



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

“Estudio comparativo, identificación y cuantificación de las toxinas, mutágenas y cancerígenas, del hongo *Aspergillus* spp. llamadas Aflatoxinas, en pistache (*Pistacia vera* L.) de México, Turquía y Grecia”.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO DE ALIMENTOS

PRESENTA

JORGE MARIO GAVILÁN RUIZ

México, D.F.

2013





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.



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.

Jurado asignado:

Presidente	Juan Diego Ortiz Palma Perez
Vocal	Gloria Diaz Ruiz
Secretario	Magda Carvajal Moreno
1er. Suplente	Silvia Citlalli Gama Gonzalez
2° Suplente	Adrián de Santiago Zarate

Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio de Micotoxinas C-119
Departamento de Botánica
Instituto de Biología
Universidad Nacional Autónoma de México

Nombre completo y firma de la asesora del Tema:

Dra. Magda Carvajal Moreno

Nombre completo y firma del sustentante:

Jorge Mario Gavilán Ruiz

INDICE

Contenido	Página
Indice.....	i
Lista de Tablas.....	iii
Lista de Figuras.....	iv
Lista de Abreviaturas.....	v
Resumen.....	vii
Abstract.....	viii
I. Introducción.....	1
1.1. Generalidades del cultivo de pistache.....	1
1.2. Producción mundial, principales importadores y exportadores.....	3
1.2.1. Producción mundial.....	3
1.2.2. Países importadores y exportadores.....	4
1.2.3. Producción de pistache en México.....	5
1.3. Micotoxinas.....	5
1.4. Toxicidad de las Micotoxinas.....	6
1.5. Hongos del género <i>Aspergillus</i>	6
1.6. Factores que afectan al desarrollo de hongos <i>Aspergillus</i> y la producción de AF.....	7
1.6.1. Temperatura.....	7
1.6.2. Actividad de agua (a_w)	7
1.6.3. Influencia del pH.....	7
1.7. Generalidades de las Aflatoxinas (AF)	8
1.7.1. Propiedades fisicoquímicas de las AF.....	10
1.7.2. Efectos a la salud.....	10
1.7.3. Aflatoxinas en el pistache.....	11
1.8. Control de las AF	12
1.8.1. Medidas en el campo.....	12
1.8.2. Medidas durante el almacenamiento.....	12
1.8.3. Medidas complementarias.....	13
1.8.3.1. Fungicidas.....	13
1.8.3.2. Inactivación por calor.....	13
1.8.3.3. Irradiación.....	13
1.8.3.4. Biocontrol por microorganismos degradadores de AF.....	13
1.9. Análisis de micotoxinas en alimentos.....	14
1.9.1. Cromatografía en capa fina.....	14
1.9.2. Cromatografía de gases.....	14
1.9.3. Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).....	14
II. Justificación.....	16
III. Hipótesis.....	17

IV. Objetivos	18
4.1. General.....	18
4.2. Particulares.....	18
V. Materiales y Métodos	19
5.1. Muestras.....	19
5.2. Muestreo.....	19
5.2.1. Muestreo en México.....	19
5.2.2. Muestreo en Turquía.....	20
5.2.3. Muestreo en Grecia.....	20
5.3. Preparación de las muestras.....	20
5.4. Condiciones cromatográficas.....	20
5.5. Validación del método.....	21
5.5.1. Linealidad.....	21
5.5.1.1. Curvas de calibración de AFB ₁ , AFB ₂ , AFG ₁ y AFG ₂	21
5.5.2. Límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ).....	22
5.5.3. Porcentaje de recuperación.....	22
5.5.4. Prueba de selectividad.....	23
5.6. Método de extracción de las muestras.....	23
5.7. Método de purificación y elución de las muestras.....	24
5.8. Método de derivatización de las muestras.....	24
5.9. Cuantificación de las AF de las muestras por HPLC.....	24
5.10. Análisis estadístico.....	24
VI. Resultados y Discusión	25
6.1. Validación del método.....	25
6.1.1. Linealidad.....	25
6.1.1.1. Curvas de calibración de AFB ₁ , AFB ₂ , AFG ₁ y AFG ₂	25
6.1.2. Límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ).....	30
6.1.3. Porcentaje de recuperación.....	30
6.1.4. Prueba de selectividad.....	33
6.2. Cuantificación de AF en las muestras por HPLC.....	34
6.3. Análisis estadístico.....	40
VII. Conclusiones	45
VIII. Bibliografía	47

LISTA DE TABLAS

Nº	Contenido de Tabla	Página
1	Información nutrimental del pistache (Vázquez <i>et al.</i> , 2005).....	2
2	Principales países productores de pistache de 2008 a 2010. (FAOSTAT, 2010).....	3
3	Principales países exportadores de pistache durante 2010 (FAOSTAT, 2010).....	4
4	Principales países importadores de pistache durante 2010 (FAOSTAT, 2010).....	4
5	Producción agrícola de pistache en diferentes Estados en 2011 (SIAP, 2011b).....	5
6	Micotoxinas elaboradas por especies de <i>Aspergillus</i> (Soriano, 2007).....	7
7	Muestreo de pistache en la Ciudad de México.....	19
8	Muestreo de pistache en la Ciudad de Estambul.....	20
9	Pesos moleculares y coeficientes de extinción de cada AF (OPS, 1983)....	21
10	Rango de Tiempos de retención de cada AF obtenido de las pruebas de recuperación, selectividad y de las curvas de calibración.....	25
11	Concentraciones utilizadas para obtener la curva de calibración de AF (ng mL ⁻¹).....	26
12	Datos de la curva de calibración de AFB ₁	26
13	Datos de la curva de calibración de AFB ₂	27
14	Datos de la curva de calibración de AFG ₁	28
15	Datos de la curva de calibración de AFG ₂	29
16	Valores obtenidos de LOD y LOQ.....	30
17	Datos del experimento de Porcentaje de Recuperación.....	30
18	Aflatoxinas del pistache de la Ciudad de México, Turquía y Grecia.....	35
19	Resultados obtenidos de la prueba de Kruskal-Wallis.....	40

LISTA DE FIGURAS

Nº	Contenido de la Figura	Página
1	Pistache (<i>Pistacia vera</i> L.) de La Familia Anacardiaceae.....	1
2	Pistachero.....	2
3	Fases de crecimiento fúngico y síntesis de micotoxinas (Soriano, 2007)....	5
4	Estructura química de algunas Aflatoxinas (Soriano, 2007).....	9
5	Formación de aductos de la AFB ₁ (Jeffrey & Williams, 2005).....	11
6	Reacción de derivatización de las AFB ₁ y AFB ₂ (Takahashi, 1977).....	15
7	Curva de calibración de AFB ₁	26
8	Curva de calibración de AFB ₂	27
9	Curva de calibración de AFG ₁	28
10	Curva de calibración de AFG ₂	29
11	Primera repetición de AFB ₁	31
12	Segunda repetición de AFB ₁	31
13	Tercera repetición de AFB ₁	31
14	Primera repetición de AFB ₂	31
15	Segunda repetición de AFB ₂	31
16	Tercera repetición de AFB ₂	31
17	Primera repetición de AFG ₁	32
18	Segunda repetición de AFG ₁	32
19	Tercera repetición de AFG ₁	32
20	Primera repetición de AFG ₂	32
21	Segunda repetición de AFG ₂	32
22	Tercera repetición de AFG ₂	32
23	Cromatograma obtenido de estándares mezclados de las AFB ₁ , AFB ₂ , AFG ₁ y AFG ₂	33
24	Muestra de pistache de la Delegación de Coyoacán contaminada con AFB ₁ , AFB ₂ , AFG ₁ y AFG ₂	33
25	Gráfica de concentraciones de AFB ₁ y AFB ₂ en las muestras, método por HPLC.....	36
26	Gráfica de concentraciones de AFG ₁ y AFG ₂ en las muestras, método por HPLC.....	37
27	Gráfica de concentraciones de AFt en las muestras, método por HPLC.....	38
28	Prueba estadística Wilcoxon / Kruskal-Wallis de AFB ₁ y AFB ₂	41
29	Prueba estadística Wilcoxon / Kruskal-Wallis de AFG ₁ y AFG ₂	42
30	Prueba estadística Wilcoxon / Kruskal-Wallis de AFt.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
ACN	Acetonitrilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ATF	Ácido trifluoroacético
a_w	Actividad de agua
AFB ₁ -ADN	Aducto de Aflatoxina B ₁ ácido desoxirribonucleico
AFB ₁ -N ⁷ -Gua	Aducto de 8,9-dihidro-8-(N ⁷ -guanil)-9-hidroxiaflatoxina B ₁
AF	Aflatoxina (s)
AFB ₁	Aflatoxina B ₁
AFB ₂	Aflatoxina B ₂
AFB _{2a}	Aflatoxina B _{2a}
AFG ₁	Aflatoxina G ₁
AFG ₂	Aflatoxina G ₂
AFG _{2a}	Aflatoxina G _{2a}
AFM ₁	Aflatoxina M ₁
AFM ₂	Aflatoxina M ₂
AFP ₁	Aflatoxina P ₁
AFQ ₁	Aflatoxina Q ₁
AFt	Aflatoxinas totales
H ₂ O	Agua
NaN ₃	Azida Sódica
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
KCl	Cloruro de Potasio
NaCl	Cloruro de Sodio
R ²	Coeficiente de correlación
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución
Em	Emisión
Exc	Excitación
KH ₂ PO ₄	Fosfato de potasio monobásico

Abreviatura	Significado
Na ₂ HPO ₄	Fosfato de sodio monobásico hidrogenado
°C	Grados Celsius
g	Gramos
Ha	Hectáreas
Kg	Kilogramos
LOQ	Límite de cuantificación
LOD	Límite de detección
Log	Logaritmo
Luz UV	Luz ultravioleta
MeOH	Metanol
µg	Microgramos
µL	Microlitros
µm	Micrómetros
mg	Miligramos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
min	Minutos
ng	Nanogramos
nm	Nanómetros
N ⁷	Nitrógeno 7 que es el punto de unión del aducto con el ADN
PM	Peso molecular
Rayos γ	Rayos gamma
Tr	Tiempo de retención
ton	Toneladas

RESUMEN

Las Aflatoxinas (AF) son metabolitos secundarios (bis-dihidro-furanocumarinas) con propiedades cancerígenas potentes. El hombre ingiere continuamente AF en multitud de alimentos y estas pueden producir diferentes tipos de cáncer, abortos, vómitos, diarreas y hemorragias internas que pueden causar la muerte. Dado lo anterior es de gran importancia realizar la identificación y cuantificación de AF en pistache ya que es una oleaginosa muy susceptible.

Este estudio consistió en el análisis de 55 muestras de pistache de las cuales 48 eran provenientes de la Ciudad de México, seis de la ciudad de Estambul en Turquía y una de Santorini en Grecia. Para el análisis las muestras se prepararon y extrajeron para llevar a cabo la identificación y cuantificación de AF.

Los resultados demostraron que todas las muestras se encontraban contaminadas aunque con niveles muy bajos.

El 36.36% de las muestras se encontraron contaminadas con AFB₁ (0.10 a 4.15 ng g⁻¹), el 100% de las muestras con AFB₂ (0.01 a 4.00 ng g⁻¹), el 100% con AFG₁ (0.02 a 1.02 ng g⁻¹), el 56.36% con AFG₂ (0.46 a 8.09 ng g⁻¹) y el 100% con AFt (0.04 a 8.39 ng g⁻¹).

La muestra más contaminada por AFB₁ (4.15 ng g⁻¹) y AFG₁ (1.02 ng g⁻¹) fue la proveniente de la delegación Xochimilco del Mercado de Xochimilco, por AFB₂ (4.00 ng g⁻¹) fue la del Mercado Tulyehualco de la delegación Xochimilco, por AFG₂ (8.09 ng g⁻¹) y AFt (8.39 ng g⁻¹) fue una de las seis muestras del Mercado Bazar de las Especies de la ciudad de Estambul en Turquía.

Mediante el análisis estadístico de los resultados se encontró que existe diferencia significativa entre el contenido de AF (B₁, B₂, G₁, G₂ y total) y el lugar de origen de las muestras, esto se debe a que la concentración de AF en algunas muestras fue superior a las demás.

ABSTRACT

Aflatoxins (AF) are secondary metabolites (bis-dihydro-furancoumarins) with potent carcinogenic properties. The man consume AF continuously in many foods and they can produce different types of cancer, abortions, vomiting, diarrhea and internal bleeding that can cause death. Accordingly, it was very important to include the identification and quantification of AF in pistachio as it is a very sensitive oilseed.

This study involved the analysis of 55 samples of pistachio seeds from which 48 were from Mexico City, six from the city of Istanbul in Turkey, and one from Santorini in Greece. Samples for analysis were prepared and extracted to carry out identification and quantification of AF.

Although the samples had very low aflatoxin levels, all of them were contaminated. A 36.36% of the samples were contaminated with AFB₁ (0.10 to 4.15 ng g⁻¹), 100% of the samples with AFB₂ (0.01 to 4.00 ng g⁻¹), 100% with AFG₁ (0.02 to 1.02 ng g⁻¹), a 56.4% with AFG₂ (0.46 to 8.09 ng g⁻¹) and 100% with AF_t (0.04 to 8.39 ng g⁻¹). The most contaminated samples were, with AFB₁ (4.15 ng g⁻¹) and AFG₁ (1.02 ng g⁻¹) were from Xochimilco market; by AFB₂ (4.00 ng g⁻¹) was from the Tulyehualco market also in Xochimilco; by AFG₂ (8.09 ng g⁻¹) and total AF (8.39 ng g⁻¹) was one of the six samples from the Spice Bazaar market in the city of Istanbul, in Turkey.

The Statistical Analysis of the results showed that a significant difference exists between the content of AF (B₁, B₂, G₁, G₂ and total aflatoxin), and the place of origin of the samples, this is because the concentration of aflatoxins in some samples was higher than in others.

I. INTRODUCCIÓN

1.1. Generalidades del cultivo de pistache.

El pistache (*Pistacia vera* L.) de la familia Anacardiaceae tiene un fruto seco, ovalado, con cáscara exterior dura, lisa y de color marrón claro (**Figura 1**), con una semilla color amarillo verdosa que es la parte comestible, de olor grato y sabor suave. Se originó en Asia central y occidental, y los cultivos se extendieron a los países mediterráneos, principalmente a Italia. Actualmente su cultivo se desarrolla en Asia, todos los países del sur de Europa, parte de África y de Sudamérica, así como sur de Estados Unidos (California, Texas, Arizona y Nuevo México) (Díaz, 2004; Ballistreri *et al.*, 2010). El pistache es uno de los frutos secos preferidos en el mundo y se cultiva en zonas salinas, secas y calurosas pues su resistencia a las altas temperaturas, a la sequía e intolerancia a la humedad es superior a la de otros frutales. Se cultiva en suelos que no son aptos para otros cultivos frutales (Set, 2009; Vitale *et al.*, 2013).

A menudo los pistaches se comen y exportan crudos, tostados y salados para su posterior utilización en postres, helados y dulces (Pittet, 1998; Freire *et al.*, 2000, Set & Erkmén, 2010). El pistache se emplea en repostería para la elaboración de helados, tartas y pasteles así como para aromatizar platos de cocina como condimento (Díaz, 2004).



Figura 1. Pistache (*Pistacia vera* L.) de la Familia Anacardiaceae.

El nombre español del árbol pistachero es alfóncigo ó alfónsigo (**Figura 2**), generalmente no supera los 10 m de altura, sus flores son púrpuras y pequeñas, es una planta de lento crecimiento que fructifica hasta los 12 años, llegando a sus mayores cosechas

a los 30 años. Los pistaches se recolectan cuando la cubierta exterior se desprende con facilidad, una simple vibración del árbol tira los pistaches que generalmente se recogen en lonas (Díaz, 2004).



Figura 2. Pistachero.

El pistache es uno de los frutos secos más populares en el mundo por su alto valor nutritivo y sabor único, contiene grasas, proteínas, hidratos de carbono, vitaminas y minerales (**Tabla 1**). Existen diferencias en el contenido y tipo de ácidos grasos del pistache (Vázquez *et al.*, 2005), como son el ácido oleico del 54.7 al 71.8 %, ácido linoleico del 16.7 al 35.3 %, ácido palmítico del 7.2 al 10.5 %, ácido esteárico del 0.9 al 2.5 %, y ácido linolénico menos del 2% (Bellomo & Fallico, 2007; Gamli & Hayoglu, 2007).

Tabla 1. Información nutrimental del pistache (Vázquez *et al.*, 2005).

Nutrimento	Contenido
Grasas (Lípidos)	52 %
Proteínas	18 %
Hidratos de Carbono	12 %
Calcio	136 mg
Hierro	7.3 mg
Vitamina B1	0.69 mg

El consumo de pistache es parte de una dieta saludable pues se reduce el consumo de ácidos grasos saturados y aumenta la ingesta de ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados (Kris-Etherton *et al.*, 2008; Sabaté & Ang, 2009; Lloyd-Jones *et al.*, 2010; Ros *et al.*, 2010), protege contra enfermedades cardiacas pues reduce el colesterol total (Edwards *et al.*, 1999; Kocyigit *et al.*, 2006; Sheridan *et al.*, 2007; Gebauer *et al.*, 2008; Sari *et al.*, 2010).

1.2. Producción mundial, principales importadores y exportadores.

1.2.1. Producción mundial

Actualmente, las principales zonas productoras se encuentran en el Sur y Occidente de Asia, Estados Unidos y Europa. Los principales países productores son Irán, Estados Unidos, Turquía y Siria. China, Grecia, Afganistán, Túnez, Italia tienen menor producción, y México produjo 71 ton y ocupó el 16º lugar en 2010 (FAOSTAT, 2010).

Se presentan los principales países productores de pistache de 2008-2010 (**Tabla 2**).

Tabla 2: Principales países productores de pistache de 2008 a 2010 (FAOSTAT, 2010).

Año 2008		Año 2009		Año 2010	
País	Toneladas	País	Toneladas	País	Toneladas
 Irán	446,647	 Irán	446,647	 Irán	446,647
 Estados Unidos	126,100	 Estados Unidos	175,088	 Estados Unidos	213,000
 Turquía	120,113	 Turquía	81,795	 Turquía	128,000
 Siria	52,600	 Siria	61,484	 Siria	57,500
 China	40,000	 China	45,000	 China	48,700
 Grecia	8,100	 Grecia	5,518	 Grecia	9,000
 Afganistán	3,300	 Afganistán	3,000	 Afganistán	3,000
 Túnez	2,500	 Túnez	2,500	 Túnez	2,600
 Italia	2,000	 Italia	1,896	 Italia	1,600
 Pakistán	773	 Kirguistán	820	 Kirguistán	800
 Kirguistán	759	 Pakistán	773	 Pakistán	663
 Madagascar	254	 Uzbekistán	205	 Costa de Marfil	250
 Costa de Marfil	206	 Madagascar	203	 Madagascar	210
 Uzbekistán	190	 Costa de Marfil	164	 Uzbekistán	200
 Marruecos	69	 Marruecos	80	 Marruecos	80
 Chipre	24	 México	66	 México	71
 México	9	 Chipre	40	 Chipre	50
 Mauricio	7	 Mauricio	6	 Mauricio	6
 Azerbaiyán	3	 Azerbaiyán	2	 Azerbaiyán	2

1.2.2. Países importadores y exportadores

Los mayores exportadores son Estados Unidos, Irán, RAE Hong Kong y los Emiratos Árabes Unidos (**Tabla 3**). Los principales países importadores son RAE Hong Kong, China, Alemania y los Emiratos Árabes Unidos (**Tabla 4**).

Tabla 3: Principales países exportadores de pistache durante 2010 (FAOSTAT, 2010).

Lugar de exportación	País	Cantidad (tons)	Lugar de exportación	País	Cantidad (tons)
1	 Estados Unidos	113,363	11	 Siria	2,559
2	 Irán	76,124	12	 Turquía	2,376
3	 RAE de Hong Kong	30,036	13	 Afganistán	1,969
4	 Emiratos Árabes Unidos	14,155	14	 Grecia	1,248
5	 Australia	14,080	15	 España	1,079
6	 Países Bajos	13,451	16	 Eslovaquia	904
7	 Alemania	13,200	17	 Italia	759
8	 Bélgica	12,875	18	 Francia	617
9	 Luxemburgo	9,111	19	 Túnez	535
10	 China	4,461	20	 Arabia Saudita	372

Tabla 4: Principales países importadores de pistache durante 2010 (FAOSTAT, 2010).

Lugar de importación	País	Cantidad (tons)	Lugar de importación	País	Cantidad (tons)
1	 RAE de Hong Kong	55,125	11	 Francia	9,806
2	 China	38,142	12	 India	9,199
3	 Alemania	34,516	13	 Arabia Saudita	4,623
4	 Emiratos Árabes Unidos	17,058	14	 Japón	4,567
5	 Países Bajos	16,424	15	 Reino Unido	3,724
6	 Bélgica	14,038	16	 Grecia	3,103
7	 Luxemburgo	11,848	17	 Líbano	3,067
8	 Rusia	11,776	18	 Israel	2,426
9	 España	11,137	19	 Egipto	2,267
10	 Italia	10,282	20	 Australia	2,160

1.2.3. Producción de pistache en México

En el año 2011 México ocupó el lugar 16 en el mundo en cuanto a producción de pistache con 69.42 ton de Chihuahua, único Estado productor en México, con una superficie sembrada de 241.79 hectáreas y la superficie cosechada fue de 123.30 hectáreas. Con un rendimiento (ton/Ha) de 0.56 (SIAP, 2011a) (**Tabla 5**).

