



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

"ESTUDIO COMPARATIVO, IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LAS TOXINAS MUTÁGENAS Y CANCERÍGENAS DE HONGOS *ASPERGILLUS* SPP. LLAMADAS AFLATOXINAS, EN CACAHUATE NATURAL (*Arachis hypogaea* L.), DE MÉXICO, TURQUÍA E INDIA ".

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO DE ALIMENTOS

PRESENTA

JOSÉ RODRIGO ALVARADO HERNÁNDEZ

México, D.F.

2014





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:	Dr. PEDRO VALLE VEGA
VOCAL:	I.Q. MIGUEL ANGEL HIDALGO TORRES
SECRETARIA:	Dra. MAGDA CARVAJAL MORENO
1er. SUPLENTE:	M. en C. LUCÍA HERNÁNDEZ GARCIADIEGO
2º. SUPLENTE:	Dra. ILIANA ELVIRA GONZÁLEZ HERNÁNDEZ

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 FIMAR DE LA ASESORA DEL TEMA:

Dra. Magda Carvajal Moreno

NOMBRE COMPLETO Y FIRMA DEL SUSTENTANTE:

José Rodrigo Alvarado Hernández

DEDICATORIA

A mis Padres Elvira y José Ángel

Nunca han dejado de creer en mí, en lo que hago y haré a partir de este momento en mi vida, gracias por enseñarme como hacer las cosas correctamente, como vivir la vida de una manera responsable, gracias por ser mis padres, mis guías, mi ejemplo a seguir, gracias por darme su apoyo incondicional y por ustedes estoy en donde estoy.

A mis hermanas Gabriela y Zaira

Por su apoyo y consejos, a las alegrías, risas y las peleas, ya que como dicen, “de todo se aprende” y yo he aprendido mucho de ellas, a salir adelante por mis propios méritos, a esforzarme día con día, a no decir NO SE PUEDE, si nunca lo he intentado. En verdad gracias por estar conmigo en este camino que ha sido largo y con muchas trabas para mí.

A mis tíos, Gardelia, Clemerina, José Luis y a mis primos Adrián y Fernando

Que hacen las reuniones familiares más amenas.

A mi novia Mery

Con quien he vivido momentos maravillosos, mañanas, tardes y noches llenas de risas y diversión. Gracias por aparecer en mi vida y llenarla de alegrías, de esa manera has hecho mi camino más tranquilo, ya que tengo con quien compartir buenos y malos días, experiencias y circunstancias que ocurren en mi vida, tanto en el pasado, presente y futuro. Gracias por aparecer en el mejor momento de mi vida.

A mis amigos

Maythé, José Carlos, Luis, Omar, Guillermo y no por ser la última que apareció en mi vida, no significa que no tiene un lugar importante para mí, Mariana. De cada uno de ustedes tengo un poco de su esencia, saber que siempre estarán en las buenas, en las malas y en las peores cuando los necesite. Los amigos se cuentan con los dedos de la mano y ustedes son incondicionales para mí. Los quiero y gracias por aceptarme como soy.

A mis compañeros de laboratorio Conrado, José, Ismael y Mario

Que en verdad como la pasamos tan bien, reímos y platicamos de tantas cosas, cosas completamente tan aparte de lo que teníamos que hacer, gracias por hacer tan tranquilo los momentos y de los mejores de la carrera. Son extraordinarias personas y gracias por permitirme pasar la última etapa de la carrera con ustedes.

AGRADECIMIENTOS

A las personas

A mi Directora de Tesis, la Dra. Magda Carvajal Moreno por su apoyo, dirección y enseñanzas.

Al M. en C. Francisco Rojo Calleja por su apoyo en la validación del método.

A la Dra. Silvia Ruiz–Velasco Acosta del Instituto de Investigaciones en Matemáticas Aplicadas y Sistemas (IIMAS) por el Análisis Estadístico de los resultados.

