, el 32 % de pepita de melón del bosque y el 21% de la sabana en Nigeria presentaron aflatoxina B1, en un rango de 2.3 a 47.7  $\mu\text{g/Kg}$  y 2.3 a 25.1  $\mu\text{g/Kg}$ , respectivamente, encontrando también *Aspergillus flavus* como hongo predominante (62 y 57% de las muestras) en ambas zonas. Thie *et al.* (2007), encontraron que de 19 muestras de pasas el 16 % presentaron aflatoxina B1 con un máximo de 2.0  $\mu\text{g/Kg}$ ; y el 53% de las muestras de higos secos obtuvieron un rango de 0.3 a 2.0  $\mu\text{g/Kg}$  sin embargo, sólo en una muestra presentó 1500  $\mu\text{g/Kg}$  de ésta misma aflatoxina. Zinedine *et al.* (2006) encontraron Ocaratoxina A en: maíz 7.22  $\mu\text{g/Kg}$ , trigo 0.42  $\mu\text{g/Kg}$  y cebada 0.17  $\mu\text{g/Kg}$ ; fumonisina B1 sólo en el maíz un rango de 1930-5960  $\mu\text{g/Kg}$ . Además en los tres granos estudiados reportaron aflatoxinas y zearalenona en niveles bajo. También reportaron que en 14 muestras de pimiento rojo en polvo el 100% presentaron aflatoxina B1 en una concentración del 2.88 a 5.23  $\mu\text{g/Kg}$ .



### 5.6 Relación de la presencia de aflatoxinas con el proceso artesanal de elaboración de mole verde en San Pedro Atocpan.

Para determinar la fuente de la presencia de aflatoxinas en mole verde, se planteó la visita y muestreo en una zona productora de este producto, siendo San Pedro Atocpan uno de los lugares en donde se produce la mayoría del mole comercializado en el Distrito Federal. Por esta razón, se realizó este estudio de campo que permitió conocer el proceso de elaboración y las condiciones reales en que muchas microempresas y/o empresas familiares se dedican a la producción de mole, producto ampliamente consumido en nuestro país.

Los moles ocupan un lugar predominante en la cocina mexicana. Existe una gran variedad de ellos. Hay moles de distintos colores: verde, negro, amarillo, rojo según los ingredientes empleados y de las distintas regiones en la cual se elabora (Lomelí, 2004).

Como en la mayoría de estos productos tradicionales mexicanos, no existen procesos establecidos para su elaboración. La mayoría de los moles se realizan a partir del conocimiento adquirido de generación en generación por las tradiciones culturales de las comunidades. De esa manera, algunos siguen realizando éste producto a partir del trabajo familiar por medio de pequeños talleres establecidos en las propias casas de los productores o en microempresas.

#### 5.6.1 Proceso de elaboración del mole verde.

Con la apertura de la economía, los productores de alimentos mexicanos se han preparado para buscar nichos de mercado que abran oportunidades de desarrollo para competir tanto a nivel nacional como internacional. Dentro de esos espacios de mercado se pueden ubicar a los alimentos tradicionales mexicanos industrializados que han aumentado en número y variedad en pocos años (FAO, 1991).

Existen tres tipos de presentación del mole:

- ❖ Tipo I. Mole en polvo granulado o comprimido. Polvo seco, granulado o comprimido de fácil suspensión.
- ❖ Tipo II. Mole en pasta. Pasta semisólida de suavidad homogénea.
- ❖ Tipo III. Mole líquido. Líquido semifluído o espeso de acuerdo a la variedad.



En este proyecto se trabajó con mole tipo I y en la figura 44 se presenta el diagrama de bloques para la elaboración del mole y las imágenes presentadas corresponden al lugar y materiales utilizados en el proceso de elaboración de una empresa dedicada a la elaboración de moles artesanalmente en San Pedro Atocpan, Xochimilco.

### 5.6.2 Descripción del proceso.

**Recepción de materia prima.** La materia prima (pepita verde de calabaza) fue traída desde Morelos y Guerrero, al llegar la pepita verde de calabaza se almacenó a temperatura ambiente hasta su uso (Fig. 45).



Figura 45. Almacenamiento de la materia prima.

**Limpieza y acondicionamiento de materias primas.** La limpieza de la pepita se realizó por medio de un cernidor para eliminar las partículas no deseadas en la elaboración como basura, polvo, pedazos de ramas y otros compuestos. Este proceso se realizó manualmente (Fig.46).

El ajonjolí fue el único ingrediente que se tostó en un tostador cilíndrico durante una hora a 180-200 °C (Fig. 47).

El perejil y el cilantro se lavó y fueron picados finamente (todo esto se realizó manualmente). Todos los ingredientes se colocaron en tinas previo a su molido (Fig. 48).

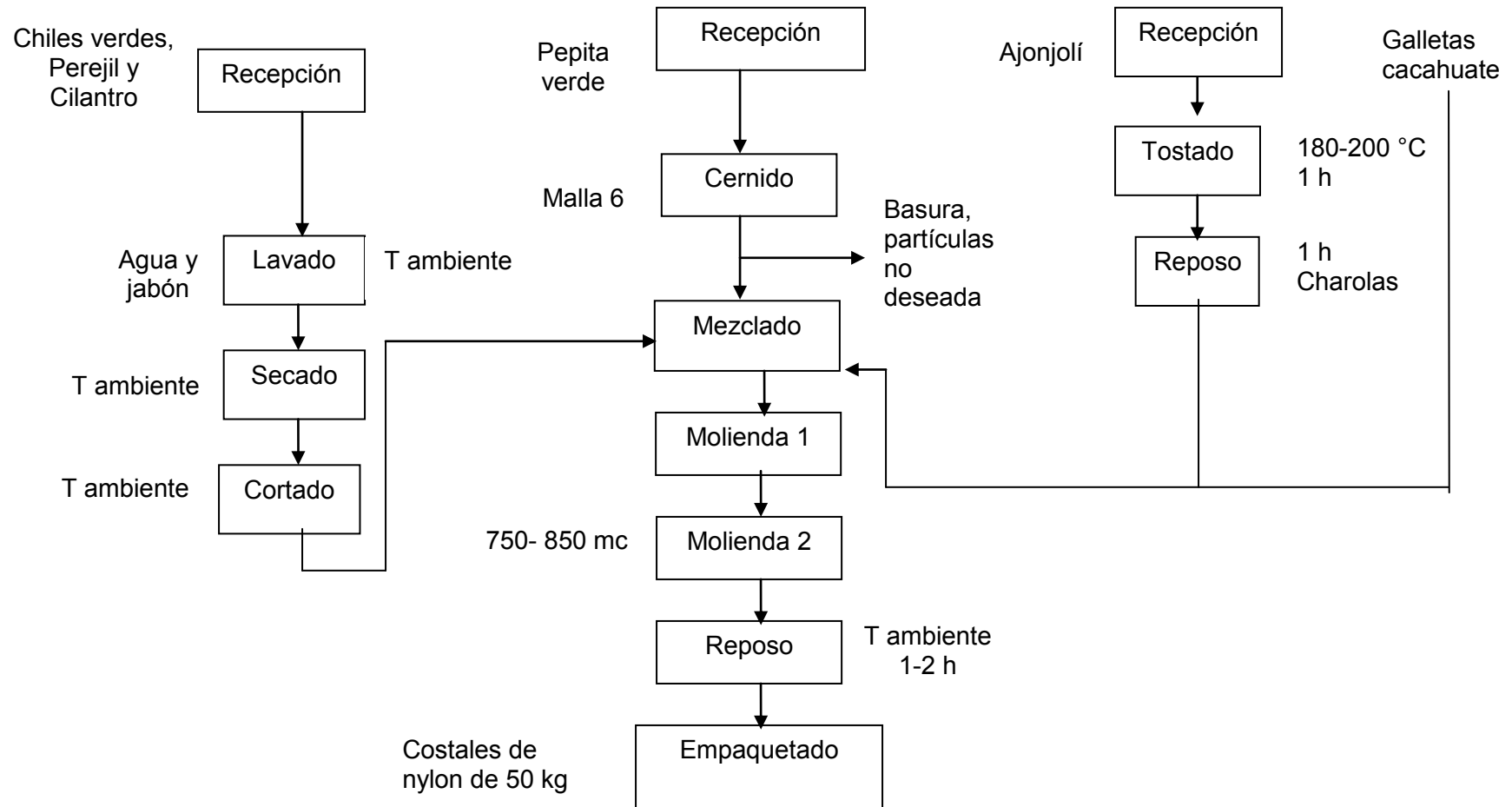


Figura 44. Diagrama de proceso de mole verde elaborado artesanalmente.



**Figura 46. Cernidor de materias primas para la elaboración de mole.**



**Figura 47. Tostador cilíndrico para el ajonjolí.**



**Figura 48. Perejil y cilantro picados para elaboración de moles.**





**Molienda.** Posteriormente se realizó una primera molienda de la pepita verde de calabaza con todos los ingredientes en un molino de discos, terminando la primera molienda se realizó una segunda molienda aproximadamente 1 hora, esto con el fin de obtener un tamaño de partícula deseada, en otros establecimientos llegan a realizar 6 moliendas para obtener un tamaño de partícula menor (Fig. 49).



Figura 49. Molienda de los ingredientes en un molino de discos.