Tabla 5. Producción agrícola de pistache en diferentes Estados en 2011 (SIAP, 2011b).

Estado	Superficie sembrada (Ha)	Superficie cosechada (Ha)	Producción (ton)	Rendimiento (ton/Ha)
Chihuahua	218.79	123.30	69.42	0.56
Baja California Sur	1.00	0.00	0.00	0.00
Nayarit	20.00	0.00	0.00	0.00

1.3. Micotoxinas

Los hongos utilizan para su crecimiento una serie de sustancias químicas, como pueden ser los ácidos nucleicos, proteínas, carbohidratos y lípidos principalmente. El uso de estas sustancias químicas se asocia con la fase de rápido crecimiento (Vaamonde, 1995; Carlile *et al.*, 2001).

Los metabolitos secundarios son una serie de compuestos que no son esenciales para el crecimiento vegetativo de los hongos. Dentro de este grupo, tenemos a los antibióticos y a las micotoxinas. Las micotoxinas se suelen formar al final de la fase exponencial o al principio de la fase estacionaria del crecimiento del moho (Soriano, 2007) (**Figura 3**).

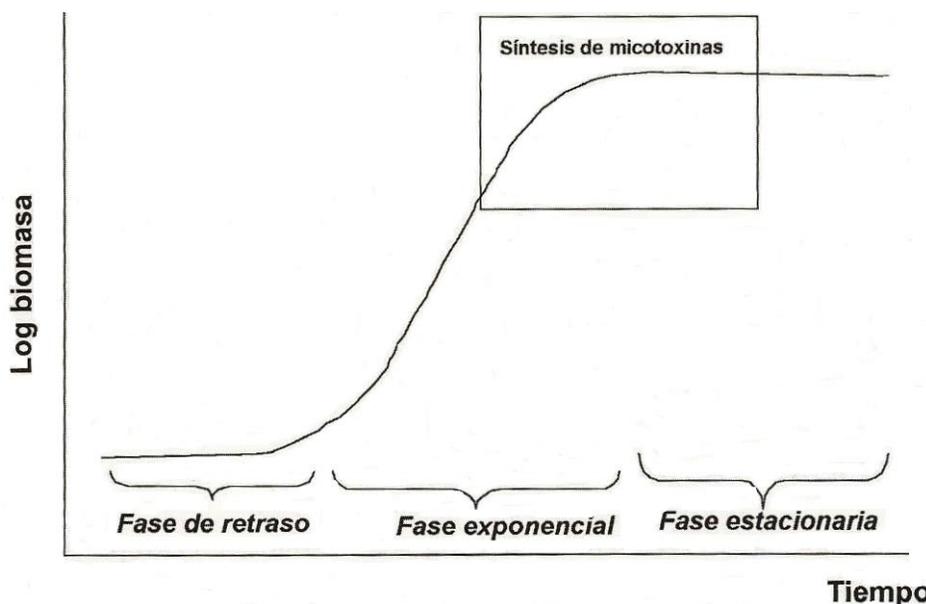


Figura 3. Fases de crecimiento fúngico y síntesis de micotoxinas (Soriano, 2007).

Las micotoxinas son moléculas relativamente pequeñas ($PM < 700$) (Moss, 1991). Son compuestos que se producen cuando la fase de crecimiento llega a su etapa final, en la fase estacionaria (Goldblatt, 1972).

Las micotoxinas pueden contaminar a los alimentos, piensos o materias primas utilizadas para su elaboración, originando un grupo de enfermedades denominadas micotoxicosis que afectan al hombre y a los animales (Soriano, 2007).

La micotoxicosis aguda es asociada al consumo de elevadas cantidades de micotoxinas en una sola ingesta y es un problema de salud animal, ya que los alimentos deteriorados por hongos se desechan o se destinan a su consumo. Mientras que para el hombre tiene mayor importancia la toxicidad crónica, asociada al consumo de pequeñas cantidades de micotoxinas durante periodos prolongados (Martínez & Anadón, 2006).

1.4. Toxicidad de las Micotoxinas

Elevados niveles de micotoxinas en la dieta pueden causar daños agudos y crónicos sobre la salud del hombre y una gran variedad de animales. Los efectos adversos son a distintos órganos, aparatos o sistemas, especialmente al hígado, riñón, sistema nervioso, endocrino e inmunitario. Los síntomas causados por las micotoxinas son tan diferentes como lo son sus estructuras químicas (Cameán & Repetto, 1997; Faustman & Omenn, 2005; Martínez & Anadón, 2006).

La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer ha situado la aflatoxina B₁ como cancerígeno grado I ya que existen suficientes evidencias de su poder cancerígeno en el humanos (Jaimez *et al.*, 2000; IARC, 2002; Castells *et al.*, 2008; Arino *et al.*, 2009).

1.5. Hongos del género *Aspergillus*

Las especies del género *Aspergillus* son ubicuas, aislándose de diferentes sustratos, con frecuencia de climas cálidos tropicales y subtropicales. La especie *Aspergillus flavus* es característica de los cereales como el maíz, produce únicamente AFB₁ y AFB₂, y la especie *Aspergillus parasiticus* presenta una afinidad especial por frutos de nuez y semillas de oleaginosas, es la que contamina a los pistaches. *A. parasiticus* y *A. nomius* producen 4 tipos de aflatoxinas (AF), B₁ (AFB₁), B₂ (AFB₂), G₁ (AFG₁), G₂ (AFG₂) (Soriano, 2007). En la **Tabla 6** se incluyen también otras dos especies que han sido recientemente descritas como productoras de AF: *A. pseudotamarii* y *A. bombycis* (Ito *et al.*, 2001; Peterson *et al.*, 2001; Chang *et al.*, 2005).

Las AF son producidas principalmente por los mohos *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus* y también son producidas por *A. nomius*, *A. bombycis* y *A. pseudotamarii*, que son especies menos frecuentes (Sweeney & Dobson, 1999; Yabe *et al.*, 1999; Mohanamba *et al.*, 2002; Bennett & Klich, 2003; Manonmani *et al.*, 2005; García & Heredia, 2006; Cheraghali *et al.*, 2007; Ghali *et al.*, 2009; Baltaci *et al.*, 2012; Georgiadou *et al.*, 2012).

Tabla 6. Micotoxinas elaboradas por especies de *Aspergillus* (Soriano, 2007).

Especie	AFB₁ y AFB₂	AFG₁ y AFG₂
<i>A. flavus</i>	+	-
<i>A. parasiticus</i>	+	+
<i>A. nomius</i>	+	+
<i>A. pseudotamarii</i>	+	-
<i>A. bombycis</i>	+	+

1.6. Factores que afectan al desarrollo de hongos *Aspergillus* y la producción de AF.

La temperatura, actividad de agua (a_w) y pH ejercen, sin duda, una presión sobre el desarrollo de hongos del género *Aspergillus*, y por tanto sobre la acumulación de AF (Frazier & Westhoff, 1985; Samson *et al.*, 1995; Soriano, 2007).

1.6.1. Temperatura

Aspergillus flavus y *A. parasiticus* crecen desde 10 a 43 °C, con un óptimo entre 32-33 °C. Las AF se producen a temperaturas entre 12 y 40 °C (Jiménez *et al.*, 1996).

1.6.2. Actividad de agua (a_w)

A. flavus y *A. parasiticus* crecen óptimamente a 0.99 a_w , estando la a_w mínima para su crecimiento entre 0.80 y 0.83. Las AF, sin embargo, se producen en el intervalo 0.95-0.99 a_w , aunque se ha detallado un mínimo de 0.82 a_w para *A. flavus* (ICMSF, 1996).

1.6.3. Influencia del pH

Por lo general, las especies de *Aspergillus* toleran mal los valores de pH muy ácidos (2-3). Su crecimiento se ve menos afectado a valores de pH alcalinos (Bullerman, 1985;

Wheeler *et al.*, 1991). Así, se ha comprobado que cuando *A. parasiticus* crece en un medio de cultivo con un pH menor de 6.0 se favorece la síntesis de las AF del grupo B, mientras que a valores de pH superiores a 6.0 se estimula la síntesis de AF del grupo G (Buchanan & Ayres, 1975; Ehrlich & Cotty, 2003).

1.7. Generalidades de las Aflatoxinas (AF)

La palabra aflatoxinas (A = del género *Aspergillus* y *fla* = de la especie *flavus*) se refiere a toxinas (= venenos) biosintetizados por el hongo *Aspergillus flavus* (Carvajal, 2004; Erkmen & Bozoglu, 2008). Fueron descubiertas en Inglaterra en 1960 como consecuencia de muertes inexplicables en 100,000 pavos (Enfermedad X de los pavos) y 14,000 crías de pato. La causa de las muertes se relacionó con la ingestión de harina de cacahuete que provocaba la muerte de los animales en un plazo de una semana revelando el examen post-mortem daño en las células hepáticas, diversos estudios permitieron determinar una serie de compuestos denominados AF (Asao *et al.*, 1965; D'Mello & Macdonald, 1997; Simon *et al.*, 1998; Bata & Lásztity, 1999; Jaimez *et al.* 2000; Blesa *et al.*, 2004). Las AF son alrededor de 18 metabolitos secundarios derivados de las furanocumarinas (Sweeney & Dobson, 1999; Rastogi *et al.*, 2001; Bhatnagar *et al.*, 2003; Unusan, 2006). La estructura química de las AF de tipo B se caracterizan por un anillo ciclopentanona y las AF de tipo G por un anillo de lactona. Las AFB₂ y AFG₂ tienen un anillo bisfuranil saturado y las AFB_{2a} y AFG_{2a} tienen una estructura bisfuranil hidratada (Leeson *et al.*, 1995; Bhatnagar *et al.*, 2003) (**Figura 4**).

Existen cuatro tipos principales de AF: AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂ (Moss, 2002; Bhatnagar *et al.*, 2003; Sodhi *et al.*, 2005). También se han aislado sus derivados hidroxilados M₁ (AFM₁), M₂ (AFM₂), AFB_{2a} y AFG_{2a}, aunque la AFB₁ es la más frecuente y tóxica (Shibamoto & Bjeldanes, 1996; Sweeney & Dobson, 1999).

La presencia y magnitud de la contaminación por AF varía en función de factores geográficos y estacionales, y también de las condiciones en que se cultiva, recolecta y almacena un producto agrícola. Los hongos aflatoxígenos pueden infectar los cultivos en crecimiento y producir toxinas antes de la cosecha o bien durante la recolección y posterior almacenamiento (Soriano, 2007).

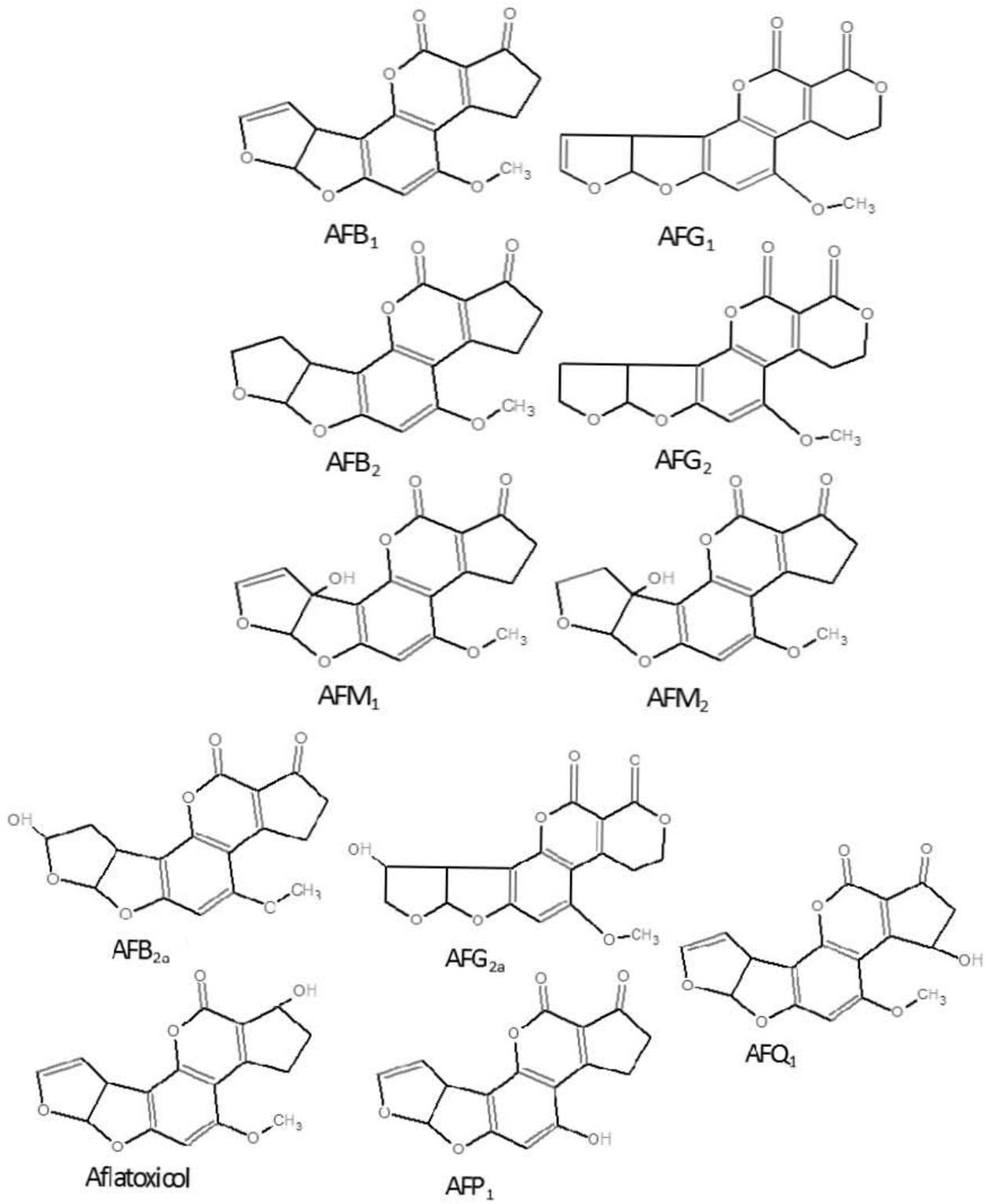


Figura 4. Estructura química de algunas Aflatoxinas (Soriano, 2007).

1.7.1. Propiedades fisicoquímicas de las AF

Las propiedades fisicoquímicas se relacionan con la nomenclatura de las AF, ya que las del tipo B presentan fluorescencia azul (Blue) y las tipo G fluorescencia verde (Green) cuando se les observa bajo luz ultravioleta de onda larga (Carrillo, 2003).

Las AF son solubles en solventes no polares o medianamente polares como el cloroformo y metanol, especialmente en dimetil sulfóxido, e insolubles en agua. Las AF son estables a altas temperaturas (cocción y pasteurización), además resisten la nixtamalización y fermentación.

1.7.2. Efectos a la salud

Las AF son potentes mutágenos, cancerígenos y teratógenos que causan la enfermedad llamada aflatoxicosis con efectos agudos, cuando se consumen en mg, y cuyos síntomas son hemorragias, diarreas, daños en hígado, edema, alteración en la digestión, en el metabolismo de los alimentos, y en ocasiones la muerte. Cuando se consumen niveles de μg ó ng de AF se producen efectos crónicos como son una baja absorción de los alimentos, crecimiento lento, baja respuesta a vacunas, inmunodepresión, cáncer, síndrome de Reye, hepatitis, cirrosis, Kwashiorkor o desnutrición proteica y problemas renales. Estudios epidemiológicos realizados en África y Asia, indican que existe una correlación positiva entre cáncer hepático y consumo de alimentos contaminados con AF (Wyllie & Morehouse, 1978; Wang & Groopman, 1999; Oğuz *et al.*, 2000; Chiavaro *et al.*, 2001; Hussein & Brasel, 2001; Bennett & Klich, 2003; Carrillo, 2003; Anguiano *et al.*, 2005).

La AFB₁ se considera la más importante, es absorbida en el intestino delgado y transportada por los glóbulos rojos y las proteínas plasmáticas hasta el hígado, mayoritariamente por vía portal. La toxina entra en la célula y es metabolizada para ser hidroxilada y transformarse en varios compuestos tales como la AFP₁, AFM₁ y AFQ₁ (Fernandes-Oliveira *et al.* 2000). También puede dar lugar a la formación de un producto oxidado y electrofílico llamado AFB₁-8,9-epóxido que es sumamente inestable y que presenta afinidad por diversas macromoléculas tales como ácido nucleicos y proteínas a las que se une covalentemente y por ello puede dar lugar a interrupciones en la transcripción y en la traducción, respectivamente. El AFB₁-8,9-epóxido se une al nitrógeno 7 (N⁷) de los residuos de guanina del ADN para formar el 8,9-dihidro-8-(N⁷-guanil)-9-hidroxaflatoxina B₁ (AFB₁-N⁷-Gua), con lo que se interrumpe la transcripción y disminuye la síntesis del ácido ribonucleico, lo que puede producir una mutación o iniciación al cáncer (Essigmann *et al.*, 1977; Croy, 1978;

Hertzog *et al.*, 1982; Aoyama *et al.*, 1990; Derache, 1990; Ramsdell *et al.*, 1991; Fujimoto *et al.*, 1994; Lindner, 1995; Vaamonde, 1995; Shibamoto & Bjeldanes, 1996; Smela *et al.*, 2001; Creppy, 2002; Scheidegger & Payne, 2003; Sotomayor *et al.*, 2003; Gimeno, 2004; Binder, 2007; Guzmán, 2007) (**Figura 5**). El hígado es el órgano que forma y acumula más aductos AFB₁-ADN (OPS, 1983).

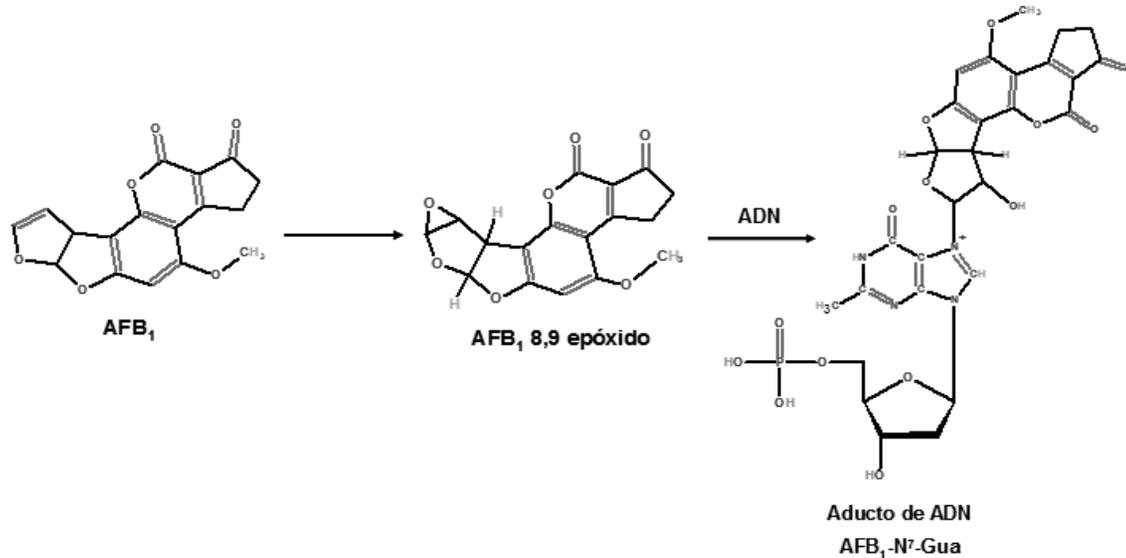


Figura 5. Formación de aductos de la AFB₁ (Jeffrey & Williams, 2005).

1.7.3. Aflatoxinas en el pistache

Entre el 5 y 10 % de los productos agrícolas en el mundo son dañados por mohos de tal forma que no pueden ser consumidos por humanos ni animales. Durante el manejo post-cosecha y almacenamiento del pistache se da la contaminación por medio de las esporas y se producen las AF que se traduce en graves riesgos para la salud y pérdidas económicas (Set & Erkmen, 2010).

Los productos agrícolas con mayor riesgo de contaminación por aflatoxinas incluyen el maíz, maní, nuez, pistache, higo, especias y pimienta (Trucksess & Scott, 2008).

Encuestas y programas de vigilancia realizados en varios países sobre la contaminación de frutos secos por aflatoxinas, mostraron que los pistaches tienen la mayor incidencia de contaminación (Abdulkadar *et al.*, 2000; Juan *et al.*, 2008; Ghosia & Arshad, 2011). Los altos niveles de aflatoxinas se relacionan con la cáscara agrietada o abertura prematura del pistache además de permitir el daño por insectos (Doster & Michailides, 1999).