A las Instituciones

Al Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por el uso del laboratorio C-119, reactivos y equipo.

A la Facultad de Química de la UNAM por la carrera, el apoyo administrativo y trámites del Examen de Grado y Jurado.

INDICE	Página
Contenido	
Título.....	i
Jurado.....	ii
Dedicatoria.....	lii
Agradecimientos.....	iv
Índice.....	v
Lista de Tablas.....	vi
Lista de Figuras.....	vii
Resumen	viii
Abstract.....	ix
I. Introducción	1
I.1. Generalidades del cultivo de cacahuete.....	1
I.2. Importancia económica, producción y consumo mundial y en México.....	4
I.2.1. Producción y consumo mundial.....	4
I.2.2. Producción de cacahuete en México.....	6
I.2.3. Consumo de cacahuete en México.....	8
I.2.4. Exportación de cacahuete.....	8
I.3. Micotoxinas.....	9
I.3.1. Generalidades de Aflatoxinas.....	10
I.3.2. Estructura química.....	11
I.3.3. Propiedades fisicoquímicas.....	12
I.3.4. Efectos en la salud animal y humana.....	13
I.3.5. Aflatoxinas en cacahuete.....	16
II. Hipótesis	18
III. Objetivos	19
III.1. Generales.....	19
III.2. Particulares.....	19
IV. Materiales y Métodos	20
IV.1. Muestreo.....	20
IV.1.1. En el Distrito Federal.....	20
IV.1.2. En el extranjero.....	23
IV.2. Preparación de las muestras.....	23
IV.2.1. Extracción química de las AF del cacahuete.....	23
IV.3. Derivatización de AF.....	24
IV.4. Validación del método.....	25
IV.4.1. Linealidad o curvas de calibración.....	25
IV.4.2. Selectividad.....	26
IV.4.3. Límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ).....	26
IV.4.4. Porcentaje de recuperación.....	27
IV.5. Cuantificación de AF.....	28
IV.5.1. Cromatografía de líquidos (HPLC).....	28
IV.5.2. Cuantificación de AF por HPLC.....	28
IV.6. Análisis estadístico.....	29
V. Resultados y Discusión	30
V.1. Validación del método.....	30
V.1.1. Linealidad (Curvas de calibración de AFB ₁ , AFB ₂ , AFG ₁ y AFG ₂)....	30
V.1.2. Límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ).....	35
V.1.3. Porcentaje de recuperación.....	35
V.1.4. Prueba de selectividad.....	35
V.2. Cuantificación de AF en cacahuete por HPLC.....	36
V.3. Análisis estadístico.....	42
VI. Conclusiones	47
VII. Bibliografía	48

LISTA DE TABLAS

N°	Contenido	Páginas
1	Composición química del cacahuete (Venkatachalam & Sathe, 2006; Tuberoso <i>et al.</i> , 2007).	4
2	Principales países productores de cacahuete en el mundo en 2011 (SIAP, 2011).....	5
3	Producción, consumo y comercio mundial de cacahuete en millones de toneladas (USDA, 2011).....	6
4	Superficie sembrada, cosechada, producción y rendimiento (ton/Ha) del cacahuete (DGAPEAS, 2012).....	8
5	Fórmulas, peso molecular y propiedades fisicoquímicas de las aflatoxinas (OPS, 1983).....	13
6	DL ₅₀ ($\mu\text{g Kg}^{-1}$) dependiendo de la especie animal (Soriano, 2007).....	14
7	Muestreo de cacahuete de 48 mercados en las 16 Delegaciones de la Ciudad de México en 2012.....	21
8	Tabla de muestras en el extranjero.....	23
9	Reactivos de la solución amortiguadora de fosfatos (PBS)	23
10	Pesos moleculares de cada AF.....	27
11	Concentraciones de AF (ng mL^{-1}) para obtener las curvas de calibración.....	30
12	Rango de tiempos de retención (T_r) de cada AF obtenido de las pruebas de recuperación, selectividad y de las curvas de calibración....	30
13	Curva de calibración AFB ₁	31
14	Curva de calibración AFB ₂	32
15	Curva de calibración AFG ₁	33
16	Curva de calibración AFG ₂	34
17	Valores de Límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ).....	35
18	Porcentaje de recuperación.....	35
19	Concentración de aflatoxinas ($\mu\text{g Kg}^{-1}$) en cacahuete del D.F.....	37
20	Alimentos y cálculo de AFt en cacahuete procesado.....	39
21	Resultados obtenidos por la prueba Kruskal-Wallis.....	42