**Reposo.** Por último, se realizó un reposo a temperatura ambiente por 1 a 2 horas con el fin de esperar que el mole se enfríe y pueda ser envasado para su almacenamiento y venta.

**Envasado.** El mole fue envasado para su almacenamiento en costales de nylon con una capacidad de 50 kg a una temperatura ambiente.

Esta empresa tiene una producción de 400 kg por día y distribuye su producto en San Pedro Atocpan, en mercados de sus alrededores, en la Central de Atizapán de Zaragoza y en la Central de Abastos de Ermita Iztapalapa.



### 5.6.3 Utensilios y equipos utilizados en la elaboración de mole verde.



Figura 50. Molino de discos.

La molienda se llevó a cabo en molinos de discos. En algunas microempresas aún utilizan molinos de piedra. Como se puede ver en la figura 50 que la limpieza del equipo no era la adecuada. En esta empresa se encontraron algunos molinos sucios (con residuos de mole y de otras materias primas).



Figura 51. Cernidores.

Los cernidores que se utilizaron fueron de madera con una malla de alambre. Estos utensilios fueron limpiados con una brocha. Algunos de ellos se encontraban rotos y sucios (Fig. 51).



Figura 52. Utensilios utilizados en la molienda.

En el momento de realizar la molienda se utilizaron unos trozos de madera de aproximadamente de 20 x 10 cm como objeto de ir introduciendo los ingredientes. Como se puede observar estos utensilios se encontraban desgastados y sucios (Fig. 52).



Los ingredientes antes de ser molidos y al término del proceso se colocaron en bandejas de aluminio, las cuales se encontraron manchadas por otros ingredientes que utilizaron para realizar moles rojos (Fig. 53).


**Figura 53. Bandejas de aluminio.**

A continuación se realiza la descripción de aspectos relevantes relacionados con los lugares en donde se llevó a cabo la investigación de campo:

#### **5.6.4 Instalaciones.**

En la microempresa se observó que las instalaciones presentaron las siguientes características (tabla 29):

**Tabla 29. Características de las instalaciones**

<b>Instalación.</b>	<b>Características</b>
	Las ventanas estaban cubiertas con papel y en los techos se encontraban orificios, lo cual podría provocar que pájaros y otros animales tuvieran acceso a las instalaciones y propiciar una contaminación.



**Tabla 29. Características de las instalaciones (continuación).**

<b>Instalación.</b>	<b>Características</b>
	En el almacenamiento el producto se llevaba a cabo en cuartos sin ventilación, lo cual provocaba que los olores de todos los productos se mezclaron (en este almacén guardaban tamarindo, chiles, galletas, semillas de girasol, entre otros).
	Las paredes se encontraban sucias y raspadas, lo que representa una mayor susceptibilidad al crecimiento de microorganismos y un mayor riesgo potencial de contaminación de los productos. El piso se encontraba sucio.
	Algunos de los ingredientes se encontraban en el piso, esto podría provocar una contaminación de la materia prima, además como se mencionó anteriormente, el piso se encontraba sucio.

Algunos de los ingredientes se encontraban en el piso, esto puede provocar que los animales que se encuentren cerca contaminen la materia prima, además como se mencionó anteriormente que el piso se encontraba sucio.



### 5.6.5 Limpieza del personal.

Se observó que el personal de la microempresa no contaba con ninguna medida de seguridad, es decir, no utilizaban cofia, cubre bocas, guantes; ninguno de ellos se lavaban las manos y además la mayoría de los operadores llevaban gorras, lo cual no es lo adecuado para realizar un proceso de cualquier alimento, cumpliendo con las buenas prácticas de manufactura. Por otra práctica observada fue que los operadores del tostador se limpiaban con sus manos el sudor provocado por el calor generado durante y seguían manipulando las materias primas provocando una contaminación.

#### 5.6.5.1 Sistema de limpieza.

En la empresa no se contaba con un sistema de limpieza y desinfección. Los utensilios solamente eran limpiados con una franela, lo cual puede provocar la proliferación de microorganismo no deseados.

### 5.6.6 Calidad de materias primas y productos.

Los resultados obtenidos del proceso de la elaboración del mole verde se muestran en la tabla 30.

La pepita cruda fue la materia prima con mayor contaminación en coliformes totales. La norma para el mole indica un límite permitido de 11,000 UFC/g, mientras que el mole elaborado en esta microempresa no presentó coliformes totales indicando que a pesar de las condiciones de elaboración no se tuvo una contaminación por estos microorganismos.

El mole presentó una mayor contaminación por bacterias mesófilas, esto se debió a que al término del proceso de elaboración del mole se encontró expuesto al medio ambiente y como se mencionó la microempresa no contaba con unas instalaciones adecuadas. Por otra parte, la pepita cruda y con cáscara también presentaron cuentas altas de mesófilos indicando un mal almacenamiento. En lo referente a la presencia de hongos, se identificaron para los tres casos presencia de *Rhizopus* y *Penicillium*, solamente en la pepita con cáscara y el mole se identificó *Aspergillus niger*. Esto indica que no se tienen condiciones adecuadas para el almacenamiento (humedades relativas del 70 al 90 %) debido a que estos hongos son de almacén. Como se puede observar, no se identificaron hongos productores de aflatoxinas. El contenido de aflatoxinas ( $G^2_2$ ) (tabla 31) presentes



en la materia prima y del producto terminado cumplen con la norma mexicana ya que se presentaron niveles muy bajos de estos compuestos, por lo que no presenta ningún problema de salud y fue apto para el consumo humano.

**Tabla 30. Análisis microbiológico de las materias primas y del mole elaborado en San Pedro Atocpan.**

<b>Materia</b>	<b>Coliformes<sup>a</sup> (UFC/g)</b>	<b>Mesófilos aerobios<sup>b</sup> (UFC/g)</b>	<b>Hongos<sup>c</sup> identificados</b>
Pepita cruda	27,500	280000	<i>Rhizopus, Penicillium.</i>
Pepita con cáscara	4,500	95000	<i>Rhizopus, Penicillium, Aspergillus niger</i>
Mole	NP	325000	<i>Rhizopus, Penicillium, Aspergillus niger</i>

NP: No presentó coliformes.

<sup>a</sup>: Crecimiento en agar Mac Conkey e incubados a 37 °C durante 48 horas en diluciones de hasta 10<sup>-3</sup>.

<sup>b</sup>:Crecimiento en agar nutritivo, incubados a 35 °C durante 48 horas en diluciones de hasta 10<sup>-3</sup>.

<sup>c</sup>:Crecimiento en agar dextrosa papa, incubados a 25 °C durante 5 días.

**Tabla 31. Aflatoxinas<sup>a</sup> en las materias primas y del mole elaborado en San Pedro Atocpan.**

<b>Muestra</b>	<b>AFG2 (ppb)</b>
P. cruda	2
Mole	0.3

<sup>a</sup>: Método HPLC.

### **5.7 Propuesta para mejorar las condiciones de almacenamiento de la pepita verde de calabaza y de sus productos.**

Las enfermedades transmitidas por los alimentos causadas por peligros microbiológicos constituyen un problema de salud pública importante y creciente (FAO, 2002). Por ello es



de suma importancia tener control en los alimentos desde la llegada a la industria hasta la salida de ella y así establecer una forma de calidad en la elaboración del mole verde.

Los alimentos elaborados de manera artesanal suelen ser productos con grandes problemas durante su elaboración que se ve reflejado en su calidad final, por lo que es de gran importancia aplicar medidas que puedan reducir el riesgo para la salud del consumidor.

En la mayoría de empresas utilizan el sistema HACCP para tener un control en su calidad de sus productos, este sistema podría ser una herramienta útil para una microempresa que elabora productos como el mole.

El sistema HACCP identifica los puntos donde aparecerían los peligros más importantes para la seguridad de los alimentos, ya sea este peligro como físico, biológico o químico, en las diferentes etapas del proceso desde la recepción de la materia prima hasta la llegada al consumidor. Con el objetivo de adaptar medidas precisas y evitar que se desencadenen los riesgos de presentación de los peligros (Soriano, 2007).

Los principales elementos del sistema HACCP son:

1. Identificación de los peligros potenciales. (Evaluación del riesgo de ocurrencia).
2. Determinación de los Puntos Críticos de Control (PCC). (Determinar los pasos que pueden ser controlados para eliminar o minimizar los peligros).
3. Establecimiento de los criterios (tolerancias, niveles que se deben alcanzar) que deben cumplirse para asegurar que el PCC está bajo control.
4. Establecimiento de un sistema de vigilancia.
5. Establecimiento de una acción correctiva cuando el PCC no esté bajo control.
6. Establecimiento de procedimientos de verificación.
7. Establecimiento de procedimientos de mantenimiento de la documentación y de los datos.

### **5.7.1 Definición del producto.**

Según la norma mexicana MNX-F-422-1982 define al mole como el producto alimenticio de color y aspecto variable según su composición, que contiene como ingredientes





básicos: chiles, agua, aceites y/o grasas comestibles, harinas, féculas, almidones, sal, especias, condimentos, así como otros ingredientes opcionales (cacao, chocolate, cacahuete, nueces, pasas, almendras, avellanas, tortillas, pan, consomé, jitomate y plátano macho). En la tabla 32 se muestran las características generales del producto elaborado por la microempresa Moles Caseros.