Todos los países productores de pistacho se enfrentan con el problema de la contaminación por AF. Esto conduce a un costo adicional en la producción y a la pérdida de ingresos para los productores, distribuidores y consumidores (Cheraghali *et al.*, 2007).

La contaminación de los alimentos por AF es un fenómeno natural y frecuente, a nivel de campo o de almacenamiento de los granos en países tropicales y subtropicales (Santuario *et al.*, 1999), estas condiciones climáticas (temperatura de 30-35 °C y humedad relativa de 20% a 41%), estimulan el crecimiento de los hongos (Jordan & Pattison, 1996; Grippi *et al.*, 2008).

En 2006 en Irán se detectó que el 36.7% del pistache analizado presentaba un nivel medio de contaminación de 5.9 ± 41.7 ng g⁻¹ por AFB₁ y el 28.3% presentó un nivel medio de contaminación de 7.3 ± 53.2 ng g⁻¹ de Aflatoxina Total (AFt) (Cheraghali *et al.*, 2007).

En 2008 en Marruecos se detectó que el 45% del pistache analizado presentaba un nivel medio de contaminación de 158 ± 6.3 ng g⁻¹ por AFB₁ y el 45% presentó un nivel medio de 163 ± 5.4 ng g⁻¹ por AFt (Juan *et al.*, 2008).

En 2009 en Túnez se detectó que el 53% del pistache analizado estaba contaminado con un nivel medio de contaminación de 21.8 ± 38.0 ng g⁻¹ de AFt (Ghali *et al.*, 2009).

En 2013 en Irán se detectó que el 23.4% del pistache analizado presentaba un nivel medio de contaminación de 2.18 ± 13.1 ng g⁻¹ por AFB₁ y el 23.5% presentó un nivel medio de 2.42 ± 14.7 ng g⁻¹ de AFt (Dini *et al.*, 2013).

1.8. Control de las AF

1.8.1. Medidas en el campo

Son la primera línea de defensa contra la contaminación por AF y consisten en medidas como rociar con agua de forma periódica los caminos cercanos al cultivo para evitar la dispersión de esporas, la aplicación de plaguicidas para reducir al mínimo los daños por insectos, utilizar agua de calidad adecuada para el riego, mantener limpio el equipo de recolección y controlar las buenas prácticas sanitarias y de higiene personal durante la recolección (CODEX, 2005).

1.8.2. Medidas durante el almacenamiento

Las instalaciones de almacenamiento deben consistir en estructuras limpias, secas, bien ventiladas y que protejan al pistache (de la lluvia, de la entrada de roedores y aves), se puede incluir el uso de insecticidas y fungicidas (CODEX, 2005).

1.8.3. Medidas complementarias

1.8.3.1. Fungicidas

Fungicidas tales como carboxin, clortalonil, mancozeb, dicloran, iprodiona, metiltolclofos y vinclozolina se han mostrado eficaces para la inhibición del crecimiento y producción de AF por *A. flavus* y *A. parasiticus* (Sanchis *et al.*, 2007).

1.8.3.2. Inactivación por calor

El rango efectivo de temperaturas capaz de descomponer estas micotoxinas se sitúa entre los 237 y los 306 °C. Factores como la humedad y el pH del alimento tienen un efecto sinérgico reduciendo la actividad mutagénica de estas micotoxinas (Rastogi *et al.*, 2004).

1.8.3.3. Irradiación

El uso de la luz UV, rayos gamma (γ) y luz solar son los más empleados para la inactivación de las AF. La luz UV es efectiva ya que estas micotoxinas tienen un máximo de absorción a 362 nm, lo que permite obtener hasta 12 productos de fotodegradación que son menos tóxicos (Rodríguez *et al.*, 2003).

Los rayos γ , con 1 y 10 Kgy, pueden reducir en un 75 y 100% la presencia de AFB₁, por otro lado la radiación solar como fuente de luz UV produce entre un 16 y un 99% de destrucción de las AF. En la irradiación es importante la formación de radicales libres que interaccionan con el anillo furano terminal de la AFB₁ disminuyendo su actividad mutagénica (El-Nezami *et al.*, 1995).

1.8.3.4. Biocontrol por microorganismos degradadores de AF

Se ha demostrado la eficacia de determinados microorganismos para degradar las AF. *Flavobacterium aurantiacum* B-184 permite la degradación irreversible de estas AF (Ciegler *et al.*, 1966; Lillehoj *et al.*, 1967; Soriano, 2007).

1.9. Análisis de micotoxinas en alimentos

1.9.1. Cromatografía en capa fina

Desde 1960 ha sido uno de los métodos de elección para la investigación y determinación de micotoxinas. En la cromatografía en capa fina normal la fase estacionaria es polar y la fase móvil no polar, siendo arrastrados los componentes de las muestras de acuerdo a su polaridad permitiendo su separación. En la cromatografía de capa fina reversa, la fase móvil es polar y la fase estacionaria no polar. Sin embargo, en los últimos años esta técnica ha sido desplazada por otras técnicas cromatográficas (Soriano, 2007).

1.9.2. Cromatografía de gases

Es una técnica basada en la separación de compuestos en función de su volatilidad y afinidad por la fase estacionaria. Las micotoxinas son sustancias poco volátiles y se requiere una derivatización previa para analizarlas, siendo los productos de reacción susceptibles de ser determinados.

Se utilizan detectores de espectrometría de masas, tanto en sus modalidades de impacto electrónico o de ionización química (Soriano, 2007).

1.9.3. Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)

La cromatografía agrupa métodos diversos que facilitan la separación, identificación y determinación de componentes estrechamente relacionados en mezclas complejas. En cromatografía de líquidos la fase móvil es un líquido y la muestra se disuelve para pasarla por una fase estacionaria inmisible que permite separar dos o más componentes de una mezcla. Por medio de esta técnica se pueden analizar las AF usando cromatografía de líquidos en fase reversa en donde se usan fases estacionarias hidrocarbonadas y fases móviles polares, los componentes más polares eluyen primero (Skoog *et al.*, 2008).

El detector de fluorescencia se utiliza para el análisis de AF debido a la fluorescencia que presentan. Para incrementar la fluorescencia de las AF se derivatizan con ácido trifluoroacético (ATF) para que se lleve a cabo la reacción de transformación de AFB₁ y AFG₁ (no fluorescentes) en sus hemiacetales B_{2a} y G_{2a} (altamente fluorescentes), por otro lado la AFB₂ y AFG₂ (fluorescentes) no sufren ninguna reacción de transformación durante el proceso de derivatización (Takahashi, 1977), (**Figura 6**).

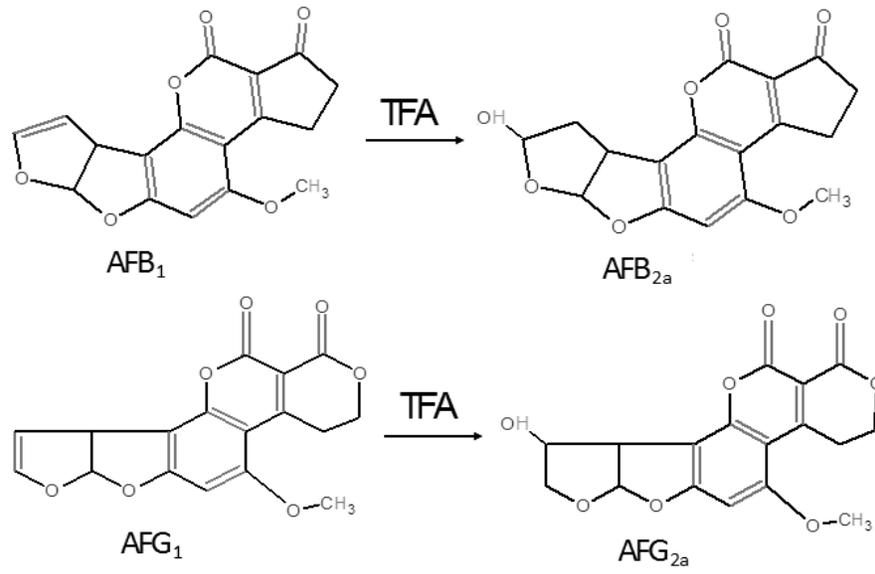


Figura 6. Reacción de derivatización de las AFB₁ y AFB₂ (Takahashi, 1977).

II. Justificación

Es de gran importancia realizar la identificación y cuantificación de AF en pistache ya que el hombre ingiere continuamente AF en multitud de alimentos y aunque las elimina por orina, heces, leche materna y bilis, ellas le causan intoxicaciones severas, abortos, vómitos, diarreas y hemorragias internas. Con el tiempo se van acumulando en el ADN humano produciendo enfermedades crónicas como hepatitis, cirrosis, malformaciones en fetos y cánceres digestivos.

Por medio de este estudio se sabrá si el aporte de aflatoxinas que el pistache da a la dieta en México representa un riesgo a la salud y las concentraciones de AF se compararán con los resultados obtenidos del pistache de otros países.

III. Hipótesis

Si algunos investigadores han revelado la presencia de las AF (B1, B2, G1 y G2) en muestras de pistache de varios países, entonces se lograrán detectar y cuantificar las AF (B1, B2, G1 y G2) en las muestras de pistache a analizar.

IV. Objetivos

4.1. General

1. Identificar y cuantificar la presencia de las AF (B_1 , B_2 , G_1 y G_2) en semillas de pistache (*Pistacia vera* L. de la familia Anacardiaceae) procedente del Distrito Federal (México), Estambul (Turquía) y Santorini (Grecia) por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).

4.2. Particulares

1. Realizar el muestreo de pistache en México, Turquía y Grecia.
2. Extraer, purificar y derivatizar las muestras.
3. Validar el método analítico.
4. Analizar los resultados obtenidos con Estadística.

V. Materiales y Métodos

5.1. Muestras

Se compraron 55 muestras de pistache con cáscara de las cuales 48 pertenecen a México (pistache a granel), 6 a Turquía (empacadas al vacío) y 1 a Grecia (empacada al vacío). Se usaron bolsas de plástico para guardar las muestras y se etiquetaron con la fecha, país, nombre del mercado y en el caso de las muestras de la Ciudad de México se agregó la Delegación. Todas las muestras se mantuvieron en refrigeración y en ausencia de luz hasta el momento de su análisis.

5.2. Muestreo

5.2.1. Muestreo en México

Se tomaron muestras de 50-100 g de pistache de los 3 mercados más importantes de cada una de las 16 Delegaciones de la Ciudad de México, un total de 48 muestras **Tabla 7**.

Tabla 7: Muestreo de pistache en la Ciudad de México.

Muestra	Fecha 2012	Delegación	Mercado en la Ciudad de México
1 a, b, c	30/ago	Álvaro Obregón	Melchor Múzquiz: Av.Revolución. Col. San Ángel. 01000 México, D.F.
			Olivar del Conde: Agustín Lara y Ernesto P. Uruchurtu. Col. Olivar del Conde. 01400 México DF.
			Corpus Christi: San Luis. Col. Corpus Christi. 01530 Mexico D.F.
2 a, b, c	13/sep	Azcapotzalco	Azcapotzalco: Azcapotzalco S/N, Col. Centro de Azcapotzalco, 02000 México, D. F.
			Prohogar: Eje 1 poniente (Calz. Vallejo). N° 12. Col. Pro Hogar. 02600 México, D.F.
			Nueva Santa María: Av. Camarones. Col. Nva Santa María, 02800 México, DF
3 a, b, c	30/ago	Benito Juárez	De Mixcoac: Revolución. Col. Mixcoac. C.P.03849 México D.F.
			Portales: Santa Cruz S/N. Col. Portales. C.P. 03300 México, D.F.
			Independencia: Eje 6 Sur e Independencia S/N. Col. Independencia. C.P.03630 México DF
4 a, b, c	29/ago	Coyoacán	Ajusco-Moctezuma: Mixtecas 92. Col. Ajusco. C.P. 04300 México D.F.
			Santo Domingo Las Rosas: Papalotl. Col. Pedregal de Sto. Domingo C.P.04369 México, DF.
			De Coyoacán: Ignacio Allende. Col. Del Carmen. C.P 04100 México, D.F.
5 a, b, c	13/sep	Cuajimalpa	Contadero: Av. 16 de Sep esq. Mariano Escobedo. Col. Loma de la Papa. 05088 México D.F.
			Rosas Torres: San José de los Cedros esq. Sauce. Col. San José de los Cedros.05200 México DF
			Cuajimalpa: Av. Veracruz esquina con Ocampo. Col. Manzanito.05040 México D.F.
6 a, b,c	6/sep	Cuauhtémoc	Hidalgo: Dr, Balmis.Col, Obrera.6800 México D.F.
			Arcos de Belén: Arcos de Belén esquina con Dr. Valenzuela. Col. Centro.06010 México D.F.
			San Juan: Calle Ernesto Pugibet No. 71. Col. Centro. 06010 México D.F.
7 a, b, c	19/sep	G.A. Madero	Río Blanco: Emiliano Carranza. Col. Mártires de Río Blanco. 07880 México D.F.
			De la Estrella: Joyas, Col. La Estrella. 07810 México D.F.
			Martín Carrera: José J. Herrera. Col. Martin Carrera. 07070 México D.F.
8 a, b,c	26/sep	Iztacalco	San Miguel Iztacalco: Julio García. Col. Barrio de San Miguel. 08650 México D.F.
			Tlacotal: Oriente y Sur 123.Col. Gabriel Ramos Millán. 08730 México D.F.
			Santa Anita: Eje 1 oriente. Av. Andrés Molina Enríquez, Col. Viaducto Piedad. 08200 México DF.
9 a, b,c	26/sep	Iztapalapa	Central de Abastos: Eje 6 Sur esq. Río Churubusco, Col. Central de Abasto, 09040 México D.F.
			Santa Cruz Meyehualco: Calle 55 esq. Calle 4, Col. Santa Cruz Meyehualco, 09290 México D.F.
			Jacarandas: Manlio Fabio Altamirano. Col. Jacareadas 09280 México D.F.
10 a, b, c	12/sep	Magdalena Contreras	Cerro del Judío: Av. San Bernabé esq. Independencia. Col. Barros Sierra. 10380 México D.F.
			La Loma: José Moreno Salido esq. Fresno, Col. Pueblo Nuevo Bajo. 10640 México D.F.
			Turístico La Magdalena: Magdalena esq. Emilio Carranza Col. Rancho Totolapan,56580 México DF

Tabla 7: Continuación.

Muestra	Fecha 2012	Delegación	Mercado en la Ciudad de México
11 a, b, c	12/sep	Miguel Hidalgo	Tacubaya: Arquitecto Carlos Lazo esq. Arq. Luis Ruiz. Col. Observatorio, 11860 México D.F.
			Plutarco Elías Calles "El Chorrillo": Melchor Muzquiz esq. Parque Lira, Col. San Miguel Chapultepec, 11850 México D.F.
			Argentina: Lago Atitlan esquina con Lago Viedma Col. México Nuevo, 11260 México D.F.
12 a, b, c	5/sep	Milpa Alta	San Antonio Tecómitl: 5 de mayo Col. San Antonio Tecómitl, 12100 México, D.F.
			Benito Juárez: Yucatán sur. Col. Villa Milpa Alta. CP. 12000 México, D.F.
			San Pedro Atocpan: Francisco I. Madero Col. San Pedro Atocpan, 12200 México D.F.
13 a, b, c	27/sep	Tláhuac	Colonia del Mar: Camarón Col. Del Mar, 13270 México D.F.
			Mercado de la Nopalera: Falsta Col. La Nopalera, 13220 México D.F.
			Mercado Tláhuac: General Severino Cisneros Col. La Magdalena, 13070 México D.F.
14 a, b, c	6/sep	Tlalpan	Tlalcoligía: Cristobal Colón Col. Tlalcoligía, 14430 México D.F.
			Torres de Padierna: Tixpehual Col. Torres de Padierna, 14209 México DF
			De la Luz: Francisco I. Madero Col. Tlalpan Centro, 14000 México D.F.
15 a, b, c	6/sep/	V. Carranza	La Merced: General Anaya .Col. Merced Balbuena. 15810 México D.F.
			Jamaica: Guillermo Prieto 45 Depto. C-15, Col. Jamaica, 15800 México D.F.
			San Ciprián: Av. Gral. Anaya esq. San Ciprian. El Parque, 15960 México D.F.
16 a, b, c	5/sep/ 2012	Xochimilco	De Xochimilco: Calle Morelos. Col. el Rosario, 16070 México D.F.
			San Gregorio Atlapulco: Belisario Domínguez. Col. Sn Gregorio Atlapulco. CP.16600 México D.F.
			Tulyehualco: Avenida División del Norte. Col. Santiago Tulyehualco, 16700 México D.F.

5.2.2. Muestreo en Turquía.

Se muestrearon 50 g de pistache en la ciudad de Estambul, un total de 6 muestras.

Tabla 8: Muestreo de pistache en la Ciudad de Estambul.

Muestra	Mercado	Fecha
17a, 17b, 17c	Bazar de las Especias	Mayo/2005
18a, 18b, 18c	Bazar de las Especias	Mayo/2005

5.2.3. Muestreo en Grecia.

Se muestrearon 50 g de pistache en la ciudad de Santorini, un total de 1 muestra (19a) en mayo de 2005 en el mercado de la isla Santorini en Grecia.

5.3 Preparación de las muestras

Se peló al pistache para poder molerlo en una licuadora (Black & Dekker Mod. Crush Master, Mod. V2350BP) para su posterior análisis.

5.4. Condiciones cromatográficas

La fase móvil fue H₂O/ACN/MeOH (65:15:20 v/v/v) con un flujo de 1 mL min⁻¹. La detección de fluorescencia se realizó a una longitud de onda de excitación de 360-362 nm para cada AF y a una longitud de onda de emisión de 425 nm para AFB₁ y AFB₂, y 450 nm

para AFG₁ y AFG₂. El programa utilizado para HPLC fue ChemStation 32. Se usó un cromatógrafo de líquidos (Series 1200) con bomba isocrática (G1310A Serie DE62957044), detector de fluorescencia (G1321A Serie DE60456380) y automuestreador (G1329A Serie DE64761666), todos de Agilent Technologies. La columna cromatográfica Agilent Ecilpse XDS - C18, 4.6×250 mm, 5 µm de grosor de partícula.

5.5. Validación del método

5.5.1. Linealidad

5.5.1.1. Curvas de calibración de AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂

Para elaborar las curvas de calibración se procedió a preparar una solución patrón o stock de 1 µg mL⁻¹ de cada uno de los estándares por separado, de AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂ (Sigma-Aldrich, St. Louis MO, USA). La preparación de los estándares consistió en diluir cada estándar puro con 1 mL de benceno: acetonitrilo (98:2 v/v), de acuerdo a las indicaciones sugeridas por los Métodos Oficiales AOAC 970.43 para micotoxinas (AOAC, 1995) y se homogeneizó en Vortex 2 Genie (Modelo G-560, Volts 120 - Amperes 0.5 – Hertz 60), después se tomaron en forma individual 1 mL de cada AF con una jeringa. Se pasó a un vial etiquetado y se diluyó con metanol.

En una celda de cuarzo se colocó metanol como blanco y se ajustó la calibración a cero en blanco para que restara lo propio del metanol. Se colocó la solución de AF en metanol dentro de una 2ª celda y se midió la absorbancia. Se usó la absorbancia más grande entre 360 y 362 nm para las AF.

Se midió la absorbancia de cada AF en un espectrofotómetro Genesys 10 UV Modelo Thermo Electron Corporation, y se hizo una concentración de 1 µg mL⁻¹ de cada AF (AOAC, 1995). Cada solución patrón se calculó con los pesos moleculares y coeficientes de extinción correspondientes a cada AF.

En la **Tabla 9** se mencionan los pesos moleculares y coeficientes de extinción de cada estándar de AF.

Tabla 9: Pesos moleculares y coeficientes de extinción de cada AF (OPS, 1983).

AF	Peso molecular (PM)	Absorción UV (Coeficiente de extinción) a 362 nm
AFB ₁	312	21,800
AFB ₂	314	24,000
AFG ₁	328	17,700
AFG ₂	330	17,100

Las curvas de calibración se obtuvieron a partir de diferentes diluciones de los estándares de cada AF en metanol grado HPLC. Las diluciones fueron las siguientes: 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 2, 4, 5, 8, 10, 16, 20, 32, 40, 64, 70, 100, 128, 200, 600, 800, 1000 ng mL⁻¹.

Los viales con las diferentes diluciones de cada AF se pusieron a evaporar a sequedad en un horno a 40°C (Novatech BTC-9100), se derivatizaron resuspendiendo en 200 µL de ACN, a este volumen se le adicionaron 800 µL de solución derivatizante. La solución derivatizante consistió en 5 mL de ácido trifluoroacético (ATF) (Sigma-Aldrich, St. Louis MO, USA) + 2.5 mL ácido acético glacial (Merck, Naucalpan, Edo. Mex., México) + 17.5 mL de agua desionizada, se agitó la mezcla en un agitador orbital (Vortex G-560, Bohemia, N.Y., EEUU) por 30 segundos.