LISTA DE FIGURAS

Nº	Contenido	Página
1	Productos del cacahuate: palanqueta, aceite, bebida con ron, salsas, cacahuate japonés, helados, dulces, galletas, crema, garapiñados, tamales, mole, mazapán, cacahuate natural, pastel, cosméticos, shampoo y antioxidante.....	2
2	Planta de cacahuate (<i>Arachis hypogaea</i>), semilla y cosecha.....	3
3	Gráfica de los principales Estados productores de cacahuate en México (DGAPEAS, 2012).....	7
4	Estructuras químicas de las Aflatoxinas (Soriano, 2007).....	12
5	Imagen del hongo <i>A. parasiticus</i> (a) al microscopio. b) cacahuate contaminado por <i>A. parasiticus</i>	17
6	Gráfica de la curva de calibración de AFB ₁	31
7	Gráfica de la curva de calibración de AFB ₂	32
8	Gráfica de la curva de calibración de AFG ₁	33
9	Gráfica de la curva de calibración de AFG ₂	34
10	Cromatograma de selectividad para el blanco.....	36
11	Cromatograma de selectividad para la muestra de cacahuate contaminada con AFB ₁ , AFB ₂ , AFG ₁ y AFG ₂	36
12	Procedencia y concentración de AFB ₁ de las muestras.....	40
13	Procedencia y concentración de AFB ₂ de las muestras.....	40
14	Procedencia y concentración de AFG ₁ de las muestras.....	41
15	Procedencia y concentración de Aflatoxinas totales (AFt) de las muestras.....	42
16	Comparación entre Delegaciones y concentración de AFB ₁	43
17	Comparación entre Delegaciones y concentración de AFB ₂	44
18	Comparación entre Delegaciones y concentración de AFG ₁	44
19	Comparación entre Delegaciones y concentración de AFt.....	45

RESUMEN

El cacahuete (*Arachis hypogaea* L.) es una leguminosa tropical de la familia Fabaceae originaria y cultivada en el sur de México y Perú, Asia, África y Australia. El cacahuete, tiene propiedades medicinales, que ayudan a prevenir las enfermedades cardíacas al reducir el colesterol, también estimula y regula la digestión.

Las micotoxinas son metabolitos secundarios tóxicos que consisten en moléculas pequeñas ($PM < 700$) y las producidas por algunos hongos filamentosos como *Aspergillus* spp. se llaman Aflatoxinas (AF). Los daños generados por las AF son hemorragias, vómitos, abortos, malformaciones, diarrea y muerte. También causan daños crónicos en el hígado y el riñón, cáncer (digestivo, pulmonar e incluso cervical), inmunosupresión y desnutrición aguda asociada con el síndrome de Reye, Kwashiorkor y marasmo.

La presente investigación consistió en el muestreo de 50 g de cacahuates, de los tres principales mercados de cada una de las 16 Delegaciones de la Ciudad de México. Las muestras de cacahuete se homogenizaron y posteriormente las cuatro aflotoxinas (AF) se extrajeron con metanol/agua (80:20 v/v), se purificaron y concentraron con columnas de inmunoafinidad. La identificación y cuantificación de las AF se realizó por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). Mediante el análisis estadístico de la prueba no paramétrica de Wilcoxon/Kruskal-Wallis se compararon el origen de las muestras y el tipo de AF.