**Tabla 32. Descripción del producto.**

1.Nombre del producto	Mole verde
2.Características importantes del producto	Humedad menor del 14%, se almacena a temperatura ambiente.
3.Cómo se utilizará el producto?	En polvo para la elaboración de platillos mexicanos.
4.Sistema de Envasado	Costales de nylon con capacidad de 50 Kg.
5.Duración en el mercado	De 1 a 2 años.
6.¿Dónde se venderá el producto?	Mercados de San Pedro Atocpan y de mercados de su alrededor, Centrales de Abastos (Ermita Iztapalapa y Atizapán de Zaragoza).
7.Instrucciones para el etiquetado	El producto deberá traer en la etiqueta nombre del producto, ingredientes y tabla nutrimental. Además de fecha de elaboración y caducidad.
8.Control especial de la distribución	Temperatura ambiente, humedad relativa 75-80 %.
Fecha:	Elaborado por:
Revisado por:	Autorizado por:

Las materias que lleguen a la microempresa deberán ser clasificados y llenar un formato que se presenta en la tabla 33, lo cual deberá ir firmada con el responsable, dicho formato





deberá traer la fecha de llegada de las materias primas. Los aspectos que se deben considerar en el almacenamiento de materias primas es:

- ❖ Tiempo y temperatura del alimento.
- ❖ Características de la materia prima (físicas, químicas y microbiológicas).
- ❖ Características de envasado de la materia prima.

**Tabla 33. Lista de materias primas y otros materiales incorporados.**

Nombre del Producto: Mole verde.		
Materia prima Principal:	Material de envase:	Ingredientes secos:
	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Pepita verde de calabaza.</li> <li>➤ Galletas.</li> <li>➤ Chiles verdes.</li> <li>➤ Perejil.</li> <li>➤ Cilantro.</li> <li>➤ Ajonjolí.</li> <li>➤ Cacahuete.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Costales de nylon</li> <li>Cajas de cartón.</li> <li>Costales de nylon.</li> <li>-</li> <li>-</li> <li>Costales de nylon.</li> <li>Costales de nylon.</li> </ul>
Otros:		
Fecha	Aprobado por:	

**5.7.2 Identificación de peligros y medidas de control.**

El peligro una propiedad biológica, física o química que puede hacer que un alimento no sea seguro para el consumidor.

Los peligros que pueden estar presentes a lo largo de todo el proceso según el sistema HACCP son: peligros físicos, químicos y microbiológicos.



Después de verificar el diagrama de proceso (Fig. 44) se procedió a realizar el análisis de riesgos, ya que es un paso para determinar los puntos críticos de control de esta manera, se identificaron los posibles peligros a lo largo del proceso de elaboración de mole y se registraron de forma estructurada y organizada en la tabla 34, para facilitar la comprensión.

**Tabla 34. Identificación de peligros y medidas de control**

Nombre del producto: Mole verde.			
Ingredientes y etapas de Proceso	Riesgos Potenciales	Justificación	Medidas de Control
Recepción	Biológicos	Hongos, insectos y aflatoxinas	Pruebas microbiológicas, cuantificación de aflatoxinas
	Físicos	Presencia de metales	Detectores de metal
Cernido.	Físicos	Presencia de metales y piedras	Detectores de metal Tamizado con imanes
Mezclado.	Biológicos	Hongos, insectos y aflatoxinas.	Monitoreo de materias primas. Pruebas microbiológicas y cuantificación de aflatoxinas.
Molienda 1 y 2	físicos	Fricción, desgaste del Equipo	Detector de metal.
Reposo.	Biológico	Hongos e insectos	Colocarlos en lugares bien cerrados a temperaturas de 20-25 °C y con humedad relativa menor de 65%. Pruebas microbiológicas
Empacado.	Físicos	Desgaste de equipo.	Detector de metal.
	Microbiológicos		Monitoreo del producto terminado. Pruebas microbiológicas y cuantificación de aflatoxinas.



### 5.7.3 Determinación de puntos críticos de control.

Después de la identificación de peligros y las medidas preventivas para su control se determinaron los puntos críticos mediante un árbol de decisiones (Fig. 54), que consiste en una serie lógica de preguntas que se responden para cada etapa del proceso.

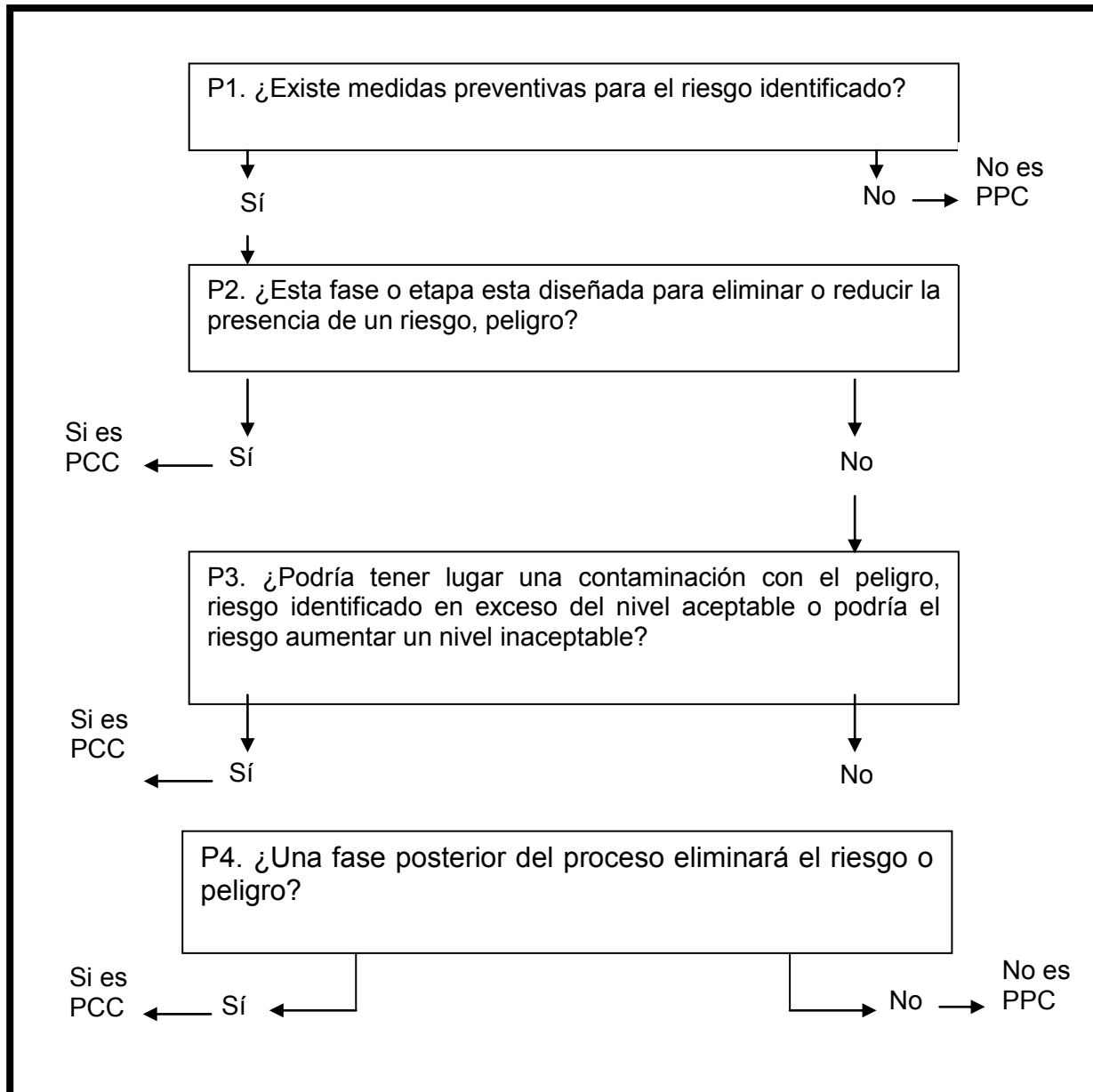


Figura 54. Árbol de decisiones.



**5.7.4 Establecimiento de límites críticos.**

Ya establecidos los puntos críticos de control se establecen los límites para cada punto crítico de control. En la tabla 35 se muestra el formato 5 del sistema HACCP. En la tabla 36 se muestra el formato en donde se realizaran los procedimientos de vigilancia, registros y procedimientos para corregir desviaciones.

**Tabla 35. Determinación de límites críticos.**

<b>ETAPA DE PROCESO</b>	<b>PELIGRO</b>	<b>PCC</b>	<b>LIMITES CRITICOS</b>
Recepción de la materia prima	Físico: Materia Extraña Residuos metálicos  Biológico: Aflatoxinas	1	Exento de materia extraña  Aflatoxinas: 20 ppb
Mezclado	Biológico: Aflatoxinas	2	Aflatoxinas: 20 ppb
Molienda 2	Físico: Desgaste de equipo.	3	Exento de materia extraña

**5.8 Propuesta para mejorar la calidad de los productos.**

La calidad de los alimentos está dada por diferentes parámetros como químicos, físicos, microbiológicos. Por ello se realizó un estudio de la inocuidad en la pepita verde de calabaza y de los productos que se elaboran a partir de esta para resolver algunos de los problemas de salud pública y establecer una propuesta para mejorar las condiciones de almacenamiento de la materia prima y de los productos terminados. Se debe de cubrir ciertas normas, en equipos, personal capacitado, plantas diseñadas para lograr condiciones de operación, higiene y seguridad, así como una alta productividad. Se debe considerar las condiciones de la edificación en donde se están elaborando los productos como los suelos, paredes, techos, ventanas, iluminación e instalaciones sanitarias, patios de la planta, drenaje; y la higiene del personal.