Los viales se mantuvieron en un baño María a 65 °C por 10 minutos según describen Kok (1994) y Akiyama *et al.* (2001). Finalmente se inyectaron 60 µL por triplicado para cuantificar en el HPLC. Con base en las áreas obtenidas y las concentraciones de las diferentes diluciones, se obtuvieron las ecuaciones de cada curva de calibración y los coeficientes de correlación con el programa Excel.

5.5.2. Límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ).

Para representar la sensibilidad del equipo HPLC para detectar la cantidad más pequeña de cada AF, se determinó el LOD a partir de la concentración mínima, de cada estándar de AF, detectada en cada curva de calibración. El valor de LOQ se tomó como 5 veces el valor de LOD (MSCR, 2002).

5.5.3. Porcentaje de recuperación

Se pesaron 4 repeticiones de un gramo de pistache molido, y se colocaron en tubos de centrífuga de 50 mL (Falcon), se les añadieron, en forma independiente, 100 ng de cada estándar de AF con 3 mL de MeOH, un gramo de NaCl y 2 mL de agua, y se centrifugaron (ALC 4235 con sistema de enfriamiento CWS) a 4000 rpm por 15 minutos. Se utilizaron los sobrenadantes diluidos en buffer de fosfatos (PBS) (1:4 v/v). La preparación del PBS se realizó con 10.0 g de Cloruro de Potasio (KCl) (Marca J.T. Baker N° Cat 3040), 10.0 g de Fosfato de potasio monobásico (KH₂PO₄) (J.T. Baker N° Cat 3246-20), 58.0 g de Fosfato de sodio monobásico hidrogenado (Na₂HPO₄) (J.T. Baker N° Cat.3818-01), 400.0 g de Cloruro

de Sodio (NaCl) (J.T. Baker N° Cat. 3624-19), 2.5 g de Azida Sódica (NaN_3) (J.T. Baker N° Cat. V01) y se aforó con agua destilada a 5 L, al final de su preparación se ajustó el pH a 7.4.

Los sobrenadantes diluidos se pasaron por la columna de inmunoafinidad (Easi-Extract para aflatoxinas totales R-Biopharm Rhône LTD, UK) previamente equilibrada con 20 mL de PBS a una velocidad de una gota por segundo.

Se lavó la columna con 20 mL de agua destilada. Finalmente se eluyó con 1.5 mL de metanol HPLC por gravedad, y forzando un reflujo con el émbolo, se recibió el eluido en un vial ámbar etiquetado. Para finalizar se añadieron 1.5 mL de agua destilada a través de la columna y se recibieron en el vial ámbar con un volumen total de 3 mL de eluente.

Se evaporaron a sequedad los 3 mL del eluido en un horno a 40°C, se derivatizaron y se inyectaron por triplicado 60 μL en el HPLC.

5.5.4. Prueba de selectividad

Con el objetivo de determinar el grado al cual el método puede determinar analitos específicos (AF) sin interferencias de otros componentes del pistache se realizó la prueba de selectividad. Para esta prueba se preparó una mezcla de los 4 estándares de AF para analizar directamente por HPLC, también se preparó una mezcla de los 4 estándares de AF disueltos en 3 mL de MeOH para contaminar un gramo de la muestra de pistache, se realizó en un tubo de centrífuga de 50 mL (Falcon). Después se agregó un gramo de NaCl y 2 mL de agua destilada, y se colocó en la centrífuga a 4000 rpm por 15 minutos.

Se utilizó el sobrenadante diluido en PBS (1:4 v/v) a 7.4 de pH para pasarlo por la columna de inmunoafinidad previamente equilibrada con 20 mL de PBS. Se lavó la columna de inmunoafinidad con 20 mL de agua destilada y se eluyó con 1.5 mL de MeOH HPLC con reflujo retrayendo el émbolo, después con 1.5 mL de agua destilada recibiendo los 3 mL en un vial ámbar etiquetado.

El eluido se secó en un horno a 40°C. Se derivatizó de la manera antes indicada y finalmente se inyectaron 60 μL en el HPLC.

5.6. Método de extracción de las muestras

Se licuaron 25 g de pistache previamente molido con 50 mL de metanol/agua (80:20 v/v) y 2 g de NaCl, en una licuadora. Se filtró con papel filtro de poro fino (Norma Oficial Mexicana, 2002).

5.7. Método de purificación y elución de las muestras

Se diluyeron 2 mL del filtrado con 14 mL de buffer de fosfatos (PBS). La columna de inmunoafinidad se equilibró pasándole 20 mL de PBS, después recibió los 16 mL de filtrado diluido a una velocidad de una gota por segundo, y se lavó con 20 mL de agua destilada. Se eluyó con 1.5 mL de metanol HPLC y después con 1.5 mL de agua destilada por gravedad y se recibió el eluido de 3 mL en un vial ámbar etiquetado (Norma Oficial Mexicana, 2002).

5.8. Método de derivatización de las muestras

Se pusieron a evaporar a sequedad los 3 mL del eluido en un horno, se derivatizó resuspendiendo en 200 μL de ACN, a este volumen se le adicionaron 800 μL de solución derivatizante y se agitó la mezcla por 30 segundos. Los viales se mantuvieron en un baño María a 65 °C por 10 minutos (Kok, 1994; Akiyama *et al.*, 2001).

5.9. Cuantificación de las AF de las muestras por HPLC

Se inyectaron 60 μL por triplicado para cuantificar la AF en el HPLC. Con las áreas y las ecuaciones de cada curva de calibración se calcularon las concentraciones de cada AF (ng mL^{-1} , ng g^{-1} o $\mu\text{g Kg}^{-1}$), las concentraciones calculadas de AF en muestras se corrigieron con los datos obtenidos del experimento de porcentaje de recuperación de cada AF para obtener las concentraciones finales de la siguiente manera:

$$\text{Concentración final o corregida} = \frac{100}{\% \text{ recuperación de AF}} \times \text{Concentración de AF en muestra}$$

5.10. Análisis estadístico

Se utilizó el programa estadístico R para realizar la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para ver si existían diferencias entre el contenido de AF en muestras de pistache y su lugar de origen, posteriormente se hizo la prueba de rangos de Wilcoxon para encontrar en donde se encontraban esas diferencias significativas.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Validación del método

La validación del método es un criterio de gran importancia para realizar mediciones confiables y se divide en varios parámetros como son: Linealidad, límites de detección y de cuantificación, porcentaje de recuperación y selectividad.

El método analítico cumple los requisitos para las aplicaciones analíticas pretendidas ya que en los resultados se obtuvo que las rectas que mejor se ajustaron a los datos en las curvas de calibración muestran una buena relación entre la respuesta y la concentración de AF con valores de R^2 cercanos 1, se obtuvieron los LOD y LOQ necesarios para identificar y cuantificar las AF, los porcentajes de recuperación en todos los casos fueron superiores al 80% lo cual indica que el método de extracción de AF es eficiente y en la prueba de selectividad no se observaron interferencias de otros componentes de la matriz en los Tr de cada AF. Los resultados a detalle se muestran a continuación:

6.1.1. Linealidad

6.1.1.1 Curvas de calibración de AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂

Los tiempos de retención (Tr) de cada AF se obtuvieron de los experimentos de porcentaje de recuperación, selectividad y de las curvas de calibración (**Tabla 10**), esto para posteriormente poder identificar las AF en las muestras.

Tabla 10. Rango de Tiempos de Retención de cada AF obtenido de las pruebas de recuperación, selectividad y de las curvas de calibración.

Parámetro	Tiempos de retención				Rango de Tr considerado			
	AFB1	AFB2	AFG1	AFG2	AFB1	AFB2	AFG1	AFG2
Curva de calibración	7.612- 8.158	17.59- 18.260	5.642- 5.930	11.319- 11.568	7.612 - 8.919	17.590 - 19.804	5.642 - 6.447	11.319 - 13.247
Selectividad	8.366- 8.919	18.490- 19.804	6.098- 6.447	12.444- 13.247				
% de recuperación	8.359- 8.386	18.340- 18.483	6.139- 6.201	12.291- 12.343				

Para obtener las gráficas que muestren la respuesta del método analítico (áreas) en función de concentraciones de cada AF se realizaron las curvas de calibración que son la base para la cuantificación de AF.

En la **Tabla 11** se muestran las diluciones consideradas para formar las curvas de calibración de AF.

Tabla 11: Concentraciones utilizadas para obtener la curva de calibración de AF (ng mL^{-1}).

AF	Concentraciones de la curva de calibración (ng mL^{-1})
AFB ₁	0.1, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128
AFB ₂	0.01, 0.05, 1, 5, 10, 20, 40, 70, 100, 200
AFG ₁	0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 4, 16, 100, 128
AFG ₂	0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 600, 800, 1000

Curva de AFB₁

En la **Tabla 12** y **Figura 7** se presentan los datos la curva, se observa que se obtuvo un valor de $R^2 = 0.9973$, este valor es cercano a uno, lo que muestra una buena relación entre las respuestas del método analítico (áreas) y las diferentes concentraciones, la ecuación que describe la curva de calibración es $y = 2.8299x$.

Tabla 12: Datos de la curva de calibración de AFB₁.

Concentración (ng mL^{-1})	Area ₁	Tr ₁ (min)	Area ₂	Tr ₂ (min)	Area ₃	Tr ₃ (min)
0.1	1.3	7,612	1.3	7,612	1.3	7,612
0.5	4.5	8,158	1.9	7,979	1.7	7,767
1	3.4	8,112	3.7	7,985	4.5	7,886
2	10.6	7,894	8.6	7,828	9.7	7,804
4	16.7	7,728	14.4	7,769	15.7	7,710
8	34	7,774	34.4	7,758	25.1	7,810
16	48.7	7,759	55.6	7,759	49.9	7,749
32	91.3	7,740	97.5	7,741	93.1	7,746
64	182.6	7,750	186.2	7,750	-	-
128	353.9	7,739	360.2	7,745	-	-

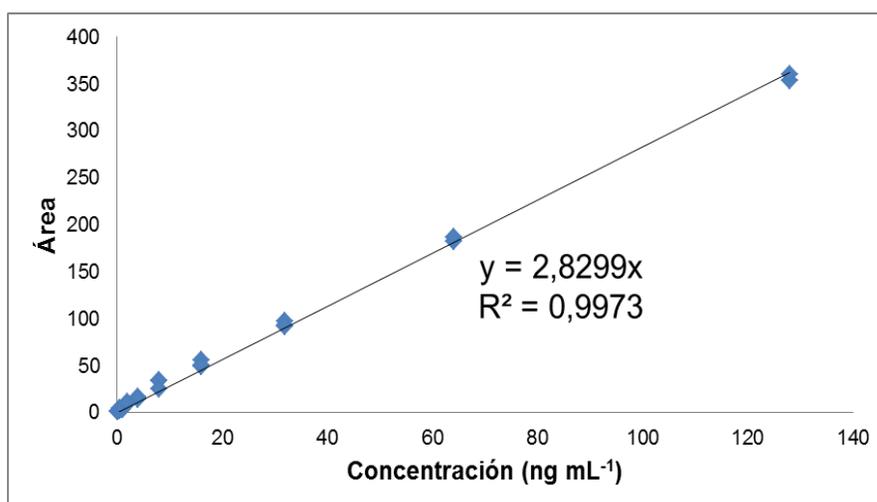


Figura 7. Curva de calibración de AFB₁.

Curva de calibración de AFB₂

En la **Tabla 13** se dan los datos de la curva de calibración de la AFB₂ y en la **Figura 8** se muestra la curva, se observa que se obtuvo un valor de $R^2 = 0.9908$, este valor es cercano a uno, lo que muestra una buena relación entre las respuestas del método analítico (áreas) y las diferentes concentraciones, la ecuación que describe la curva de calibración es $y = 1.7786x$.

Tabla 13: Datos de la curva de calibración de AFB₂.

Concentración (ng mL ⁻¹)	Área ₁	Tr ₁ (min)	Área ₂	Tr ₂ (min)
0.01	0.027	17.59	0.021	17.61
0.05	0.12	18.20	0.076	17.84
1	2	18.10	1.8	18.00
5	6.6	18.10	6.7	18.06
10	23	18.09	23.1	18.06
20	38.4	18.10	38.7	18.08
40	93	18.19	-	-
70	149.7	18.25	150.5	18.24
100	173.9	18.26	173.9	18.24
200	345.4	18.22	346.7	18.20

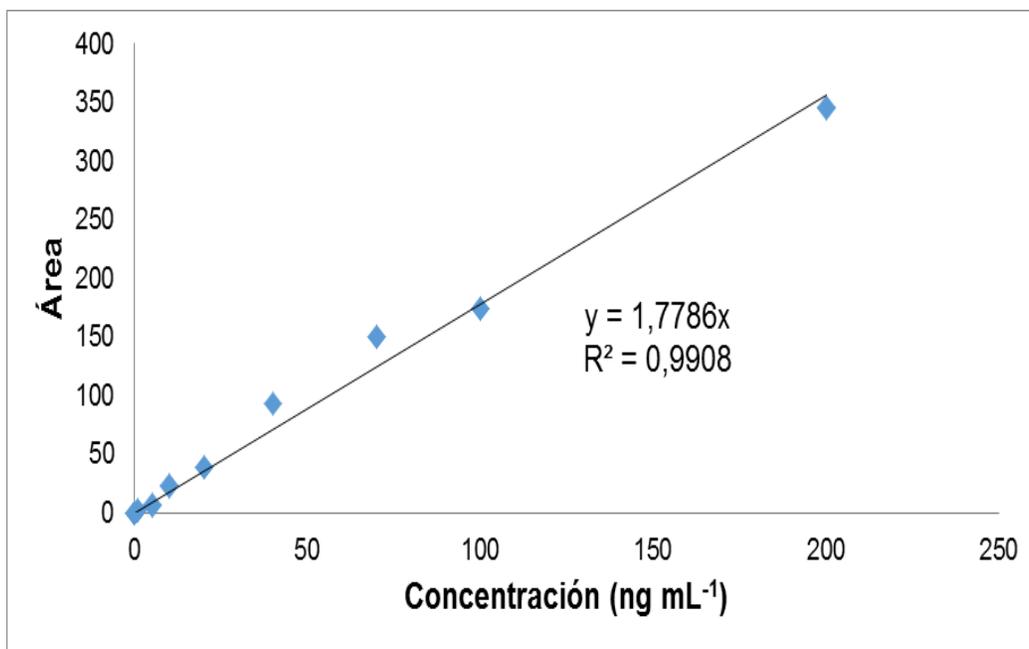


Figura 8. Curva de calibración de AFB₂.

Curva de calibración de AFG1

En la **Tabla 14** se dan los datos de la curva de calibración de la AFG₁ y en la **Figura 9** se muestra la misma, se observa que se obtuvo un valor de $R^2 = 0.9969$, este valor es cercano a uno, lo que muestra una buena relación entre las respuestas del método analítico (áreas) y las diferentes concentraciones, la ecuación que describe la curva de calibración es $y = 1.7607x$.

Tabla 14: Datos de la curva de calibración de AFG₁.

Concentración (ng/mL)	Área ₁	Tr ₁ (min)	Área ₂	Tr ₂ (min)	Área ₃	Tr ₃ (min)
0.01	0.07	5.930	0.03	5.870	0.05	5.795
0.05	0.160	5.868	-	-	0.130	5.836
0.1	0.200	5.833	0.220	5.863	0.270	5.794
0.5	0.890	5.753	1.000	5.642	0.980	5.772
1.0	3.100	5.784	3.300	5.690	3.300	5.732
4	11.600	5.797	12.900	5.720	12.900	5.710
16	22.200	5.778	21.300	5.795	22.300	5.818
100	172.700	5.865	185.700	5.852	186.200	5.830
128	213.400	5.864	225.100	5.835	226.600	5.831

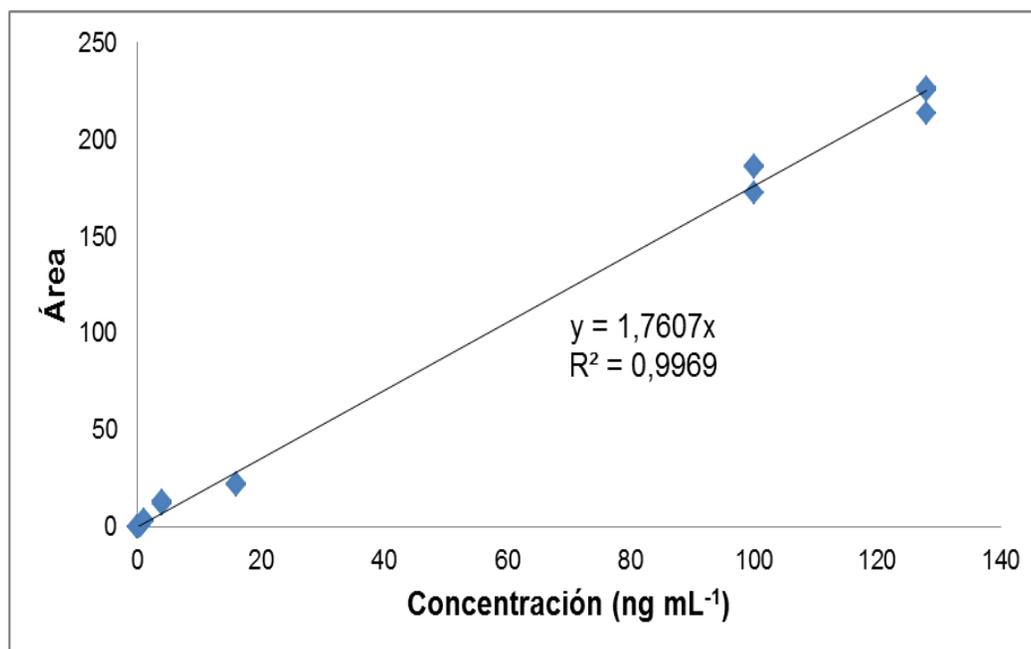


Figura 9. Curva de calibración de AFG₁.

Curva de calibración de AFG2

En la **Tabla 15** se dan los datos de la curva de calibración de la AFG₂ y en la **Figura 10** se muestra la misma, se observa que se obtuvo un valor de $R^2 = 0.9986$ considerando concentraciones mayores que en el resto de las curvas porque esto mejoró el valor de R^2 , este valor resultó cercano a uno, lo que muestra una buena relación entre las respuestas del método analítico (áreas) y las diferentes concentraciones, la ecuación que describe la curva de calibración es $y = 1.2411x$.

Tabla 15: Datos de la curva de calibración de AFG₂.

Concentración (ng mL ⁻¹)	Área ₁	Tr ₁ (min)	Área ₂	Tr ₂ (min)	Área ₃	Tr ₃ (min)
0.5	2.900	11.353	2.700	11.371	2.900	11.391
1	1.800	11.407	1.800	11.390	1.800	11.401
2	3.300	11.404	3.500	11.432	3.400	11.431
4	6.000	11.478	6.000	11.473	6.000	11.475
8	10.500	11.472	10.400	11.477	10.400	11.486
16	17.700	11.513	17.300	11.523	16.500	11.534
32	42.100	11.525	43.100	11.519	43.500	11.520
64	74.500	11.511	74.500	11.532	75.100	11.527
100	109.100	11.568	104.300	11.557	108.700	11.533
200	220.000	11.554	219.500	11.526	211.400	11.551
600	716.400	11.494	714.160	11.473	-	-
800	1017.800	11.416	1015.600	11.384	-	-
1000	1253.000	11.355	1251.000	11.319	-	-

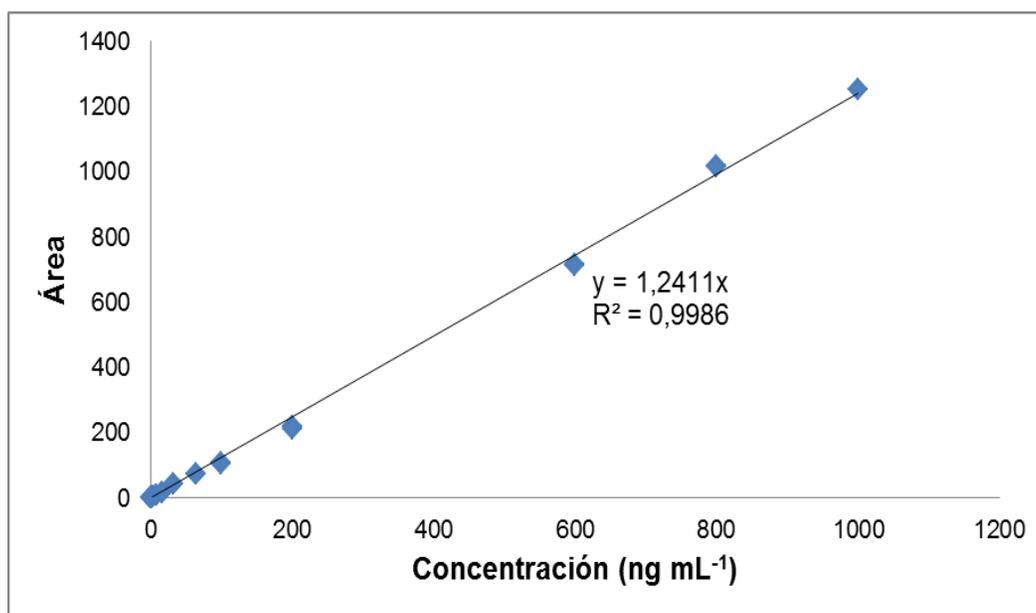


Figura 10. Curva de calibración de AFG₂.

6.1.2. Límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ).

Para representar la sensibilidad del equipo HPLC para detectar la cantidad más pequeña de cada AF con base en las curvas de calibración se obtuvo el LOD y para calcular el LOQ se tomó como 5 veces el valor de LOD.

Tabla 16: Valores obtenidos de LOD y LOQ.

Aflatoxina	AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂
LOD (ng g ⁻¹)	0.1	0.01	0.01	0.5
LOQ (ng g ⁻¹)	0.5	0.05	0.05	2.5

6.1.3. Porcentaje de recuperación

Este experimento se llevó a cabo para determinar la eficiencia de la extracción de AF del análisis. El método de extracción presenta un porcentaje de recuperación que va del 81.93 – 89.14 % para las diferentes AF, esto quiere decir que el método para extraer las AF del pistache es eficiente.

En la **Tabla 17** se presentan los datos obtenidos para el experimento de recuperación de cada AF y en las **Figuras 11 a 22** se muestran los cromatogramas obtenidos.

Tabla 17: Datos del experimento de Porcentaje de Recuperación.

AF	Contaminación basal (ng mL ⁻¹)	Concentración de la contaminación con AF (ng mL ⁻¹)	Concentración de AF recuperada (ng mL ⁻¹)	% de recuperación
AFB ₁	0.02	100	81.95	81.93
AFB ₂	0.03	100	89.17	89.14
AFG ₁	0.02	100	82.46	82.44
AFG ₂	0.32	100	86.59	86.27

Cromatogramas obtenidos en el experimento de porcentaje de recuperación AFB₁ y AFB₂ (EXC 360 nm, Em 425 nm) y AFG1 y AFG2 (EXC 360 nm, Em 450 nm). TR = Tiempo de retención

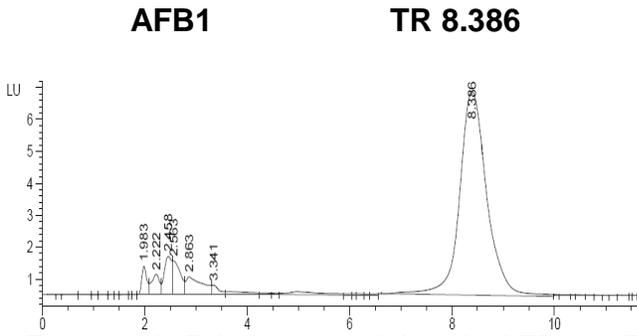


Figura 11: Primera repetición de AFB₁

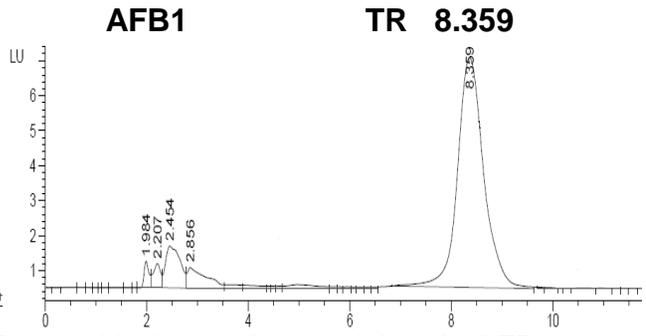


Figura 12: Segunda repetición de AFB₁

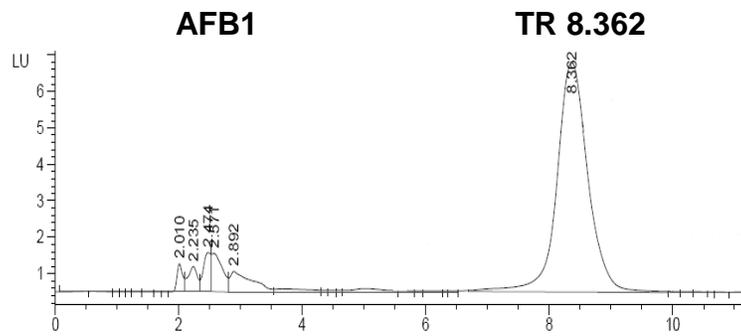


Figura 13: Tercera repetición de AFB₁

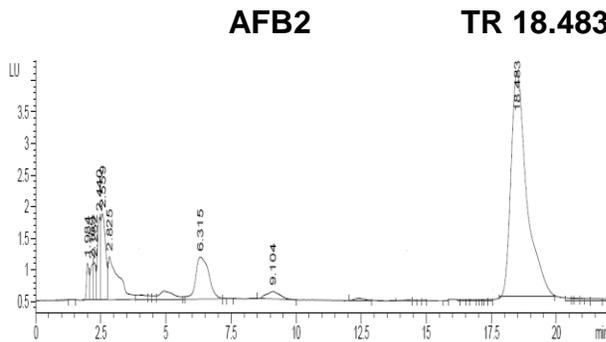


Figura 14: Primera repetición de AFB₂

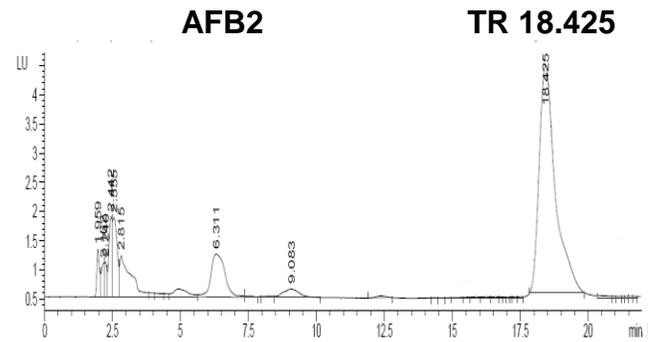


Figura 15: Segunda repetición de AFB₂

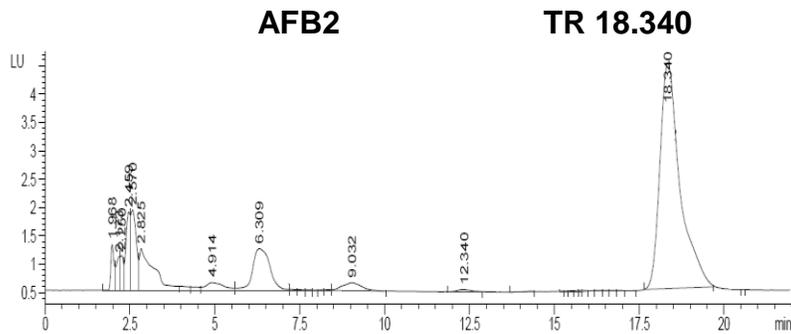


Figura 16: Tercera repetición de AFB₂

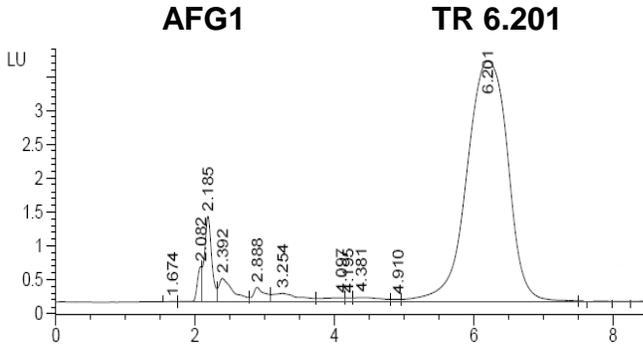


Figura 17: Primera repetición de AFG₁

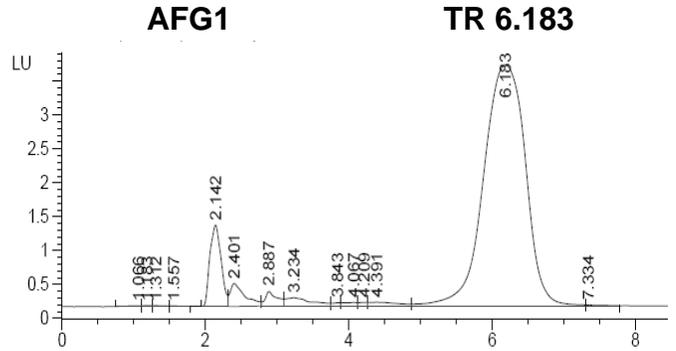


Figura 18: Segunda repetición de AFG₁

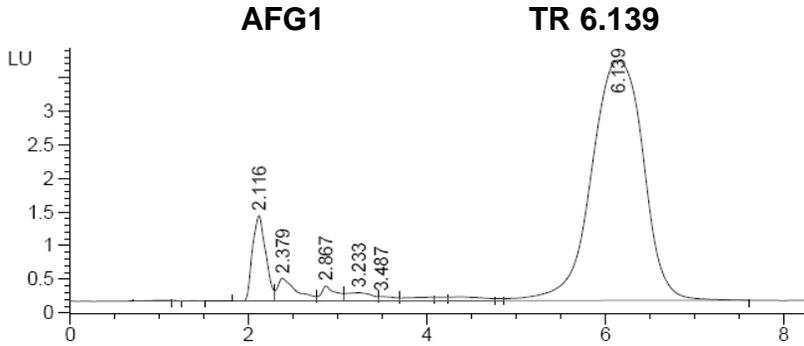


Figura 19: Tercera repetición de AFG₁

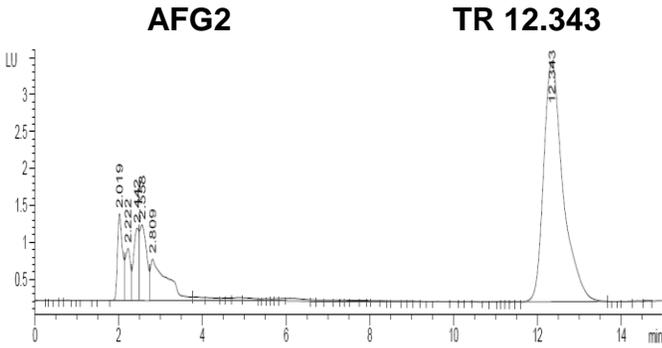


Figura 20: Primera repetición de AFG₂

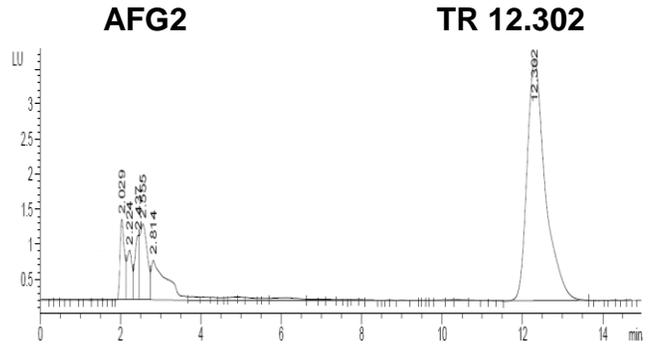


Figura 21: Segunda repetición de AFG₂

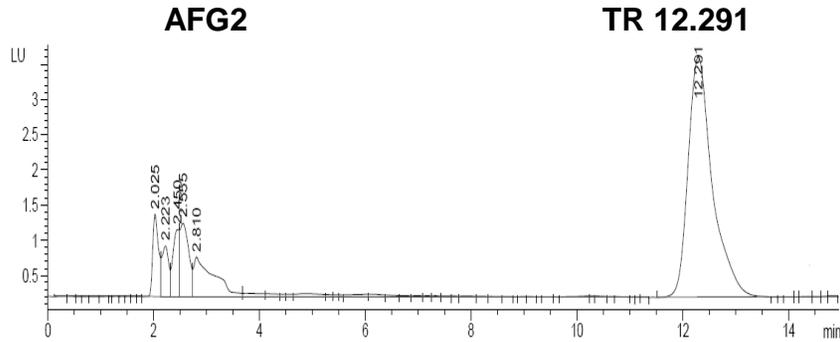


Figura 22: Tercera repetición de AFG₂

6.1.4. Prueba de selectividad

Para determinar el grado al cual el método puede determinar analitos específicos sin interferencias de otros componentes se realizó la prueba de selectividad del método analítico para sustancias naturalmente presentes. En la **Figura 23** tenemos los 4 estándares de AF juntos sin pistache. No se observaron interferencias de otros componentes del pistache en los tiempos de retención de cada AF, es evidente que el método propuesto tiene el poder de discriminación entre las AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂ y otros componentes de la matriz (**Figura 24**).

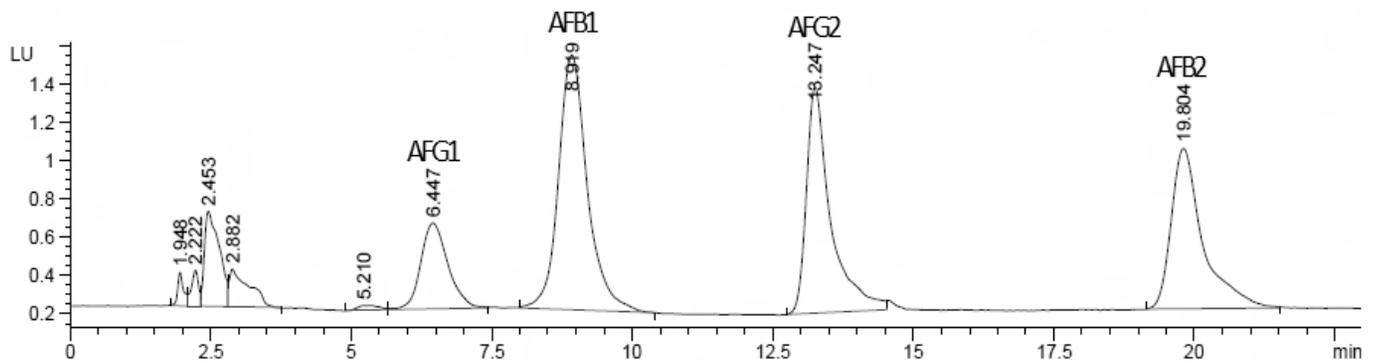


Figura 23: Cromatograma obtenido de estándares mezclados de las AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂.

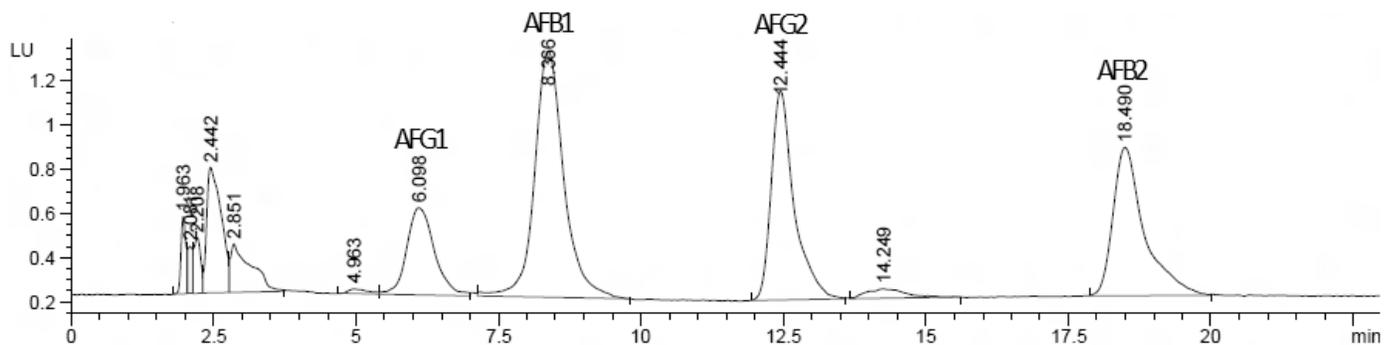


Figura 24: Muestra de pistache de la Delegación de Coyoacán contaminada con AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂.

6.2. Cuantificación de AF en las muestras por HPLC

Los resultados correspondientes del análisis de AF en pistache se presentan en la **Tabla 18** y en las **Figuras 25 a 27**. Todas las muestras (100%) salieron contaminadas con dos o más tipos de AF, concentraciones traza que demuestran un bajo grado de contaminación ya que las concentraciones encontradas se encuentran por debajo de los límites establecidos ($5 \mu\text{g Kg}^{-1}$ para AFB_1 y $10 \mu\text{g Kg}^{-1}$ para AFt) por la OMS (Papp *et al.*, 2002) y por la FAO ($20 \mu\text{g Kg}^{-1}$ para AFB_1 y $35 \mu\text{g Kg}^{-1}$ para AFt) (FAO, 2004).

El 36.36% de las muestras se encuentran contaminadas con AFB_1 (0.10 a 4.15 ng g^{-1}), el 100% de las muestras con AFB_2 (0.01 a 4.00 ng g^{-1}) y con AFG_1 (0.02 a 1.02 ng g^{-1}), el 56.36% con AFG_2 (0.46 a 8.09 ng g^{-1}) y el 100% con AFt (0.04 a 8.39 ng g^{-1}). Estas concentraciones encontradas en las muestras presentan una menor contaminación por AF que las reportadas en Irán (Cheraghali *et al.*, 2007), Marruecos (Juan *et al.*, 2008) y Túnez (Ghali *et al.*, 2009).

Las muestras más contaminadas por AFB_1 fueron la del mercado de Mixcoac, Delegación Benito Juárez (1.23 ng g^{-1}), del mercado de Tacubaya, Delegación Miguel Hidalgo (3.20 ng g^{-1}) y del mercado y Delegación de Xochimilco (4.15 ng g^{-1}). Por AFB_2 fueron del mercado San Miguel de la Delegación Ixtacalco (1.38 ng g^{-1}) y del mercado Tulyehualco, Delegación Xochimilco (4.00 ng g^{-1}). Por AFG_1 fue la del mercado y Delegación de Xochimilco (1.02 ng g^{-1}). Por AFG_2 fueron la muestra del mercado de la Merced, Delegación Venustiano Carranza (4.06 ng g^{-1}), que también tuvo alta concentración de AFt (4.43 ng g^{-1}), la muestra 18a (8.09 ng g^{-1}) que también tuvo la mayor concentración de AFt (8.39 ng g^{-1}), y 18b (6.36 ng g^{-1}) con muchas AFt (6.36 ng g^{-1}) del Bazar de las Especies de Turquía. Finalmente, por AFt de México las concentraciones más altas estuvieron en las muestras del mercado y Delegación de Xochimilco (7.04 ng g^{-1}), del mercado de Tacubaya, Delegación Miguel Hidalgo (5.01 ng g^{-1}).

Tabla 18: Aflatoxinas del pistache de la Ciudad de México, Turquía y Grecia.