**Tabla 36. Plan HACCP**

<b>NOMBRE DEL PRODUCTO: MOLE VERDE</b>						
<b>FASE DEL PROCESO</b>	<b>No. DEL PROCESO</b>	<b>DESCRIPCIÓN DEL PELIGRO</b>	<b>LÍMITES CRÍTICOS</b>	<b>PROCEDIMIENTOS DE VIGILANCIA</b>	<b>PROCEDIMIENTOS PARA CORREGIR DESVIACIONES</b>	<b>REGISTRO DE HACCP</b>
Recepción de la materia prima	1	Humedad alta  Infestación de insectos.  Contaminación por microorganismos.	Humedad del 14 %  Nulo.  Nulo.	Verificar la humedad  Verificar el porcentaje de insectos.  Verificar contenido de hongos.	Disminución de la humedad.  No aceptar materia prima infestada.	Se realizará en bitácora.  Registrar en libro de compras
Mezclado	3	Contaminación por microorganismos.	Nulo	Monitoreo por laboratorio.  Monitoreo en producción de aflatoxinas.	Menos de 20 ppb	Realizarla en bitácora.
Molienda 2	5	Presencia de metales o vidrios	Nulo	Monitoreo con imanes.		
<b>FECHA:</b>			<b>ELABORADO POR:</b>			
<b>REVISADO POR:</b>			<b>AUTORIZADO POR:</b>			

**5.8.1 Instalaciones**

- ❖ Pisos: Se deben construir de materiales impermeables, no absorbentes, no deben desarrollar microorganismos al contacto con la humedad. Deben de ser de fácil limpieza como pisos deslizantes, en algunas zonas pueden ser precisas superficies antideslizantes como medida de seguridad para los operarios, aunque deben de ser de una limpieza eficaz.
- ❖ Paredes: Las paredes en el área de producción deben de ser de materiales impermeabilizantes y lavables; por ejemplo, azulejos, láminas de plástico o



acero inoxidable o se construirán con material recubierto por un barniz impermeabilizante hasta la altura de las posibles salpicaduras. La superficie será lisa, sin grietas y fácil de limpiar. Las uniones entre las paredes adyacentes y entre paredes y techos serán selladas y de color claro, lo que permitirá visualizar la suciedad.

- ❖ Techos: Los techos son poco probables que establezcan contacto con los alimentos y se limpian pocas veces, por ello deben de ser construidos de tal forma que pueda prevenir la acumulación de polvo y de suciedad. Una circulación adecuada del aire tiene una prioridad total para evitar la formación de mohos sobre los techos. El goteo de la humedad condensada sobre los techos es una causa potencial de los productos que permanecen debajo. Los techos deben construirse de materiales absorbentes como hormigón o yeso, también pueden cubrirse con lámina de fibra o de madera. Estos materiales tienden a acumulan humedad por ello, se tienen que limpiar con frecuencia o bien, pueden reducirse mediante la ventilación y aire acondicionado. La aplicación de pinturas fungicidas suplementará estas medidas.
- ❖ Ventanas: En la zona donde se manipula los alimentos deben de contener pocas o nulas ventanas.
- ❖ Puertas: Las puertas se recomiendan, ser instaladas perfectamente bien ajustadas para evitar la entrada de roedores, insectos y polvo; las superficies deben de ser lisas y no absorbentes.
- ❖ Estructuras aéreas: Todos los dispositivos y estructuras que van al aire (por ejemplo fijaciones de iluminación, tuberías para gas, aire comprimido y energía, raíles de suspensión, poleas, evaporadores) pueden contribuir a la contaminación de los alimentos y de las materias primas, particularmente por condensación o goteo. Las cubiertas serán de superficies lisas y se desmontarán con facilidad para permitir la limpieza de las instalaciones.



- ❖ Iluminación: El propósito de la iluminación es proporcionar una visibilidad eficiente y cómoda en el trabajo, además ayuda a mantener un ambiente seguro. El establecimiento debe disponer de iluminación adecuada en cantidad y calidad de acuerdo con las operaciones que se realicen.
- ❖ Drenaje: En las áreas de producción, se recomienda instalar una coladera por cada 37 cm<sup>2</sup> de superficie. Los puntos más altos deben estar a no más de 300 mm de un drenaje maestro colector, a la pendiente máxima del drenaje con respecto a la superficie del piso debe ser superior al 5%. En las instalaciones que así lo requieran se deberán instalar trampas de grasa. Las tuberías de desagüe de los inodoros no deberán descargar directamente al sistema de drenaje. Se debe tener precaución que las tuberías hierro o acero galvanizado sean de un diámetro interior de aproximadamente 100 mm.
- ❖ Rampas y escaleras: Las rampas deben tener 10% de inclinación y se deben construir de material antiderrapante; mientras que las escaleras deben permitir el libre tránsito y se construyen de acuerdo a las instalaciones. Se debe evitar tocar barandales antes de entrar al área de proceso.
- ❖ Equipos y utensilios: Los utensilios deben de ser almacenados adecuadamente, que se laven y desinfecten con facilidad, deben de ser de fácil mantenimiento y manejo para el personal de limpieza y de mantenimiento responsables. Tanto los equipos como los utensilios deben ser de acero inoxidable para evitar su deterioro y facilitar su limpieza. La limpieza debe ser en cada jornada de trabajo. El uso de desinfectantes debe ser en las concentraciones más adecuadas con el fin de no desgastar el equipo y sobre todo no poner en riesgo la salud del consumidor.
- ❖ Instalaciones para aseo personal: En todos los lugares de trabajo deben existir instalaciones adecuadas y convenientes para el aseo personal, con suministro de agua potable fría y caliente, toallas limpias individuales y desechables, de fácil acceso para los operarios, limpias y en adecuadas condiciones de funcionamiento.



- ❖ Lavamanos: Se utiliza por lo general, el de tipo cubeta o pila colocada sobre soportes. Los lavamanos de cubeta van adosados a los muros o más frecuentemente en espiga y perpendicularmente a las ventanas, a fin de que tengan una iluminación adecuada. El lavamanos colectivo circular presenta ventajas de su escaso consumo de agua (0.02- 0.03 cm<sup>3</sup>/min) y el espacio reducido que ocupa. El número de lavamanos que han de instalarse en los lugares de trabajo dependerá del número de trabajadores y de la actividad que se realice.
- ❖ Duchas y Regaderas: Los lugares de trabajo deben contar con duchas de agua potable fría y caliente en este caso que los procesos son polvorientos, sucios, manipulación de sustancias infecciosas, grasosas, impliquen a calor excesivo, grandes esfuerzos físicos por ejemplo como el caso de este tipo de industrias en los que se realizan en las operaciones un esfuerzo mecánico.
- ❖ Inodoros: Provistos de retretes, papel higiénico, lavamanos, jabón, secador de manos o toallas desechables y recipientes para basura. Se recomienda que el empleo de grifos que no requieran acción manual. Existencia de rótulos que indiquen que el personal debe lavarse las manos, deberán conservarse limpios, secos y desinfectantes y se recomiendan el uso de puertas con cierre hermético.

### 5.8.2 Implementación de buenas prácticas de manufactura

Una propuesta más que se hace, es llevar acabo las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM), ya que estas tiene como objetivo, establecer criterios generales de prácticas de higiene y procedimientos para la manufactura de alimentos inocuos, saludables y sanos destinados al consumo humano que hayan sido sometidos a algún proceso industrial. A continuación se mencionan cada una de ellas:

- ❖ Capacitación para el personal: Enfocándose al manejo de la higiene del personal de todas y cada una de las personas que laboren dentro y fuera de las instalaciones de la empresa. El personal debe conocer y entender los siguientes puntos:

1. Usar ropa limpia





2. Lavado y desinfección adecuadas de las manos
  3. Mantener las uñas cortas, limpias y libres de esmalte de uñas.
  4. Emplear adecuadamente, redes de pelo, cofias, gorras, cubiertas de barba y cubre bocas.
  5. No comer o fumar en áreas de trabajo.
  6. Restringir a personas enfermedades o con heridas sin cicatrizar.
  7. Abstenerse del uso de joyería, clips, lápices o bolígrafos sueltos en el uniforme.
  8. Evitar contaminación con cosméticos.
  9. Los empleados deben presentarse aseados a trabajar.
- ❖ Personal: Debe usar red y cofia antes de entrar al área de producción, de igual manera se debe usar cubre barba o bigote según sea el caso. Se deben remover batas, cofias, cubre barbas, esto con el fin de evitar la contaminación cruzada. Se recomienda que el personal se bañe diariamente y de preferencia antes de iniciar labores.
- ❖ Lavado de manos: Las manos suelen contaminarse por contacto con materias primas que son portadoras de gérmenes patógenos o alterantes, por ello se recomienda lavarse las manos profundamente y sanitizarlas cuando sea necesario, en una instalación adecuada, antes de empezar a trabajar, después de cada ausencia de la zona de trabajo y en cualquier otro momento en que las manos se hayan ensuciado o contaminado. Es necesario lavarse las manos; antes y después de manipular alimentos, luego del uso de los servicios higiénicos, después de tocar objetos contaminados: dinero, basura, pañuelos, restos de alimentos, entre otros. Después de tocarse el cabello, nariz u otras partes del cuerpo, después de fumar y antes de ponerse guantes para manipular alimentos.
- ❖ Política de cabello y barba: Todo el personal deberá traer en buen estado y bien colocada la malla cubrepelo. Deberá cubrir las orejas, la patilla no deberá extenderse más abajo del lóbulo de la misma.



- ❖ Alimentos y bebidas: No se podrá introducir alimentos y bebidas en el área de producción. Todo alimento y bebida deberá ser consumido únicamente en el comedor de la planta.
  
- ❖ Aire: Todo lugar de trabajo necesita ventilarse por medios naturales o mecánicos, para cumplir con dos grandes requerimientos ambientales: el primero a fin de proporcionar el oxígeno suficiente para el mantenimiento de la vida, mediante el suministro de aire fresco del exterior en cantidad suficiente y, el segundo para abatir la contaminación ambiental del lugar causado por la presencia de dióxido de carbono, olores corporales, exceso de calor y humos o vapores producidos por los procesos industriales que se realizan. Las entradas de aire estarán provistas de filtros para evitar la entrada de insectos, polvos y otros contaminantes.

Agua: En general el agua debe ser de calidad potable. Debido a la importancia del uso de agua para la limpieza de las instalaciones, es conveniente asegurarse que esta misma sea suficiente para arrastrar todo el contenido de las alcantarillas y que éstas quedan absolutamente limpias. Antes de ser utilizada se le deben realizar pruebas físicas, fisicoquímicas y microbiológicas.

- ❖ Control de plagas: Utilizar todos los recursos necesarios por medio de procedimientos operativos estandarizados, para minimizar los peligros ocasionados por la presencia de estas plagas.
  
- ❖ Mantenimiento: Se deben de tener los equipos calibrados a través del establecimiento de un programa de mantenimiento y calibración, se deben tener precaución y cuidado en la lubricación de los equipos, la ubicación de los equipos debe de ser de tal manera que se facilite su limpieza (separados de paredes, techos y pisos) la limpieza debe de ser lo más cuidadosa posible, evitando derrames.

Los equipos deberán de estar en buenas condiciones de funcionamiento; para ello se realizan periódicamente revisión, limpieza y desinfección de equipos que sean recién reparados.



- ❖ Sanitización: Implementar la técnica de limpieza que generalmente se implementa en la Industria de alimentos mediante el uso de agua y soluciones limpiadoras, de acuerdo a los siguientes pasos:
  1. Preenjuague con agua tibia a 45° C.
  2. Aplicación de un detergente limpiador a temperatura adecuada, para su efecto óptimo.
  3. Enjuague con agua caliente.
  4. Higienización con la utilización de ayudas en el proceso de limpieza tales como cepillos mecánicos, aspiradoras, raspadoras, pistolas de vapor, etc.
  
- ❖ Transporte: Determinar los objetivos y limitaciones del transporte tanto para la materia prima como para el producto, se debe asegurar la limpieza y buen funcionamiento de la unidad de transporte además durante la carga, evitar poner en marcha el transporte con las puertas abiertas, cargar lo más rápido posible evitando la contaminación y daño al producto de igual manera durante el recorrido controlar la velocidad de transporte a fin de evitar movimientos bruscos que afecten la estructura del producto.
  
- ❖ Retiro de Producto: El establecimiento no debe aceptar ninguna materia prima en estado de descomposición o con sustancias extrañas evidentes que no puedan ser reducidas a niveles aceptables por los procedimientos normales de inspección, clasificación, preparación o elaboración y rechazar las materias primas con evidentes signos de infestación de hongos. Las materias primas que evidentemente no sean aptas, deben separarse y eliminarse del lugar, a fin de evitar mal uso, contaminaciones y adulteraciones.
  
- ❖ Registros de elaboración o producción. De cada lote debe llevarse un registro continuo, legible y con la fecha de los detalles pertinentes de elaboración. Estos registros deben conservarse por lo menos durante el tiempo que se indique como vida de anaquel.



- ❖ **Etiquetado:** En el almacén, se debe considerar el etiquetado de los ingredientes que contienen las materias primas y demás ingredientes así como la fecha en que ingresaron al almacén. Cualquier producto alimenticio rechazado debe estar marcado, separándolo del resto de los alimentos. Todos los recipientes, frascos o bolsas deben estar etiquetados o rotulados y bien cerrados; en el caso de insecticidas, se debe informar acerca de su toxicidad y empleo. Para el producto terminado, el etiquetado se debe de realizar en una superficie de exhibición, ésta debe contemplar la identificación del lote al que pertenece, la fecha de caducidad del mismo. Es importante que el etiquetado se lleve a cabo utilizando el idioma oficial del lugar de comercialización, letra legible y tinta indeleble.
  
- ❖ **Almacenamiento:** Los métodos de conservación y almacenamiento deben ser adecuados al tipo de producto y materia prima que manejen; los controles necesarios deben ser tales, que protejan contra la contaminación o la aparición de un riesgo para la salud pública. Es importante que los alimentos permanezcan en ambientes secos. Los hongos crecen a temperatura ambiente de hasta  $-5^{\circ}\text{C}$ , siempre y cuando exista un elevado grado de humedad en el medio. Se debe favorecer la ventilación en el almacenamiento de las materias primas y del producto terminado. La aireación es muy importante no sólo para evitar la conservación correcta del alimento, sino también para no favorecer el crecimiento de hongos y su rápida difusión por las distintas superficies. Realizar un monitoreo de humedad, coliformes, hongos y levaduras y micotoxinas en ingredientes propensos a adquirir alguna contaminación.
  
- ❖ **Empaque de la materia prima y del producto terminado:** la pepita de calabaza, la pepita con cáscara será almacenada en costales de nylon o de rafia y deben de estar limpios y secos para evitar proliferación de insectos y de microorganismos.

### **5.9 Control de las micotoxinas en los alimentos.**

Para inhibir el crecimiento de hongos en los alimentos se utilizan agentes antimicóticos, como por ejemplo antibióticos y fungicidas. Otro método es la aplicación de calor a alimentos contaminados con micotoxinas, pero éstas son también bastante resistentes, por lo que tendría que usarse por período suficientemente largo para que sea efectivo, que al mismo tiempo puede cambiar algunas características organolépticas del producto



como su apariencia física. También se utiliza la degradación de tipo químico, basada en la utilización de vapores de amoníaco, el inconveniente de éstos, es que producen olores en los alimentos.

Soliman y Badeaa (2002) experimentaron con 12 aceites esenciales de plantas medicinales para poder inactivar hongos como el *Aspergillus flavus*, *A. Parasiticus*, *A. Ochraceus* y *Fusarium*. Los aceites como el tomillo y canela (4 ppm), inhibieron dichos hongos. Caraway estaba inhibiendo en 2000 ppm a *Aspergillus flavus*, *A. Parasiticus* y 3000ppm a *A. Ochraceus* y *Fusarium moniliforme*. El anís inhibía (4ppb) a *A. Flavus*, *A. ochraceus*, *A. Parasiticus* y *F. Moniliforme*.

Debido a la diferencias durante el proceso en la empresa “moles caseros”, se recomienda la eliminación de productos enmohecidos. Una práctica muy habitual es eliminar sólo la porción de alimento que vemos claramente afectada por el hongo. Esta práctica ha de evitarse y para eliminar posibles complicaciones es mejor deshacerse del producto en su totalidad. (Lazcano, 2005)

La falta de mantenimiento de equipos y utensilios puede ocasionar contaminaciones directas de los productos.

❖ Contaminación cruzada directa

Cuando los agentes contaminantes se introducen en forma directa en el alimento listo para ser consumido. Por ejemplo, un almacenamiento inadecuado, la mezcla de productos limpios con contaminados.

❖ Contaminación cruzada indirecta

Cuando los agentes contaminantes se introducen en forma indirecta en el alimento listo para ser consumido. Por ejemplo, los trabajadores elaboran los productos con las manos sucias o contaminadas, los utensilios no se les realizan una limpieza ni desinfección.



---

# CONCLUSIONES

---



### 6. CONCLUSIONES.

Con base en los resultados obtenidos en el presente trabajo se concluye lo siguiente:

- ❖ La pepita verde de calabaza y productos comercializados en las dos zonas, Mercado de Cuautitlán y Central de Abastos de la Ciudad de México, presentaron un bajo contenido de humedad, inferior al 14%. Sin embargo, la muestra de mole presentó un 12% de humedad, siendo un producto que podría ser un riesgo, ya que por lo general es almacenado a temperatura ambiente en los mercados tradicionales.
- ❖ Los productos de pepita verde de calabaza presentaron contenidos de grasa que van del 19% hasta el 40%. Presentándose diferencia entre un mismo producto procedente de diferentes zonas de comercialización, lo que indicó que en productos elaborados artesanalmente la composición química varía ampliamente debido a los procesos no estandarizados y esto se refleja en la vida útil del producto y la calidad final.
- ❖ La pepita verde de calabaza y los productos comercializados en las dos zonas, presentaron valores de pH entre 5.2 a 6.6 y acidez baja. Los productos y la materia prima se encontraron en un rango de pH que facilitó el crecimiento de bacterias y hongos, lo que se reflejó en el contenido de microorganismos encontrados.
- ❖ Los hongos identificados fueron: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus clavatus*, *Penicillium*, *Rhizopus*; *Alternaria* y *Fusarium*. La pepita garapiñada y el jamoncillo fueron los productos en donde no se identificó ningún hongo productor de aflatoxinas, esto se debe a la concentración de azúcares que tienen estos productos, ya que este compuesto reduce el agua disponible provocando la disminución del crecimiento de hongos. La pepita salada y el mole fueron las que presentaron una mayor presencia de diferentes géneros de hongos (*Aspergillus*, *Penicillium*, *fusarium*, *Rizhopus*, *Alternaria*).