Muestra	País	Ciudad	Mercado	Delegación	Concentración de AF (ng g ⁻¹)				
					AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂	AFt
1 a	México	DF	Melchor Múzquiz	Á.Obregón	<LOD	0.02	0.03	0.65	0.71
1 b	México	DF	Olivar del Conde	Á.Obregón	<LOD	0.04	0.14	1.25	1.43
1 c	México	DF	Corpus Christi	Á.Obregón	<LOD	0.04	0.04	1.30	1.38
2 a	México	DF	Azcapotzalco	Azapotzalco	<LOD	0.52	0.04	1.16	1.71
2 b	México	DF	Prohogar	Azapotzalco	<LOD	0.24	0.03	0.64	0.90
2 c	México	DF	Nueva Santa María	Azapotzalco	0.24	0.03	0.24	<LOD	0.51
3 a	México	DF	De Mixcoac	B. Juárez	1.23	0.16	0.29	3.28	4.97
3 b	México	DF	Portales	B. Juárez	<LOD	0.04	0.04	0.54	0.62
3 c	México	DF	Independencia	B. Juárez	<LOD	0.02	0.02	<LOD	0.04
4 a	México	DF	Ajusco-Moctezuma	Cuajimalpa	<LOD	0.03	0.02	<LOD	0.06
4 b	México	DF	Sto Domingo Las Rosas	Cuajimalpa	<LOD	0.03	0.03	<LOD	0.05
4 c	México	DF	De Coyoacán	Cuajimalpa	<LOD	0.11	0.03	2.26	2.39
5 a	México	DF	Contadero	Coyoacán	0.10	0.12	0.08	1.24	1.54
5 b	México	DF	Rosas Torres	Coyoacán	<LOD	0.08	0.04	<LOD	0.12
5 c	México	DF	Cuajimalpa	Coyoacán	0.12	0.05	0.03	<LOD	0.20
6 a	México	DF	Hidalgo	Cuauhtémoc	<LOD	0.07	0.04	0.46	0.57
6 b	México	DF	Arcos de Belén	Cuauhtémoc	<LOD	0.07	0.03	0.99	1.08
6 c	México	DF	San Juan	Cuauhtémoc	<LOD	0.12	0.03	0.93	1.08
7 a	México	DF	Río Blanco	G.A. Madero	0.18	0.16	0.03	0.66	1.02
7 b	México	DF	De la Estrella	G.A. Madero	<LOD	0.40	0.03	<LOD	0.43
7 c	México	DF	Martín Carrera	G.A. Madero	<LOD	0.30	0.03	<LOD	0.33
8 a	México	DF	San Miguel Iztacalco	Iztacalco	<LOD	1.38	0.03	<LOD	1.40
8 b	México	DF	Tlacotal	Iztacalco	<LOD	0.22	0.03	<LOD	0.25
8 c	México	DF	Santa Anita	Iztacalco	<LOD	0.04	0.03	<LOD	0.07
9 a	México	DF	Central de Abastos	Iztapalapa	<LOD	0.22	0.27	<LOD	0.50
9 b	México	DF	Santa Cruz Meyehualco	Iztapalapa	<LOD	0.21	0.03	<LOD	0.24
9 c	México	DF	Jacarandas	Iztapalapa	0.52	0.04	0.06	<LOD	0.62
10 a	México	DF	Cerro del Judío	M. Contreras	<LOD	0.03	0.04	<LOD	0.07
10 b	México	DF	La Loma	M. Contreras	<LOD	0.05	0.03	<LOD	0.08
10 c	México	DF	Turístico La Magdalena	M. Contreras	0.75	0.06	0.10	2.03	2.94
11 a	México	DF	Tacubaya	M.Hidalgo	3.20	0.03	0.78	1.00	5.01
11 b	México	DF	P. E. Calles "El Chorrito"	M.Hidalgo	<LOD	0.03	0.03	<LOD	0.05
11 c	México	DF	Argentina	M.Hidalgo	<LOD	0.02	0.02	<LOD	0.04
12 a	México	DF	San Antonio Tecómitl	Milpa Alta	<LOD	0.03	0.03	<LOD	0.06
12 b	México	DF	Benito Juárez	Milpa Alta	<LOD	0.02	0.04	<LOD	0.06
12 c	México	DF	San Pedro Atocpan	Milpa Alta	<LOD	0.03	0.04	0.52	0.59
13 a	México	DF	Colonia del Mar	Tláhuac	<LOD	0.04	0.05	0.82	0.90
13 b	México	DF	Mercado de la Nopalera	Tláhuac	<LOD	0.04	0.03	<LOD	0.07
13 c	México	DF	Mercado Tláhuac	Tláhuac	<LOD	0.03	0.05	<LOD	0.08
14 a	México	DF	Tlalcoligia	Tlalpan	0.15	0.04	0.08	0.75	1.02
14 b	México	DF	Torres de Padierna	Tlalpan	0.19	0.03	0.06	0.73	0.99
14 c	México	DF	De la Luz	Tlalpan	<LOD	0.02	0.05	<LOD	0.07
15 a	México	DF	La Merced	V.Carranza	0.12	0.21	0.03	4.06	4.43
15 b	México	DF	Jamaica	V.Carranza	<LOD	0.31	0.03	0.86	1.20
15 c	México	DF	San Ciprián	V.Carranza	<LOD	0.29	0.03	0.99	1.31
16 a	México	DF	De Xochimilco	Xochimilco	4.15	0.51	1.02	1.35	7.04
16 b	México	DF	San Gregorio Atlapulco	Xochimilco	0.28	0.02	0.08	0.61	0.99
16 c	México	DF	Tulyehualco	Xochimilco	0.24	4.00	0.05	0.59	4.87
17 a	Turquía	Estambul	Bazar de las Especias	-	0.60	0.01	0.10	<LOD	0.71
17 b	Turquía	Estambul	Bazar de las Especias	-	0.14	0.03	0.05	1.41	1.63
17 c	Turquía	Estambul	Bazar de las Especias	-	<LOD	0.06	0.06	1.51	1.63
18 a	Turquía	Estambul	Bazar de las Especias	-	0.16	0.09	0.05	8.09	8.39
18 b	Turquía	Estambul	Bazar de las Especias	-	0.22	0.02	0.07	6.05	6.36
18 c	Turquía	Estambul	Bazar de las Especias	-	0.17	0.03	0.09	0.96	1.25
19 a	Grecia	Santorini	Mercado de Santorini	-	0.13	0.18	0.11	2.05	2.46

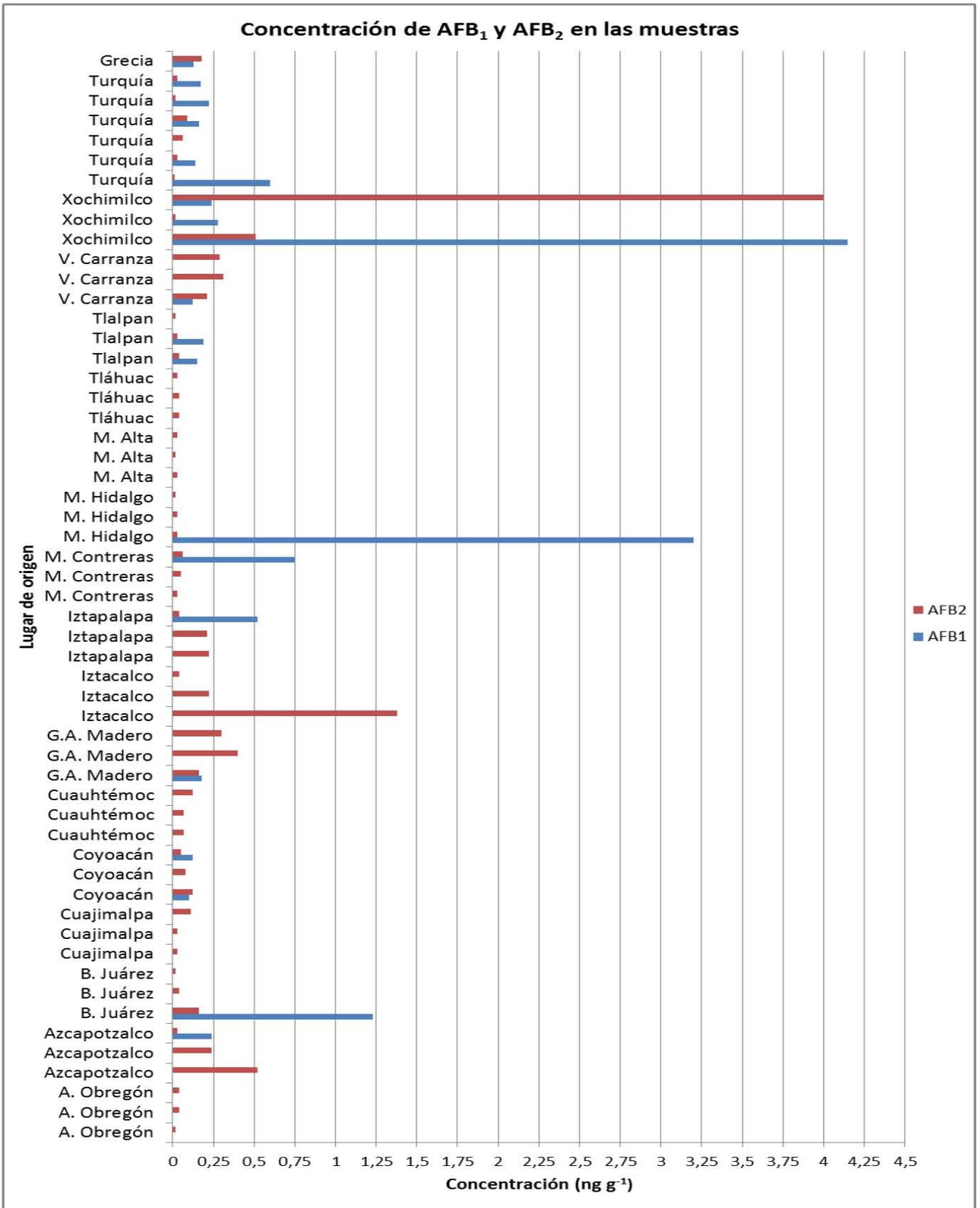


Figura 25: Gráfica de concentraciones de AFB₁ y AFB₂ en las muestras, método por HPLC.

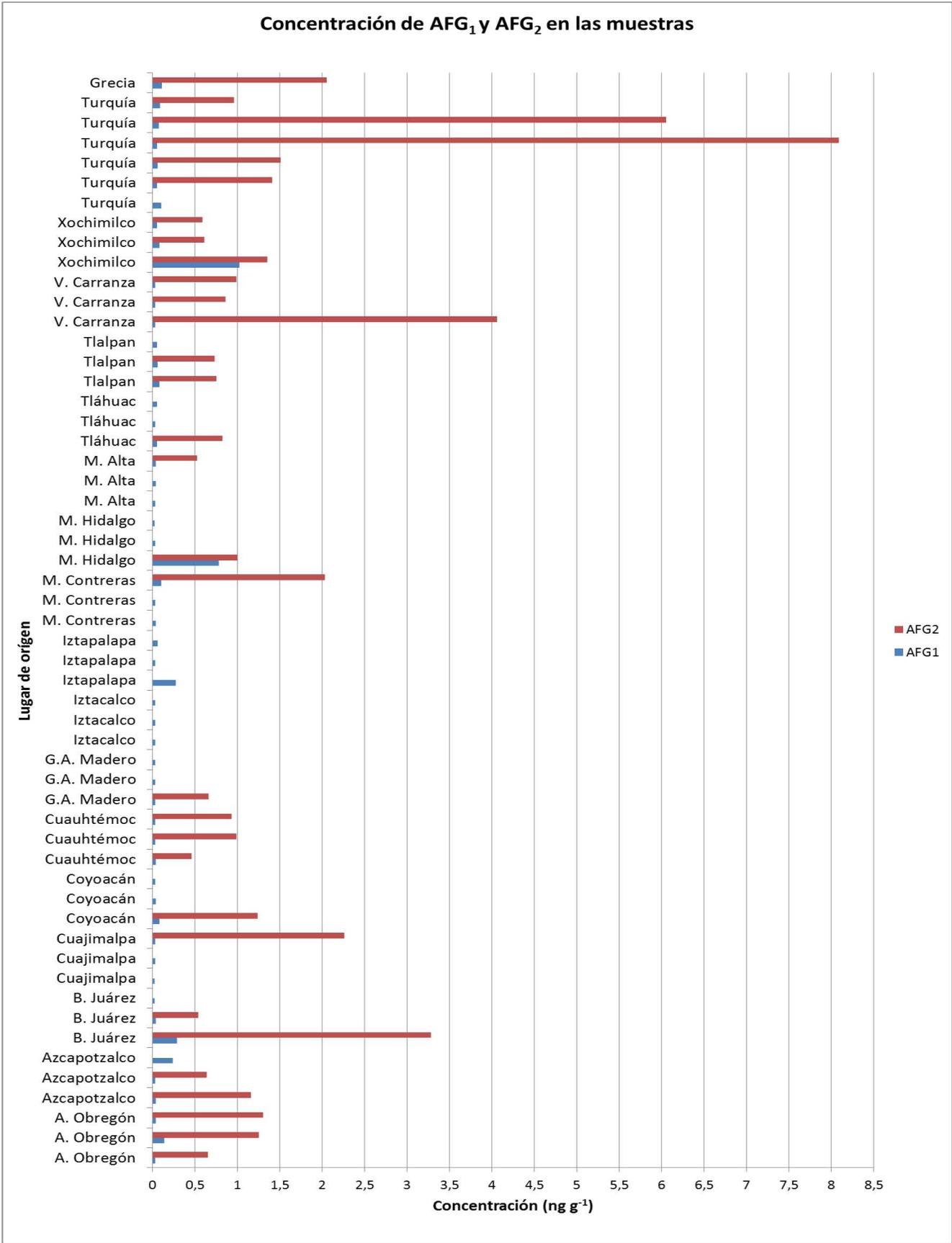


Figura 26: Gráfica de concentraciones de AFG₁ y AFG₂ en las muestras, método por HPLC.

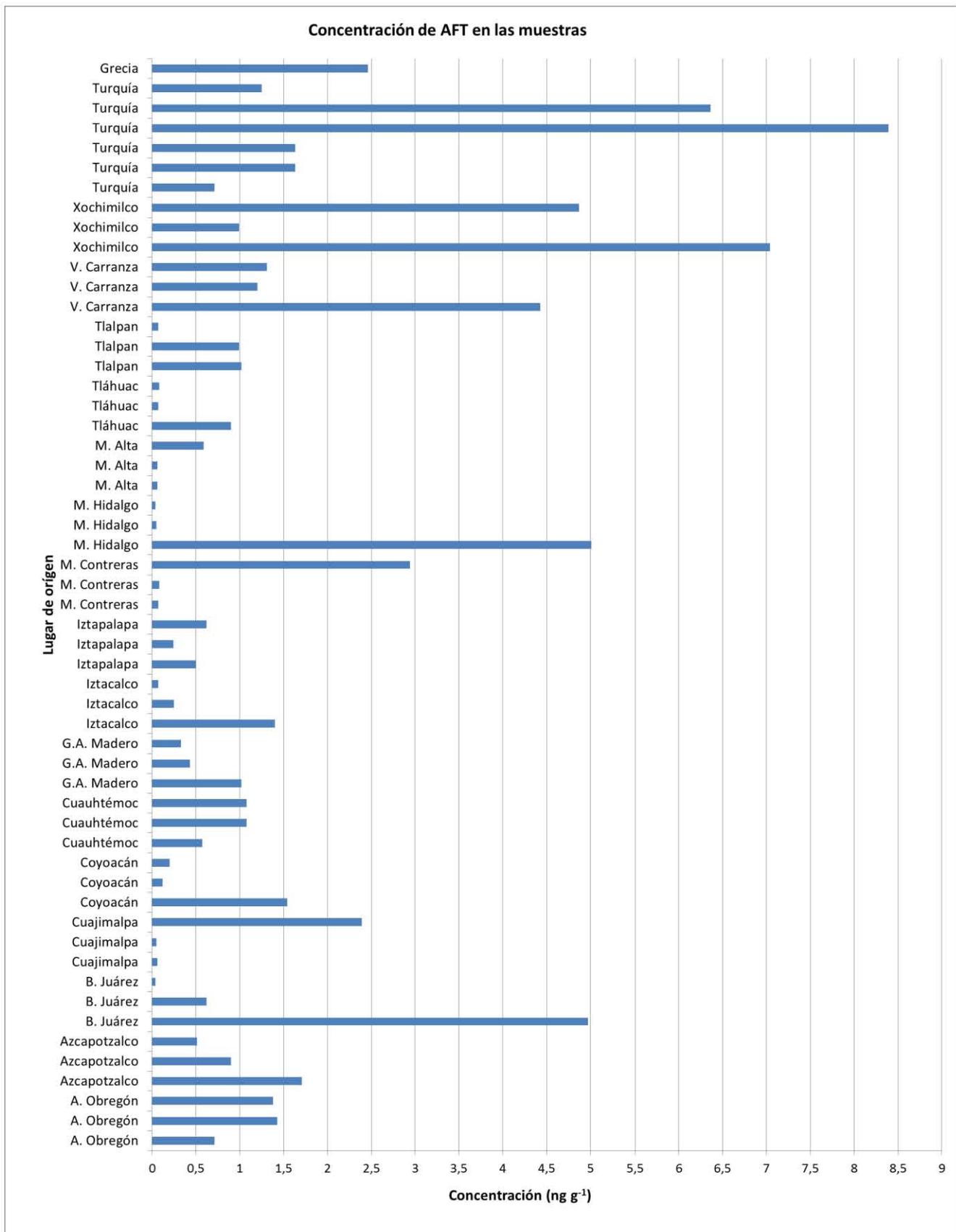


Figura 27: Gráfica de concentraciones de Aft en las muestras, método por HPLC.

Aparentemente es una baja concentración de AFt la encontrada en la presente investigación pero hay que considerar que la cantidad analizada fue un gramo de pistache y según nuestros cálculos es mucho mayor la cantidad consumida en diferentes alimentos ya que el hombre ingiere pistache directa o indirectamente como ingrediente en diferentes platillos y postres.

El pistache es de las oleaginosas más contaminadas con AF a nivel mundial y aunque en un gramo sus concentraciones están por debajo de la cantidad necesaria para producir una mutación que son 10 ng g^{-1} (Carvajal, 2004), llama la atención ver que todas las muestras analizadas estuvieron contaminadas.

Hay reportes que indican una reducción de la producción de AF por la presencia de los antioxidantes naturales del pistache como son el ácido caféico que reduce un 99.5 % a las AF, el ácido quínico (90.2 %) y el ácido clorogénico (88.5 %) (Molyneux *et al.*, 2007).

La contaminación encontrada en las muestras se puede deber a diferentes factores, los hongos del género *Aspergillus* con frecuencia deterioran el pistache antes de la cosecha cuando los frutos secos están todavía en el árbol, pero también pueden ocurrir infección después de la cosecha ya sea en el almacenamiento o posterior (Bruce *et al.*, 2003; Cheraghali & Yazdanpanah, 2010), además la apertura temprana de la cáscara de los pistaches antes de la cosecha provoca contaminación por el viento con hongos ó los insectos que los transportan. El almacenamiento a largo plazo, la comercialización en condiciones no higiénicas con altas humedad y temperatura favorecen la contaminación por AF (Doster & Michailides, 1994; Khosravi *et al.*, 2007). Las muestras obtenidas de los diferentes mercados se encontraban almacenadas en bolsas de plástico y frascos de vidrio o plástico, a temperatura y humedad ambiente.

La presencia de AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂ en las muestras se explica por la invasión de *Aspergillus parasiticus* (productor de AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂) y probablemente por *Aspergillus flavus* (productor de AFB₁ y AFB₂). Se debe recordar que *Aspergillus nomius*, *A. pseudotamarii*, *A. tamarii*, *A. bombycis* y *A. ochraceoroseus* son capaces de producir AF. Sin embargo, *A. flavus* y *A. parasiticus* son los únicos de importancia agronómica ya que los demás son poco frecuentes (Kurtzman *et al.*, 1987; Goto *et al.*, 1996; Erhlich *et al.*, 2007; Soriano, 2007).

Existió mayor contaminación de las muestras por AFG₂ y la AFB₁, que es la más mutágena, teratógena y cancerígena de todas, se encontró en menor porcentaje (Richard, 2007). Cuando *A. parasiticus* crece en un medio con un pH menor de 6.0 se favorece la

síntesis de las AF del grupo B, y con pH superiores a 6.0 se estimula la síntesis de AF del grupo G (Buchanan & Ayres, 1975). Podría sugerirse que el pH del pistache era mayor de 6.0 por lo que después de la invasión de *A. parasiticus* en las muestras se favoreció la síntesis de las AF del grupo G especialmente la AFG₂.

6.3. Análisis estadístico

Se usó la prueba de Kruskal-Wallis ya que al ser una prueba no paramétrica se ajusta a los datos obtenidos en esta investigación permitiendo comparar las medias de las muestras, con esta prueba se encontró que existe diferencia significativa en el contenido de AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂ y AFt en las muestras de pistache de acuerdo a su lugar de origen (**Tabla 19**).

Tabla 19: Resultados obtenidos de la prueba de Kruskal-Wallis.

AF	Valor estadístico	Significancia	Interpretación
AFB ₁	67.6629	< 0.05	Existe diferencia significativa
AFB ₂	64.1586	< 0.05	Existe diferencia significativa
AFG ₁	60.4021	< 0.05	Existe diferencia significativa
AFG ₂	53.2218	< 0.05	Existe diferencia significativa
AFt	58.1913	< 0.05	Existe diferencia significativa

Con la prueba de rangos de Wilcoxon encontramos en donde se encuentran las diferencias significativas. En las **Figuras 28 a 30** se muestran las medias de los contenidos de AF para hacer las comparaciones y observar que muestras son iguales y diferentes de acuerdo a su contenido de AF y lugar de origen.

Las letras en común entre los diferentes grupos indican que no existe diferencia significativa entre las muestras debido a que su concentración de AF similar y la ausencia de letras en común indican que existe diferencia significativa entre las muestras debido a que su concentración de AF varía en gran medida.

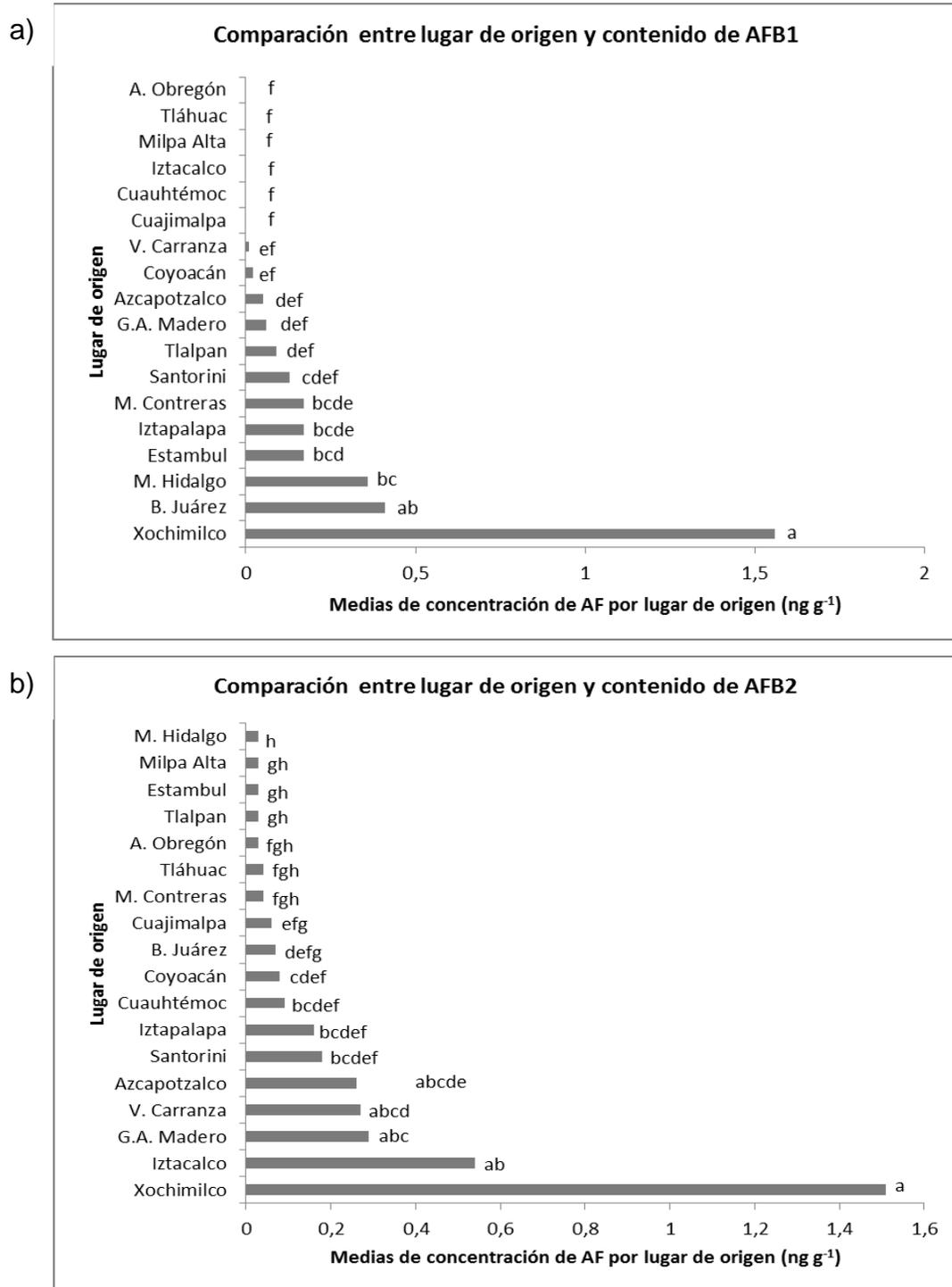


Figura 28: Prueba estadística Wilcoxon / Kruskal-Wallis.

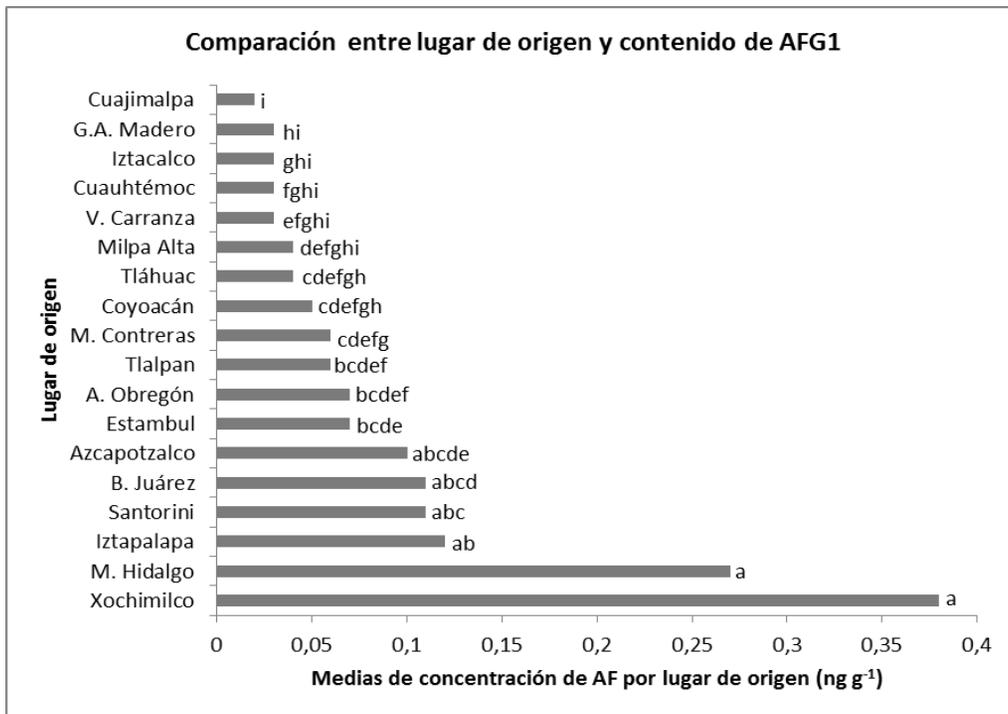
a) Comparación entre lugar de origen y concentraciones de AFB₁.

b) Comparación entre lugar de origen y concentraciones de AFB₂.

Letras en común = no existe diferencia significativa entre las muestras.

Ausencia de letras en común = Existe diferencia significativa entre las muestras.

a)



b)

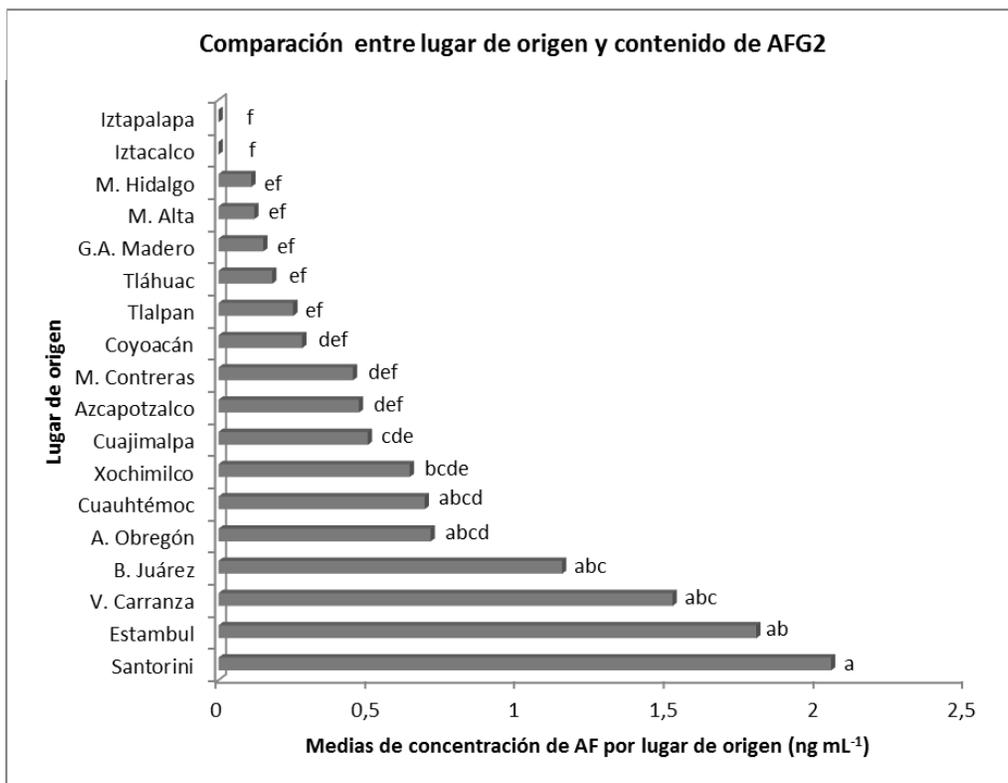


Figura 29: Prueba estadística Wilcoxon / Kruskal-Wallis.

a) Comparación entre lugar de origen y concentraciones de AFG₁.

b) Comparación entre lugar de origen y concentraciones de AFG₂.

Letras en común = no existe diferencia significativa entre las muestras.

Ausencia de letras en común = Existe diferencia significativa entre las muestras.

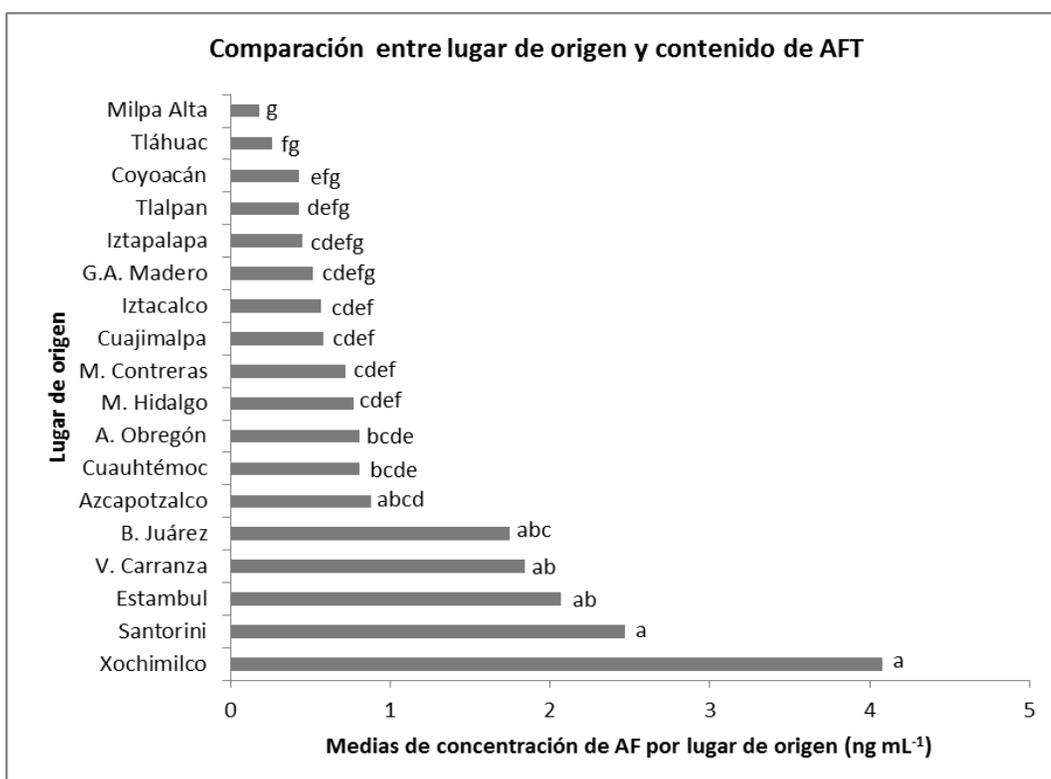


Figura 30: Prueba estadística Wilcoxon / Kruskal-Wallis.

Comparación entre lugar de origen y concentraciones de Aft.

Letras en común = no existe diferencia significativa entre las muestras.

Ausencia de letras en común = Existe diferencia significativa entre las muestras.

Para el caso de la AFB₁ (**Figura 28a**) que es la más mutágena, teratógena y cancerígena de todas las AF (Richard, 2007) se observa que las muestras de Xochimilco (Promedio = 1.56 ng g⁻¹) son las más contaminadas por lo que presentan diferencia significativa con el resto de las muestras excepto con las de Benito Juárez (Promedio = 0.41 ng g⁻¹). Para AFB₂ (**Figura 28b**) se observa que las muestras de Xochimilco (Promedio = 1.51 ng g⁻¹) son las más contaminadas por lo que presentan diferencia significativa con la mayoría de las muestras excepto con las de Azcapotzalco (Promedio = 0.26 ng g⁻¹), Venustiano Carranza (Promedio = 0.27 ng g⁻¹), G. A. Madero (Promedio = 0.29 ng g⁻¹) e Iztacalco (Promedio = 0.54 ng g⁻¹). Para AFG₁ (**Figura 29a**) se observa que las muestras de Xochimilco (Promedio = 0.38 ng g⁻¹) y Miguel Hidalgo (Promedio = 0.27 ng g⁻¹) son las más contaminadas por lo que presentan diferencia significativa con la mayoría de las muestras excepto con las de Azcapotzalco (Promedio = 0.10 ng g⁻¹), Benito Juárez (Promedio = 0.11 ng g⁻¹), Santorini

(Promedio = 0.11 ng g^{-1}) e Iztapalapa (Promedio = 0.12 ng g^{-1}). Para AFG₂ (**Figura 29b**) se observa que la muestra de Santorini (Promedio = 2.05 ng g^{-1}) es la más contaminada y por lo tanto presenta diferencia significativa con la mayor parte de las muestras excepto con las de Cuauhtémoc (Promedio = 0.69 ng g^{-1}), Álvaro Obregón (Promedio = 0.71 ng g^{-1}), Benito Juárez (Promedio = 1.15 ng g^{-1}), Venustiano Carranza (Promedio = 1.52 ng g^{-1}) y Estambul (Promedio = 1.8 ng g^{-1}).

Para las AFt (**Figura 30**) se observa que las muestras de Xochimilco (Promedio = 4.08 ng g^{-1}) y Santorini (Promedio = 2.47 ng g^{-1}) son las más contaminadas por lo que presentan diferencia significativa con el resto de las muestras excepto con las de Azcapotzalco (Promedio = 0.88 ng g^{-1}), Benito Juárez (Promedio = 1.75 ng g^{-1}), Venustiano Carranza (Promedio = 1.84 ng g^{-1}) y Estambul (Promedio = 2.07 ng g^{-1}).

Las diferencias de concentración entre las muestras se puede deber a la apertura temprana de la cáscara de algunos pistaches antes de la cosecha lo cual favorece la contaminación por el viento con hongos o por medio de los insectos, también se puede deber al almacenamiento en condiciones no higiénicas con alta humedad y temperatura que favorecen la contaminación por AF (Doster & Michailides, 1994; Khosravi *et al.*, 2007).

VII. Conclusiones

- Se logró la validación del método de análisis de AF en pistache. Debido a que las curvas de calibración de las diferentes AF muestran una buena relación entre la respuesta y la concentración de AF con valores de R^2 cercanos 1; se obtuvieron los LOD y LOQ necesarios para identificar y cuantificar las AF; los porcentajes de recuperación en todos los casos fueron superiores al 80%, lo cual indica que el método de extracción de AF es eficiente y en la prueba de selectividad no se observaron interferencias de otros componentes de la matriz en los tiempos de retención de cada AF.
- Se realizaron algunas modificaciones al método de la NOM-188-SSA1-2002 como el ajuste de la proporción de disolventes en la fase móvil, los volúmenes de inyección en el HPLC, el tiempo de análisis entre muestras y el ajuste de la longitud de onda de excitación y emisión.
- Se analizaron 55 muestras de pistache provenientes de México, Turquía y Grecia. Todas las muestras (100%) resultaron contaminadas con AF aunque en niveles bajos que no ponen en riesgo a la salud pues se encuentran por debajo de los niveles permitidos por la OMS (5 ng g⁻¹ para AFB₁ y 10 ng g⁻¹ para AFt) y por la FAO (20 ng g⁻¹ para AFB₁ y 35 ng g⁻¹ para AFt).
- El 36.36% de las muestras se encuentran contaminadas con AFB₁ (0.10 a 4.15 ng g⁻¹), el 100% de las muestras con AFB₂ (0.01 a 4.00 ng g⁻¹), el 100% con AFG₁ (0.02 a 1.02 ng g⁻¹), el 56.36% con AFG₂ (0.46 a 8.09 ng g⁻¹) y el 100% con AFt (0.04 a 8.39 ng g⁻¹).
- La muestra más contaminada por AFB₁ (4.15 ng g⁻¹) y AFG₁ (1.02 ng g⁻¹) fue la proveniente de la Delegación Xochimilco del Mercado de Xochimilco, por AFB₂ (4.00 ng g⁻¹) fue la del Mercado Tulyehualco de la Delegación Xochimilco, por AFG₂ (8.09 ng g⁻¹) y AFt (8.39 ng g⁻¹) fue una muestra del Mercado Bazar de las Especies de la ciudad de Estambul en Turquía, estos niveles elevados se pueden deber a la apertura temprana de la cáscara de los pistaches antes de la cosecha lo cual favorece la contaminación por el viento con hongos o por medio de los insectos, también se puede deber al almacenamiento en condiciones no higiénicas con alta humedad y temperatura que favorecen la contaminación por AF.
- Se encontró diferencia significativa entre el contenido de AF (B₁, B₂, G₁, G₂ y AFt) y el lugar de origen de las muestras.

- El presente estudio da certeza sobre el nivel de contaminación de AF en pistache natural (a granel y empacado al vacío) que posteriormente podría servir para comparar con resultados obtenidos de pistache tostado, esto como una manera de observar si el proceso de tostado influye sobre el contenido de AF.
- Esta tesis fundamenta los cuidados que se deben tener en cuenta respecto a los métodos de control de AF requeridos para la producción de pistache inocuo y adecuado para el consumo, además de mostrar el método de análisis para la cuantificación de AF específicamente en pistache.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Abdulkadar, A. H. W., Al-Ali, A., Al-Jedah, J. 2000. Aflatoxin contamination in edible nuts imported in Qatar. *Food Control*, 11(2): 157-160.
- Akiyama, H., Goda, Y., Tanaka, T., Toyoda, M. 2001. Determination of aflatoxins B₁, B₂, G₁ y G₂ in spices using a multifunctional column clean-up. *Journal of Chromatography A*, 932: 153-157.
- Anguiano, G.L., Verver, A., Vargas, A., Guzmán, D. 2005. Inactivación de aflatoxina B1 y aflatoxicol por nixtamalización tradicional del maíz y su regeneración por acidificación de la masa. *Salud Pública Méx.*, 47(5): 369-375.
- AOAC, Association of Official Analytical Chemist International. 1995. Natural Toxins. In: Official Methods of Analysis of AOAC International, vol. II, Cap. 49. Virginia, USA. 1-3.
- Aoyama, T., Yamano, S., Guzelian, P.S., Gelboin, H.V. 1990. Five of 12 forms of vaccinia virus-expressed human hepatic cytochrome P450 metabolically activate aflatoxin B1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(12): 4790-4793.
- Arino, A., Herrera, M., Estopanan, G., Carmen Rota, M., Carraminana, J., Teresa, J., Herrera, A. 2009. Aflatoxins in bulk and pre-packed pistachios sold in Spain and effect of roasting. *Food Control*, 20(9): 811-814.
- Asao, T., Büchi, G., Abdel-Kader, M.M., Chang, S.B., Wick, E.L., Wogan, G.N. 1965. The structures of aflatoxins B₁ and G₁. *Journal of American Chemistry Society*, 87: 882-886.
- Ballistreri, G., Arena, E., Fallico, B. 2010. Characterization of triacylglycerols in *Pistacia vera* L. oils from different geographic origins. *Italian Journal of Food Science*, 22: 69–75.
- Baltaci, C., Ilyasoğlu, H., Yüksel, F. 2012. Single-laboratory validation for the determination of Aflatoxin B1, B2, G1, and G2 in foods based on immunoaffinity column and liquid chromatography with postcolumn derivatization and fluorescence detection. *Food Analytical Methods*, 1-9.
- Bata, A. & Lásztity, R. 1999. Detoxification of mycotoxins-contaminated food and feed by microorganisms. *Trends in Food Science & Technology*, 10: 223-228.
- Bellomo, M.G., Fallico, B. 2007. Anthocyanins, chlorophylls and xanthophylls in pistachio nuts (*Pistacia vera*) of different geographic origin. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20(3-4): 352-359.
- Bennett, J.W., Klich, M. 2003. Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, 16(3): 197-516.
- Bhatnagar, D., Ehrlich, K. C., Clevel, T. E. 2003. Molecular genetics analysis and regulation of aflatoxin biosynthesis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 61: 83-93.
- Binder, E.M. 2007. Managing the risk of mycotoxins in modern feed production. *Animal Feed Science and Technology*, 133(1-2): 149–166.

- Blesa, J., Soriano, J.M., Moltó, J.C., Mañes, J. 2004. Limited survey for the presence of aflatoxins in foods from local market and supermarkets in Valencia, Spain. *Food Additives and Contaminants*, 21(2): 165-171.
- Bruce, C., Campbell, H., Scharzky, F., Russell, J., Molyneux, T. 2003. Current Research on Reducing Pre and Post Harvest Aflatoxin Contamination of USA Almond, Pistachio and Walnut. *Taylor and Francis*, 22: 225-260.
- Buchanan, R.L., Ayres, J.C. 1975. Effect of initial pH on aflatoxin production. *Applied Microbiology*, 30(6): 1050-1051.
- Bullerman, L.B. 1985. Interactive effects of temperature and pH on mycotoxin production. *LWT-Food Science and Technology*, 18: 197-200.
- Cameán, A. & Repetto, M. 1997. Toxicología avanzada. Díaz de Santos. Madrid. 598 pp.
- Carlile, M.J., Watkinson, S.C., Gooday, G.W. 2001. The Fungi. 2ª edición. Academic Press. Londres. 542 pp.
- Carrillo, L. 2003. Los hongos de los alimentos y forrajes. Universidad Nacional de Salta. Argentina. 128 pp.
- Carvajal, M., Espinosa, J., Moctezuma, G., Gonsebatt, M.E., Pérez, I., 2004. Minimal amount of AFB₁ to produce a mutation in Ames test with *Salmonella typhimurium* TA-98. *Revista Mexicana de Micología*, 19: 71-79.
- Castells, M., Marín, S., Sanchis, V., Ramos, A.J. 2008. Distribution of fumonisins and aflatoxins in corn fractions during industrial cornflake processing. *International Journal of Food Microbiology*, 123(1-2): 81-87.
- Chang, P-K., Horn, B.W., Dorner, J.W. 2005. Sequence breakpoints in the aflatoxins biosynthesis gene cluster and flanking regions in nonaflatoxigenic *Aspergillus flavus* isolates. *Fungal Genetics and Biology*, 42: 914-923.
- Cheraghali, A. M., Yazdanpanah, H., Doraki, N., Abouhossain, G., Hassibi, M., Ali-abadi, S., Aliakbarpoor, M., Amirahmadi, M., Askarian, A., Fallah, N., Hashemi, T., Jalali, M., Kalantari, N., Khodadadi, E., Maddah, B., Mohit, R., Mohseny, M., Phaghihy, Z., Rahmani, A., Setoodeh, L., Soleimany, E., Zamanian, F. 2007. Incidence of aflatoxins in Iran pistachio nuts. *Food and Chemical Toxicology*, 45(5): 812-816.
- Cheraghali, A.M., Yazdanpanah, H. 2010. Interventions to control aflatoxin contamination in pistachio nuts: Iran experience. *Journal of Food Safety*, 30: 382-397.
- Chiavaro, E., Dall'Asta, C., Galaverna, G., Biancardi, A., Gambarelli, E., Dossena, A., Marchelli, R. 2001. New reversed-phase liquid chromatographic method to detect aflatoxins in food and feed with cyclodextrins as fluorescence enhancers added to the eluent. *Journal of Chromatography A*, 937(1-2): 31-40.