## CONCLUSIONES

---

- ❖ En el aspecto microbiológico, se evaluó la presencia de coliformes, encontrándose en la pepita cruda y en el pipián. En los demás productos no se detectó presencia de coliformes totales, lo que indicó buenas condiciones higiénicas durante el proceso y almacenamiento de estos productos.
  
- ❖ Todos los productos presentaron aflatoxinas en un rango de 1 a 205 ppb. Las malas prácticas durante el proceso de elaboración y almacenamiento de estos productos artesanales provocaron una mala calidad de los productos ya que, se detectaron aflatoxinas en niveles superiores a los límites establecidos por la Norma Oficial Mexicana (20 ppb), siendo la palanqueta la que presentó una mayor concentración, por lo que estos productos podrían ser un riesgo para la salud de los consumidores. La aflatoxina que se detectó en los productos fue la aflatoxina G<sub>2</sub>.
  
- ❖ Se debe de tener en toda empresa (micro, pequeña o mediana) un sistema de control de calidad para evitar peligros que puedan dañar la salud de las personas, para esto es importante establecer los Puntos Críticos de Control y establecer un sistema HACCP.
  
- ❖ Las condiciones de almacenamiento, las características químicas y fisicoquímicas, y mal manejo durante su comercialización hacen que algunos de los productos elaborados artesanalmente puedan provocar problemas de salud pública.





---

# RECOMENDACIONES

---



**7. RECOMENDACIONES.**

En base en los resultados obtenidos se recomienda lo siguiente:

- ❖ Evaluar otros productos elaborados artesanalmente, debido a que no se cuentan con las condiciones adecuadas para su elaboración y almacenamiento.
- ❖ Desarrollar un método analítico sensible, exacto y confiable que permita la obtención de resultados rápidos que se puedan implementar en las industrias.
- ❖ Realizar muestreos de productos artesanales para evaluar la presencia de aflatoxinas, en diferentes zonas del país.



# ANEXOS





## 8. ANEXOS.

### Determinación de aflatoxinas por el método de columnas de afinidad con anticuerpos monoclonales.

Para el análisis de aflatoxinas totales en la pepita verde de calabaza y los productos se utilizó el método por columnas de afinidad con anticuerpos monoclonales (AFLATEST).

#### Procedimiento:

- 1.- Se pesaron 50 g de la pepita verde de calabaza y de los productos (pepita con cáscara, salaba, en botana, garapiñada, jamoncillo, palanqueta, mole verde y pipián)
- 2.- Se agregaron a las muestras 200 ml de metanol al 80%, 10 g de NaCl .
- 3.- Homogenizaron la muestra por aproximadamente 1 minuto en la licuadora (Fig. 55).
- 4.- Las muestras se filtraron a través de papel filtro de 24 cm (Fig. 56).
- 5.- Del filtrado que se obtuvo, se tomaron alícuotas de 10 ml y se diluyeron en 40 ml de agua.



Figura 55. Mezcla de la muestra



Figura 56. Filtración de la muestra

6. Se tomaron 4 ml de la disolución y se depositaron en la columna de afinidad con anticuerpos monoclonales aflatest y se filtró al vacío (Fig. 57 y 58).



Figura 57. Filtración en columnas



Figura 58. Filtración en columnas (2)

7. Se realizaron dos lavados haciendo pasar 10 ml de agua destilada por la columna de la misma manera que se pasó el filtrado.

8. Se colocaron un tubo de ensayo en la parte inferior de cada columna y se llevaron acabo la elusión de la muestra haciendo pasar 1 ml de metanol grado HPLC (Fig. 59).



Figura 59. Arrastre de las aflatoxinas

9. Se agregó 1 ml de solución reveladora marca Vicam (1:9) para facilitar la lectura de aflatoxinas (Fig. 60).



Figura 60. Aplicación de la solución reveladora.

10. Se colocó el tubo dentro del fluorómetro y se leyó a una longitud de onda de 425 nm (AOAC, 2000) ( Fig. 61).



Figura 61. Fluorometro Aflatest



---

# REFERENCIAS

---



### 9. REFERENCIAS.

1. Abecia, S (2005). *Micotoxinas en los alimentos*. Disponible en: <[www.univalle.edu/publicaciones/brujula/brujula.htm](http://www.univalle.edu/publicaciones/brujula/brujula.htm)>
2. Adams, M.R y Moss, M. O (1997). *Microbiología de los alimentos*. Ed. Acribia Zaragoza. pp. 288.
3. Adrian, R. E. (1994). *Intoxicaciones alimentarias de etiología microbiana*. Ed. Acribia Zaragoza. pp 94-97.
4. Adrian, J.; Potos, J.; Poiffait, A.; Dauviller, P.(2000). *Análisis nutricional de los alimentos*. Ed. Acribia. España Zaragoza. pp. 275-282.
5. Alfaro, C. (2002). *La cocina mexicana resultado de una conquista amorosa*. Ed. CONACULTA. pp 65-71.
6. AOAC (1990). *Official methods of analysis of the association of official analytical chemists AOAC, food composition; additives; natural contaminants*. Volumen II, publicado por the Association of Official Analytical Chemist, Inc. Arlington, Virginia, USA, 15a ed. pp 1298.
7. Aran, N.; Ayfer, M. y Heperkan, D. (1994). Mycoflora and Aflatoxin Contamination in Shelled Pistacho Nuts. *J Sci Food Agric*. **66**: 273-278.
8. Bagócsi, B.; Papp, E. y Otta, K.H. (2000). *Determination of aflatoxins in food by over pressured-layer chromatography*. Department of Chemical Technology and Environmental Chemistry , L . Eotvos University ,P.O . Box 32,H- 1518 Budapest 112, Hungary.





9. Bankole, S. A., Ogunsanwo, B. M., Osho, A. y Adewuyi, G. O. (2006). Fungla contamination and aflatoxin B1 of egusi melon sseed in Nigeria. *Food control*, **17**: 814-818.
10. Barrea, A.V.; Pearson, A.M.; Price, J.F. ; Gray, J.I. y Aust, S.D. (1992). Some factors influencing aflatoxin production in fermented sausages. *J. Sci. Food* **47**:1773-1775.
11. Barros, J.; Cepeda A.; Franco, M.; Fente, A.C. y Freire M. (2003). Análisis de la contaminación fúngica y potencial presencia de Aflatoxinas en alimentos “Étnicos”. *Alimentaria*, Mayo. pp 179-183.
12. Bécquer, L. A. ; Fontaine, S.M. ; Verela, S.M. ; Pérez, G. L. ; Puch, R.V. y Rodríguez, C.C. (2003). Experiencia preliminar de la posible presencia de aflatoxinas en quesos. *Alimentaria*, Mayo. pp. 190-108.
13. Blanco, J.L.; Domínguez L.; Suárez G. (1989). Problemática de la presencia de Aflatoxinas en leche y productos lácteos. *Alimentaria* **204**: Septiembre. 256-264.
14. Bolet A. M. y Socarrás S. M. (2005). Micotoxinas y cáncer. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, **24 (1)**: 54-59.
15. Bradburn, R. D. y Blunden, G. (1994). A comparative study of solvent extraction efficiency and the performance of immunoaffinity and solid phase columns on the determination of aflatoxin B1. *Analytical Food, Nutritional and Clinical Methods Section*. **52**: 179-185.
16. Brownsell, V. L.; Griffith, C. J.; y Jones, E (1993). *La ciencia aplicada al estudio de los alimentos*. Ed. Diana México, pp. 67-38.
17. Calvo, M. (2003). *Bioquímica de los alimentos*. Disponible en:<[www.milksci.unizar.es/bioquimica/temas/programasbio.html](http://www.milksci.unizar.es/bioquimica/temas/programasbio.html)>



18. Carrillo, L. (2003). *Microbiología agrícola*. Disponible en: <[www.edu.ar/matbib/micragri/micagricap6.pdf](http://www.edu.ar/matbib/micragri/micagricap6.pdf)>
19. Casanova, C. (1995). Identificación y cuantificación de aflatoxinas en maíz. *Alimentaria*. Enero- Febrero. pp. 87-90.
20. Cassini, R. y Rodríguez J. C (2004). *Conceptos básicos para el almacenamiento de granos en chacra*. Proyecto nacional de cosecha y poscosecha de granos. Disponible en: <[www.cosecha y postcosecha.org](http://www.cosecha y postcosecha.org)>
21. Castillo, P.U.; García, G.R.; Durán, de B.C. (2004). “*Aflatoxinas en Maíz Amarillo usado para Jarabes de Fructuosa: ¿Existen riesgos para la Salud?*” UNAM, Alfa Editores Técnicos. Ciudad Universitaria, México D.F. pp. 275.
22. Castro, E. (1994). *Control de calidad de insumos y dietas acuícolas. Programa cooperativo gubernamental*. FAO. Italia disponible en : <[www.fao.org](http://www.fao.org)>
23. Castro, E. y Ahumada, F. (1994). *Micotoxinas, rol e importancia*. Disponible en: <[www.fao.org/](http://www.fao.org/) >
24. Cheftel, J. (1999). *Introducción a la bioquímica y tecnología de los alimentos*. Vol 1. Ed. Acribia Zaragoza. pp 239-247.
25. Derache, R. (1990). *Toxicología y seguridad de los alimentos*. Ed. Omega Barcelona. S.A. pp 185.
26. Dobson, D.W.; Sweeney, A. y Michael, J. (1998). Mycotoxin production by *Aspergillus* , *Fusarium* and *Penicillium* species. *J. of Food Microbiology* **43**:141-158
27. Docon N.; García, S. M.; Vicente, G.J. (2003). *Fundamentos y técnicas de análisis bioquímico. Principios de análisis instrumental*. 2da edición. Ed. Thomson, Paraninfo. pp 139-140.



28. Domínguez, L.; Blanco, J.; Gomez-Lucia, E (1994). Determination of aflatoxin M1 in ilk and milk products contaminated at low levels. Disponible en: <[www.scielo.br/scielo.php?pid](http://www.scielo.br/scielo.php?pid)>
29. Doyle, M.P.; Beuchat, L.R. y Montville, T.J. (1997). *Food Microbiology: fundamentals and frontiers*. ASM Press. Washington. D.C. pp. 56-61.
30. Duarte-Vogelt, S y Villamil, J. L (2006). Micotoxinas en la salud publica. *Rev. Salud publica*, **8**:129-135.
31. Ducar, P. (1991). *El sistema de análisis de riesgos y puntos críticos. Su aplicación en la industria de alimentos*. Ed. Acribia Zaragoza. pp 4-19.
32. Dvorackova, I. (1990). Aflatoxin and Reye's síndrome in: aflatoxins and human health CRC. Press, Inc. Boca Raton, Florida. pp 1-13.
33. FAO (1991). *Alimentación y Nutrición Utilización de alimentos tropicales*. Roma, Italia. pp 92.
34. FAO (1993). *Manual de manejo poscosecha de granos a nivel rural. Departamento de agricultura*. Disponible en: <[www.fao.org/](http://www.fao.org/)>
35. FAO (2003). *Manual sobre la aplicación del Sistema de Análisis de Peligros y de Puntos Críticos de Control (APPCC) en la Prevención y Control de las Micotoxinas*. Disponible en: <[www.fao.org/](http://www.fao.org/)>
36. FAO (2002). *Conferencia paneuropea sobre calidad e inocuidad de los alimentos información estadística sobre enfermedades transmitidas por los alimentos en europa. Peligros microbiológicos y químicos*. Disponible en: <[www.fao.org/docrep/meeting/004/x6865s.htm](http://www.fao.org/docrep/meeting/004/x6865s.htm)>



37. FAO (2005). *Conferencia Regional FAO/OMS sobre inocuidad de los alimentos para las Américas y el Caribe. Sistema Nacional para la Inocuidad de los alimentos en México-Análisis de la Situación*. Disponible en: <<ftp.fao/docrep/faometing/010/af179s.pdf>>
38. Forsythe, S. (2003). *Alimentos seguros: microbiología*. Ed. Acribia, Zaragoza. pp. 53.
39. García, G. (2005). *Comunicados Oficiales de Purina al Público*. Disponible en: <[www.el-carabobeno.com](http://www.el-carabobeno.com)>
40. Gimeno A. (2004). *La Legislación de la Unión Europea y Tolerancias para algunas Micotoxinas en la Alimentación*. Disponible en: <[www.engormix.com/la\\_legislacion\\_union\\_europea\\_s\\_articulos\\_54\\_MYC.htm](http://www.engormix.com/la_legislacion_union_europea_s_articulos_54_MYC.htm)>
41. González, A. (2001). *Estudios de contaminación de Aflatoxinas presentes en diversos frutos secos*. Universidad Mayor de San Andrés, España. pp. 67-89.
42. González, B. C. (2007). *Historia del mole*. Grupo Radio Centro. Cápsula 267.
43. González, S. R (1997). *Desafíos en la lucha contra las Micotoxinas*. Facultad de medicina Veterinaria. Universidad de Granma, Cuba. <[www.monografias.com/trabajos14/micotoxinas/](http://www.monografias.com/trabajos14/micotoxinas/)>
44. Hayes, P. (1993). *Microbiología e higiene de los alimentos*. Ed Acribia zaragoza. pp. 55.
45. Hernández, P.E. y Sanz, B. (1990). Intoxicaciones alimentarias de origen fúngico: Micotoxicosis. *Alimentaria* **30**: 35-39.
46. Howard, R (1986). *Sanidad alimentaria*. Ed. Acribia, Zaragoza. pp. 5.



47. International Commission on Microbiological Specifications for Foods (2001). *Microbiología de Alimentos. Ecología microbiana de los productos alimentarios*. Cap. Frutos en nuez, semillas oleaginosas y legumbres secas. Ed. Acribia, Zaragoza. pp. 333-353.
48. Instituto Nacional de Nutrición (1996). *Tabla nutricional de alimentos*. Disponible en: <[www.fao.org/infoods/tables\\_latín\\_es.stm](http://www.fao.org/infoods/tables_latín_es.stm)>
49. Jaimez, J.; Fuentes, C. A.; Vazqués, C. M.; Franco, A.; Cepeda, G.; Mahuzier, P. (2000). Application of the assay of aflatoxins by liquid chromatography with fluorescence detection in food analysis. *J. Chromatography*; **882**: 1-10.
50. Jiménez, M. ; Matero, R.; Huerta J. y Hernández E. (1991). Micotoxin and micotoxigenic moulds in nuts and sunflower seeds for human consumptions. *Mycopathologia*. **115**: 121-127.
51. Koneman, E.; Janda, W.; Alle, S.; Dowell, V. R. Sommers, H. M. (1992). *Diagnóstico microbiológico. Texto y atlas color*. 3a edición. Ed. Médica Panamericana. Argentina. pp 680-691.
52. Lansing, P. (2002). *Microbiología*. Ed. McGraw-Hill. Interamericana. pp. 74-78.
53. Lazcano, E (2005). Guía de aplicación de buenas prácticas de manufactura. Calidad de los alimentos Argentinos, proyecto ARG 96/006. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos. Disponible en: <[www.alimentosargentinos.gov.ar/programa\\_calidad/calidad/guias/Panificados2\\_ok.pdf](http://www.alimentosargentinos.gov.ar/programa_calidad/calidad/guias/Panificados2_ok.pdf)> -
54. Lee, L.S. y Hagler, W. (1991). *One Step Solid Phase Extraction Cleanup of Peanut and Corn Extracts for LC Quantification of Aflatoxin*. Abstracts of the 105th Association of Official Analytical Chemists Annual International Meeting. pp. 476-471.



55. Linder, E. (1995). *Toxicología de los alimentos*. Ed. Acribia, Zaragoza. pp. 117-125.
56. Lowry, O.H Rosebrouggh, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biology and chemistry*,**193**: 265-275.
57. Lumbreras, S.A.; Hernández, H.J.; Hernández, J. E. y Sanchís, V. A. (1997). Contenido de aflatoxinas y *Aspergillus flavus* en maíz almacenado en silos comerciales. *Alimentaria*, Marzo 20. Valencia, España. pp.173-181.
58. Márquez, R y Vera, E. (2000). *Control de micotoxinas en alimentos para animales*. Disponible en: <[www.snitt.org.mx/pdfs/tecnologias/Alimenta/ARCHIVO12.pdf](http://www.snitt.org.mx/pdfs/tecnologias/Alimenta/ARCHIVO12.pdf)>
59. Martínez, G. A. (2003). *Contenido nutricional y características de algunos productos*. Disponible en: <[www.dulcestipocosmexicanos.com.informacion.html](http://www.dulcestipocosmexicanos.com.informacion.html)>
60. Medina, J. C.; Castillo E. (2003) *Determinación de micotoxinas por medio de ensayos inmunoquímicos*. Disponible en: <[www.fao.org/](http://www.fao.org/)>
61. Medina, L.M.; Barrios Ma. J.; López M.C.; Jordano R. (1998). "Micotoxinas en quesos. Biota micotoxigénica y factores que afectan a la biosíntesis de Micotoxinas". *Alimentaria* **34**: 239.
62. Millán, T. R. y Martínez, Y. A (2003). Eficacia y estabilidad del proceso de amonificación como tecnología de descontaminación de aflatoxina B<sub>1</sub> en arroz (*Oriza sativa*). *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, **53**(3): 159-166.
63. Molina, M. y Giannuzzi, L. (2002). Modelling of aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* in a solid medium at different temperatures, pH and propionic acid concentrations. *Food Research Int.* **35**: 585- 594.