- Ciegler, A., Lillehoj, B., Peterson, R., Hall, H. 1966. Microbial detoxification of aflatoxin. *Applied Microbiology*, 14: 934-939.
- CODEX (Código Alimentario), 2005. Código de prácticas para la prevención y reducción de la contaminación de las nueces de árbol por aflatoxinas. 15 pp.
- Creppy, E.E. 2002. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicology Letters*, 127(1-3): 19–28.
- Croy, R.G., Essigmann, J.M., Reinhold, V.N., Wogan, G.N. 1978. Identification of the principal aflatoxin B1-DNA adduct formed *in vivo* in rat liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 75: 1745-1749.
- Derache, R. 1990. Toxicología y Seguridad de los Alimentos. Ediciones Omega. Barcelona. 510 pp.
- D’Mello, J.P.F., Macdonald, A.M.C. 1997. Mycotoxins. *Animal Feed Science Technology*, 69: 155-166.
- Díaz, J. 2004. Descubre las frutas exóticas. Capitel Ediciones. España. 454 pp.
- Dini, A., Khazaeli, P., Roohbakhsha, A., Madadlou, A., Poureanamdari, M., Setoodehb, L., Askarianb, A., Doraki, N., Farrokhi, H., Moradi, H., Khodadadi, E. 2013. Aflatoxin contamination level in Iran’s pistachio nut during years 2009-2011. *Food Control*, 30: 540-544.
- Doster, M.A., Michailides, T.J. 1994. Development of *Aspergillus* molds in litter from pistachio tree. *Plant Disease*, 78: 393-397.
- Doster, M.A., Michailides, T.J. 1999. Relationship between shell discoloration of pistachio nuts and incidence of fungal decay and insect infestation. *Plant Disease*, 83(3): 259-264.
- Edwards, K., Kwaw, I., Matud, J. & Kurtz, I. 1999. Effect of pistachio nuts on serum lipid levels in patients with moderate hypercholesterolemia. *Journal of the American College of Nutrition*, 18(3): 229-232.
- Ehrlich, K., Cotty, P.J. 2003. New insights into pH regulation of AF production by *Aspergillus* species. *XXII Fungal Genetics Conference Proceedings*, Abstract no. 201, pp. 283.
- Erhlich, K.C., Kobbeman, K., Montalbano, B.G., Cotty, P.J. 2007. Aflatoxin producing *Aspergillus* species from Thailand. *International Journal of Food Microbiology*, 114: 153-159.
- El-Nezami, H.S., Nicoletti, G., Neal, G.E. Donohue, D.C., Ahokas, J.T. 1995. Aflatoxin M1 in human breast milk samples from Victoria, Australia and Thailand. *Food and Chemical Toxicology*, 33: 173-179.
- Erkmen, O., Bozoglu, T.F. 2008. Food microbiology 2: Microbial Food Spoilage. Ilke Publishing Company, Ankara. Turquía. 189 pp.

- Essigmann, J.M., Croy, R.G., Nadzan, A.M., Busby, W.F., Reinhold, V.N., Buchi, G., Wogan, G.N. 1977. Structural identification of the major DNA adduct formed by aflatoxin B₁ *in vitro*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74: 1870-1874.
- FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2004. Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003. *FAO Food and Nutrition Paper, No. 81*. Rome: FAO.
- FAOSTAT (Food and Agriculture Organization of the United Nations), 2010. Consulta: 28/10/13 (<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>)
- Faustman, E.M., Omenn, G.S. 2005. Fundamentos de toxicología. McGraw Hill Interamericana. Madrid. 497 pp.
- Fernandes-Oliveira, C.A., Kobashigawa, E., Alves, T., Mestieri, L., Albuquerque, R., Correa, B. 2000. Aflatoxin B₁ residues in eggs of laying hens fed a diet containing different levels of the mycotoxin. *Food Additives and Contaminants*, 17(6): 459-462.
- Frazier, W.C., Westhoff, D.C. 1985. Microbiología de los alimentos. 3ª Edición. Acribia. Zaragoza. 60-95.
- Freire, C.O.F., Kozakiewicz, Z., Paterson, R.R.M. 2000. Mycoflora and mycotoxins in Brazilian black pepper, white pepper and Brazil nuts. *Mycopathologia*, 149: 13–19.
- Fujimoto, Y., Hampton, I.I., Wirth, P.J., Wang, N.J., Xie, J.P., Thorgeirsson, S.S. 1994. Alterations of tumor suppressor genes and allelic losses in human hepatocellular carcinomas in China. *Cancer Research*, 54(1): 281-285.
- Gamli, O., Hayoglu, I. 2007. The effect of the different packaging and storage conditions on the quality of pistachio nut paste. *Journal of Food Engineering*, 78(2): 443-448.
- García, S., Heredia, N. 2006. Mycotoxins in Mexico: Epidemiology, management and control strategies. *Mycopathologia*, 162: 255-264.
- Gebauer, S.K., West, S.G., Kay, C.D., Alaupovic, P., Bagshaw, D., Kris-Etherton, P.M. 2008. Effects of pistachios on cardiovascular disease risk factors and potential mechanisms of action: A dose-response study. *American Journal of Clinical Nutrition*, 88(3):651-659.
- Georgiadou, M., Dimou, A., Yanniotis, S. 2012. Aflatoxin contamination in pistachio nuts: A farm to storage study. *Food Control*, 26(2): 580-586.
- Ghali, R., Belouaer, I., Hdiri, S., Ghorbel, H., Maaroufi, K., Hedilli, A. 2009. Simultaneous HPLC determination of aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ in Tunisian sorghum and pistachios. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22(7-8): 751-755.
- Ghosia, L., Arshad, H. 2011. Studies on contamination level of aflatoxins in some dried fruits and nuts of Pakistan. *Food Control*, 22(3-4): 426-429.
- Gimeno, A. 2004. Aflatoxina M₁ en la Leche. Riesgos para la Salud Pública. *Prevención y Control, Alimentación Animal*, 49: 32-44.

- Goldblatt, L.A. 1972. Implications of mycotoxins. *Clinical Toxicology*, 5: 453.
- Goto, T., Wiclow, D.T., Ito, Y. 1996. Aflatoxin and cyclopiazonic acid production by a sclerotium producing *Aspergillus tamarii* strain. *Applied and Environmental Microbiology*, 113(12): 4036-4038.
- Grippi, F., Crosta, L., Aiello, G., Tolomeo, M., Oliveri, F., Gebbia, N., Curione, A. 2008. Determination of stilbenes in Sicilian pistachio by high-performance liquid chromatographic diode array (HPLC-DAD/FLD) and evaluation of eventually mycotoxin contamination. *Food Chemistry*, 107(1): 483-488.
- Guzmán, D. 2007. La exposición a la aflatoxina B-1 en animales de laboratorio y su significado en la salud pública. *Salud Pública de México*, 49(3): 227-235.
- Hertzog, P.J., Smith, J.R. & Garner, R.C. 1982. Characterization of the imidazole ring-opened forms of trans -8, 9- dihydro- 8, (7-guanyl) 9-hydroxy aflatoxin B1. *Carcinogenesis*, 3: 723-725.
- Hussein, H.S., Brasel, J.M. 2001. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology*, 167(2): 101-134.
- IARC. 2002. Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 82. Lyon (France): International Agency for Research on Cancer (IARC). p. 171.
- ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods), 1996. Toxigenic Fungi: *Aspergillus*. Academic Press. Londres. 381 pp.
- Ito, Y., Peterson, S.W., Wicklow, D.T., Goto, T. 2001. *Aspergillus pseudotamarii*, a new aflatoxin producing species in *Aspergillus* section Flavi. *Mycological Research*, 105(2): 233-239.
- Jaimez, J., Fente, C. A., Vazquez, B. I., Franco, C. M., Cepeda, A., Mahuzier, G. 2000. Application of the assay of aflatoxins by liquid chromatography with fluorescence detection in food analysis. *Journal of Chromatography A*, 882(1-2): 1-10.
- Jeffrey, A.M., Williams, G.M. 2005. Risk assessment of DNA-reactive carcinogens in food. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 207: S628-S635.
- Jiménez, M., Manez, M., Hernández, E. 1996. Influence of water activity and temperature on the production of zearalenone in corn by three *Fusarium* species. *International Journal of Food Microbiology*, 29(2-3): 417-421.
- Jordan, F.T., Pattison, M. 1996. Poultry Diseases. 4a Edición. Editorial Saunders Company. Gran Bretaña. 546 pp.
- Juan, C., Zinedine, A., Molto, J.C., Idrissi, L., Manes, J. 2008. Aflatoxins levels in dried fruits and nuts from Rabat-Sale area, Morocco. *Food Control*, 19(9): 849-853.

- Khosravi, A.R., Shokri, H., Ziglari, T. 2007. Evaluation of fungal flora in some important nut products (pistachio, peanut, hazelnut and almond) in Tehran, Iran. *Pakistan Journal of Nutrition*, 6: 460-462.
- Kocyigit, A., Koylu, A.A., Keles, H. 2006. Effects of pistachio nuts consumption on plasma lipid profile and oxidative status in healthy volunteers. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 16(3): 202-209.
- Kok, W. 1994. Derivatization reactions for the determination of aflatoxins by liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography B*, 659: 127-137.
- Kris-Etherton, P.M., Hu, F.B., Ros, E., Sabaté, J. 2008. The role of tree nuts and peanuts in the prevention of coronary heart disease: Multiple potential mechanisms. *Journal of Nutrition*, 138(9): 1746S-1751S.
- Kurtzman, C.P., Horn, B.W., Hesseltine, C.W. 1987. *Aspergillus nomius*, a new aflatoxins-producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamarii*. *Antonie Leeuwenhoek*, 53: 147-158.
- Leeson, S., Diaz, G., Summers, J. 1995. Poultry metabolic disorders and mycotoxins. University Books. Ontario. 352 pp.
- Lillehoj, E.B., Ciegler, A., Hall, H.H. 1967. Aflatoxin B1 uptake by *Flavobacterium aurantiacum* and resulting toxic effects. *Journal of Bacteriology*, 93: 464-471.
- Lindner, E. 1995. Toxicología de los alimentos. 2ª. Ed. Acribia. Zaragoza. 262 pp.
- Lloyd-Jones, D.M., Hong, Y., Labarthe, D., Mozaffarian, D., Appel, L.J., Van Horn, L., Greenlund, K., Rosamond, W.D. 2010. Defining and setting national goals for cardiovascular health promotion and disease reduction: The American Heart Association's strategic impact goal through 2020 and beyond. *Circulation*, 121(4): 586-613.
- Manonmani, H.K., Anand, S., Chandrashekar, A., Rati, E.R. 2005. Detection of aflatoxigenic fungi in selected food commodities by PCR. *Process Biochemistry*, 40: 2859-2864.
- Martínez, R.M. & Anadón, A. 2006. Toxicología Alimentaria. Díaz de Santos. Madrid. 23 pp.
- Mohanamba, T., Habibi, S.M.M., Sastry, P.R., Rajeswari, K.R., Rao, M.R.K. 2002. *Aspergillus flavus* contamination of feeds and its potential to produce aflatoxin. *Indian Veterinary Journal*, 79(12): 1302-1303.
- Molyneux, R.J., Mahoney N., Kim J.H., Campbell B.C. 2007. Mycotoxins in edible tree nuts. *International Journal of Food Microbiology*, 119: 72-78.
- Moss, M.O. 1991. The environmental factors controlling mycotoxin formation. CRC Press. Florida. 553 pp.

- Moss, M.O. 2002. Risk assessment for aflatoxins in foodstuffs. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 50(3-4): 137-142.
- MSCR (Ministerio de Salud de Costa Rica), 2002. Guía de validación de métodos analíticos. Costa Rica. 16 pp.
- Norma Oficial Mexicana (NOM-188-SSA1-2002), 2002. Norma Oficial Mexicana, productos y servicios. Control de aflatoxinas en cereales para consumo humano y animal. Especificaciones sanitarias. México, D.F. 41 pp.
- Oğuz H., Kurtoğlu, V. and Coskun, B. 2000. Preventive efficacy of clinoptilolite in broilers during chronic aflatoxin (50 & 100 µg/kg) exposure. *Research in Veterinary Science*, 69: 197-201.
- OPS, Organización Panamericana de la Salud. 1983. Micotoxinas. Criterios de la salud ambiental. 131 pp.
- Papp, E., H-Otta, K., Záray, G., Mincsovic, E. 2002. Liquid chromatography determination of aflatoxins. *Microchemical Journal*, 73: 39-46.
- Peterson, S.W., Ito, Y., Horn, B.W., Goto, T. 2001. *Aspergillus bombycis* a new aflatoxigenic species and genetic variation in its sibling species, *A. nomius*. *Mycologia*, 93(4): 689-703.
- Pittet, A. 1998. Natural occurrence of mycotoxins in foods and feeds – an updated review. *Revue de Medecine Veterinaire*, 149: 479–492.
- Ramsdell, H.S., Parkinson, A., Eddy, A.C., Eaton, D.L. 1991. Bioactivation of aflatoxin B1 by human liver microsomes: Role of Cytochrome P450 IIIA Enzymes. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 108(3): 436-447.
- Rastogi, S., Das, M., Khanna, S.K. 2001. Quantitative determination of aflatoxins B₁-oxime by column liquid chromatography with ultraviolet detection. *Journal of Chromatography A*, 933: 91-97.
- Rastogi, S., Dwivedi, P.D., Khanna, S.K., Das, M. 2004. Detection of Aflatoxin M1 contamination in milk and infant milk products from Indian markets by ELISA. *Food Control*, 15: 287-290.
- Richard, J.L. 2007. Some major mycotoxins and their mycotoxicoses-An overview. *International Journal of Food Microbiology*, 119(1-2): 3-10.
- Rodríguez, M.L., Calonge, M.M., Ordoñez, D. 2003. ELISA and HPLC determination of the occurrence of aflatoxin M1 in raw cow's milk. *Food Additives & Contaminants*, 20: 276-280.
- Ros, E., Tapsell, L.C., Sabaté, J. 2010. Nuts and berries for heart health. *Current Atherosclerosis Reports*, 12(6): 397-406.

- Sabaté, J. & Ang, Y. 2009. Nuts and health outcomes: New epidemiologic evidence. *American Journal of Clinical Nutrition*, 89(5): 1643S-1648S.
- Samson, R.A., Hoekstra, H.S., Frisvad, J.C., Filtenborg, O. 1995. Introduction to food-borne fungi. Samson, RA & Hoeskra, HS (eds). Baarn: Centralbureau loor Schimmelcultures. Holanda. 248 pp.
- Sanchis, V., Marín, S., Ramos, A.J. 2007. Factores determinantes en la producción de micotoxinas. Ediciones Díaz de Santos. España. 396 pp.
- Santuario, J.M., Mallmann, C.A., Rosa, A.P, Appel, G., Heer, A., Dageförde, S., Böttcher, M. 1999. Effect of sodium bentonite on the performance and blood variables of broilers chickens intoxicated with aflatoxins. *British Poultry Science*, 40: 115-119.
- Sari, I., Baltaci, Y., Bagci, C., Davutoglu, V., Erel, O., Celik, H., Ozer, O., Aksoy, M. 2010. Effect of pistachio diet on lipid parameters, endothelial function, inflammation, and oxidative status: A prospective study. *Nutrition*, 26(4): 399-404.
- Scheidegger, K.A., Payne, G.A. 2003. Unlocking the secrets behind secondary metabolism: A review of *Aspergillus flavus* from pathogenicity to functional genomics. *Journal of Toxicology-Toxin Reviews*, 22(2-3): 423-459.
- Set, E. 2009. Detection of aflatoxins in pistachio nut and ground red pepper sold in Gaziantep region. M.Sc. Thesis, Graduated School of Natural and Applied Sciences, University of Gaziantep. Gaziantep, Turquía. 106 pp.
- Set, E., Erkmen, O. 2010. The aflatoxin contamination of ground red pepper and pistachio nuts sold in Turkey. *Food and Chemical Toxicology*, 48: 2532-2537.
- Sheridan, M.J., Cooper, J.N., Erario, M., Cheifetz, C.E. 2007. Pistachio nut consumption and serum lipid levels. *Journal of the American College of Nutrition*, 26(2): 141-148.
- Shibamoto, T., Bjeldanes L. F. 1996. Introducción a la toxicología de los alimentos. Editorial Acribia. España. 216 pp.
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera), 2011a. Consulta: 28/10/13 (http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=350)
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera), 2011b Consulta: 28/10/13 (http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=351)
- Simon, P., Delsaut, P., Lafontaine, M., Morele, Y., Nicot, T. 1998. Automated column-switching high-performance liquid chromatography for the determination of aflatoxin M1. *Journal of Chromatography B*, 712: 95-104.
- Skoog, D.A., Holler, F.J., Crouch, S.R. 2008. Principios de Análisis Instrumental. Cengage Learning Editores. México. 1038 pp.

- Smela, M.E., Currier, S.S., Bailey, E.A., Essigmann, J. 2001. The chemistry and biology of aflatoxin B₁: from mutational spectrometry to carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 22:535-545.
- Sodhi, S., Brar, A.P.S., Ghai, J.K., Brar, R.S. 2005. Biochemical and immunological effects of dietary exposure to aflatoxin B1 in broiler chicks. *Indian Journal of Poultry Science*, 40(2): 155-157.
- Soriano del Castillo, J.M. Editor. 2007. Micotoxinas en Alimentos. Ediciones Díaz de Santos. España. 396 pp.
- Sotomayor, R.E., Washington, M., Nguyen, L., Nyanganyi, R., Hinton, D. M. and Chou, M. 2003. Effects of intermittent exposure to aflatoxin B1 on DNA and RNA adduct formation in rat liver: dose-response and temporal patterns. *Toxicological Sciences*, 73. 329-338.
- Sweeney, M.J., Dobson, A.D.W. 1999. Molecular biology of mycotoxin biosynthesis. *FEMS Microbiology Letters*, 175: 149-163.
- Takahashi, D.M. 1977. Reversed phase high performance liquid chromatographic analytical system for aflatoxins in wines with fluorescence detection. *Journal of Chromatography*, 131: 147-156.
- Trucksess, M.W., Scott, P.M. 2008. Mycotoxins in botanicals and dried fruits: a review. *Food Additives and Contaminants*, 25(2): 181-192.
- Unusan, N. 2006. Occurrence of aflatoxin M1 in UHT milk in Turkey. *Food and Chemical Toxicology*, 44: 1897-1900.
- Vaamonde, G. 1995. Toxicología de los Alimentos. Editorial Hemisferio Sur. México. 193 pp.
- Vázquez, C., De Cos, A.I., López, C. 2005. Alimentación y Nutrición. 2ª ed. Ediciones Díaz de Santos. España. 488 pp.
- Vitale, R., Bevilacqua, M., Bucci, R., Magri, A., Magri, A., Marini, F. 2013. A rapid and non-invasive method for authenticating the origin of pistachio samples by NIR spectroscopy and chemometrics. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 121(15): 90-99.
- Wang, J.S. & Groopman, J.D. 1999. DNA damage by mycotoxins. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 424(1-2): 167-181
- Wheeler, K.A., Hurman, B.F., Pitt, J.I. 1991. Influence of pH on the growth of some toxicogenic species of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium*. *International Journal of food Microbiology*, 12(2-3): 141-150.
- Wyllie, T.D. & Morehouse, L.G. E. 1978. Mycotoxic fungi, mycotoxins and mycotoxicoses. An Encyclopedic Handbook. Mycotoxin control and regulatory aspects, 3: 202.
- Yabe, K., Nakumura, M., Hamasaki, T. 1999. Enzymatic formation of G-group aflatoxins and biosynthetic relationship between G and B group aflatoxins. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(9): 3867-3872.