64. Moreno, E. (1988). *Manual para la identificación de hongos en granos y sus derivados*. Ed. UNAM. pp. 10-44.
65. Nicholas, J. (1999). *Higiene de los alimentos*. Ed. Acribia Zaragoza. pp. 96.
66. Novarom, S.R.L. (2000). *El Sabor y los Aditivos Saborizantes*. Disponible en: <[www.alfaditores.com/historico/alimnaria/Marzo%20Abril%202004%20IA%20EI%20Sabor%20y%20los%20Aditivos.pdf](http://www.alfaditores.com/historico/alimnaria/Marzo%20Abril%202004%20IA%20EI%20Sabor%20y%20los%20Aditivos.pdf)>
67. OMS (2004). *Respuestas de salud pública a las armas biológicas y químicas*. Disponible en: <[www.paho.org/spanish/DD/PED/armasbiologicas1.pdf](http://www.paho.org/spanish/DD/PED/armasbiologicas1.pdf)>
68. ONU (2002). *Sistemas de calidad e inocuidad de los alimentos. Manual de capacitación sobre higiene de los alimentos y sobre el sistema de análisis de peligros y de puntos críticos de control (APPCC)*. Ed. ONU. pp. 57-58.
69. Orihuel, E.; Berto, R.; Milvaques; Navarro, M. (2003). *Manual de manipuladores de alimentos para las industrias*. Colección seguridad alimentaria N° 2. Ed. TROTA, BETELGEUX. S.A. pp. 35.
70. Pearson, D. (1998). *Técnicas de Laboratorio para el análisis de alimentos*. Ed. Acribia. Zaragoza. pp. 55 – 58.
71. Peraica, M; Radic, B; Lucic. (1999) *Efectos tóxicos de las micotoxinas en el ser humano*. Bulletin of the World Health Organization. Disponible en: <[whqlibdoc.who.int/boletin/](http://whqlibdoc.who.int/boletin/)>
72. Pérez, P. A. (1997). Instituto de Nutrición de Higiene de los Alimentos. Infanta (1158) Ciudad de la Habana, 10 300, Cuba.
73. Perusia, O. y Rodríguez R. (2001) Micotoxicosis. *Revista de Investigaciones de Perú*. **12** (2):87-110.



74. PROFECO (2004). *Tecnologías domesticas*. Disponible en: <[www.profeco.gob.mx/tecnología/tecnologías.asp](http://www.profeco.gob.mx/tecnología/tecnologías.asp)>
75. Quintanar-Vidal R. M. (2005). *Fundamentos de análisis microbiológicos de alimentos: teoría y práctica*. Ed. AGT Editor S.A. pp 13-31.
76. Robles, B. (2000). *Los Sabores de Nuestros Ancestros Historia de la Cocina Mexicana*. Disponible en: <[www.uag.mx/](http://www.uag.mx/)>
77. Rodríguez, M. M (2002). *The color of food. Aditivos Alimentarios: El color en los alimentos*. Disponible en: <[infoagro.net/es/apps/news/record\\_view.cfm?vsys=a2&id=4703](http://infoagro.net/es/apps/news/record_view.cfm?vsys=a2&id=4703)>
78. Rumbado, M y Aluffi, O (2004). Secretaria de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos: El consumidor frente a los alimentos.
79. Saade, R. L. y Montez H. S. (2002). *La agricultura en mesoamerica. Cucúbitas*. FAO. Disponible en: <[www.rlc.fao.org/prior/segalim/prodalim/prodveg/cdrom/contenido/libro09/Cap2\\_3.htm](http://www.rlc.fao.org/prior/segalim/prodalim/prodveg/cdrom/contenido/libro09/Cap2_3.htm)>
80. Sánchez M. y Barona A. (1994). El mercado de dulces de la ciudad de México. México desconocido No. 213. pp. 26-27.
81. Santos, C. O. M. (1999). Importancia y efecto de la aflatoxina. *MedUnab*. Disponible en: <[www.imbiomed.com/1/1/articulos](http://www.imbiomed.com/1/1/articulos)>
82. S.E.C. (2006). *Que son las aflatoxinas*. Disponible en: <[www.foyel.com/](http://www.foyel.com/)>
83. Secretaria de patrimonio y fomento industrial (1982). Norma mexicana NMX-F-422-1982 productos alimenticios para uso humano-alimentos regionales-mole y sus variedades. Disponible en: <[www.economia.gob.mx/](http://www.economia.gob.mx/)>





84. Secretaría de Salud (1994). Norma oficial mexicana NOM-113-SSA1-1994, bienes y servicios. Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa. Disponible en: <[www.economia.gob.mx/](http://www.economia.gob.mx/)>
85. Secretaría de Salud (1994). Norma oficial mexicana NOM-092-SSA1-1994, bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa. Disponible en: <[www.economia.gob.mx/](http://www.economia.gob.mx/)>
86. Secretaría de Salud (1994). Norma oficial mexicana NOM-255-SSA1-1994, bienes y servicios. Método para la cuenta de hongos y levaduras en placa. Disponible en: <[www.economia.gob.mx/](http://www.economia.gob.mx/)>
87. Secretaría de Salud (2002). Norma Oficial Mexicana NOM-188-SSA1-2002, Productos y Servicios. Control de aflatoxinas en cereales para consumo humano y animal. Especificaciones sanitarias. Disponible en: <[www.salud.gob.mx/](http://www.salud.gob.mx/)>
88. Serrano, I. (2007). El mole, de manteles largos en Milpa Alta. El universal. Disponible en: <[www.el-universal.com.mx/articulos/42728.html](http://www.el-universal.com.mx/articulos/42728.html)>
89. Serrena-Saldívar, S. O. (2001). *Química, almacenamiento e industrialización de los cereales*. Ed. AGT editor S.A. pp133.
90. Silva, M. A. (2007). Asesoría técnica en la purificación, aislamientos e identificación de hongos. Ceparío de la Facultad de Química.
91. Soliman, K. M. y Badaea, R. I. (2002). Effect of oil extractor from some medicinal plants on different micotoxigenic fungi. *Food chemical toxicology*. **40**:1669-1675.
92. Soriano, J. (2007). *Micotoxinas en alimentos*. Ed. Diaz de Santos. España. pp. 392.
93. Stoloff, L. y Trucksess, M. W. (1996). Rationales for the establishment of limits and regulations for mycotoxins. *Food Additives and Contaminants* **8**: 213-222.



94. Thatcher, F. S. y Clark, D. S. (1973). *Análisis microbiológicos de los alimentos*. Ed. Acribia Zaragoza. pp 30-83.
95. Thie, I. B., Castle de Menezes, H., Vicente, E., Leite, R. S. F. y Hiromi, T. M. (2007). Aflatoxigenic fungi and aflatoxins ocurrence in sulanas and dried figs commercialized in Brasil. *Food control*, **18**: 454-457.
96. Unión Europea (2007). *Tolerancias para algunas Micotoxinas en la Alimentación*. Disponible en: <[www.engormix.com/articulo\\_legislacion\\_union\\_europea](http://www.engormix.com/articulo_legislacion_union_europea)>
97. Urrego, N. J. R y Días, G. J. (2006). Aflatoxins and its mechanisms of toxicity in hepatic cancer. *Revista Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia*. **54**. Disponible en : <[www.scielo.org.co/v54n2/v54n2a06fig5.jpg](http://www.scielo.org.co/v54n2/v54n2a06fig5.jpg)>
98. Vidal Q, R. L. (2005). *Fundamentos de análisis microbiológico de alimentos. Teoría y práctica*. Ed. AGT. EDITOR, S.A. pp. 12-29.
99. Vicam Science Technology (1999) . *AflatB Instrument Manual*. December, Watertown, U.S.A. pp. 23-31.
100. Viñas, I.; Bonet, J. y Sanchis, V. (1999). Mycotoxins and toxigenic species incidence in oilseed rape. *Food Control* **4**:79-82
101. Zinedine, A., Brera, C., Elakhdari, S. Catano, C., Debegnach, F., Angelini, S., DE Santis, B., Faid, M., Benlemlith, M., Minardi, V. y Miraglia, M. (2006). Natural ccurrence of mycotoxins in cereals and ápices commercilized in Morocco. *Food*, **17**: 868-874.



### ABREVIATURAS.

AFB1	Aflatoxina B1
AFB2	Aflatoxina B2
AFG1	Aflatoxina G1
AFG2	Aflatoxina G2
ATF	Ácido trifluoroacético
aw	Actividad de agua
°C	Grados centígrados
E. coli	Escherichia coli
ETAs	Enfermedades transmitidas por los alimentos
FAO	Organización de las Naciones unidas para la agricultura y la alimentación
FDA	Administración de alimentos y medicamentos.
Fig.	Figura
HR	Humedad relativa
Kg	Kilogramos
LD50	Dosis letal 50
µg/Kg	Microgramos/kilogramos.
min	Minutos
ml	Mililitro
ng	Nanogramo
OMS	Organización Mundial de la Salud.
ONU	Organización de las naciones unidas
OPS	Organización Panoamericana de la Salud.
PAG	Protein advisory group
PCC	Punto de control crítico
pH	Potencial de hidrogeno.
Ppb	Partes por billón
Ppm	Partes por millón
Profeco	Procuraduría federal del consumidor.
T	Temperatura
UFC/g	Unidades formadoras de colonias/gramos