Se validó el método de extracción y cuantificación de AF en cacahuete. Se comprobó que el método es selectivo y lineal, los porcentajes de recuperación de AF se encontraron en rangos de 82% a 100%. Los límites de detección de las AF (ng g^{-1}), obtenidos de las curvas de calibración fueron: AFB_1 (0.1), AFB_2 (0.01), AFG_1 (0.01) y AFG_2 (0.05).

Los resultados indican, que de las 58 muestras, el 80% de ellas se encuentra contaminada con AFB_1 y el 100% por aflatoxinas totales (AFt). El análisis estadístico arrojó como significativa a la mayor concentración de AFB_1 encontrada en las muestras de la Delegación Gustavo A. Madero ($44 \mu\text{g Kg}^{-1}$). Para la AFB_2 ($80 \mu\text{g Kg}^{-1}$) fue la Delegación Benito Juárez, y sólo hubo trazas de AFG_1 donde el nivel más alto fue $0.64 \mu\text{g Kg}^{-1}$, en la Delegación Tláhuac. Hubo trazas de $\text{AFG}_2 < \text{LOD}$ en las muestras. La mayor concentración total de AF fue de $8.53 \mu\text{g Kg}^{-1}$.

ABSTRACT

The peanut (*Arachis hypogaea* L.) is a tropical oil seed of the family Fabaceae native and cultivated in the south Mexico and Peru, Asia, Africa and Australia. The peanut has medicinal properties, which help to prevent heart disease by lowering cholesterol, also stimulates and regulates the digestion.

Mycotoxins are toxic secondary metabolites consisting of small molecules (MW < 700), and those produced by some filamentous fungi such as *Aspergillus* spp. are called aflatoxins (AF). Among the symptoms caused by AF are bleeding, vomiting, abortions, malformations, diarrhea and death. AF cause chronic liver damage and kidney cancer (gastrointestinal, pulmonary and even cervical), immunosuppression and acute malnutrition associated with Reye's syndrome, Kwashiorkor and marasmus.

The purpose of the present research was to obtain samples of 50 g of peanut of the three major markets of each one of the 16 boroughs of Mexico City. The peanut samples were homogenized and the 4 AF were extracted with methanol/water (80:20 v/v) and were purified and concentrated by immunoaffinity columns. The identification and quantification of AF was performed by high performance liquid chromatography (HPLC). Through the statistical analysis of the non-parametric Wilcoxon/ Kruskal -Wallis the role of the origin of the samples and types of AF were compared and their significance was obtained.

The method of extraction and quantification of AF in peanut was validated. It was found that the method has a linear selectivity and the range of the percentage of AF recovery was from 82% to 100 %. The limits of detection of AF (ng g^{-1}) obtained from the calibration curves were AFB₁ (0.1), AFB₂ (0.01), AFG₁ (0.01) and AFG₂ (0.05).

The results indicated that from the 58 samples a 80% was contaminated with AFB₁ and all of them had total aflatoxins (AFt). The statistical analysis showed a significant difference with AFB₁ with the highest concentration of $44 \mu\text{g Kg}^{-1}$ found in the Gustavo A. Madero borough. For AFB₂ the highest concentration was $80 \mu\text{g Kg}^{-1}$ from Benito Juarez borough; and only traces of AFG₁, the highest was $0.64 \mu\text{g Kg}^{-1}$, were the Tláhuac borough. Only traces of AFG₂ were present, and all the samples had an average of AFt of $8.53 \mu\text{g Kg}^{-1}$.

I. INTRODUCCIÓN

I.1. Generalidades del cultivo del cacahuate.

Los cacahuates son plantas dicotiledóneas de la familia Leguminosae (Fabaceae), subfamilia Papilionoidae, género *Arachis*. La planta consta de una parte aérea con ramificaciones, hojas y flores. Después de la fecundación, las flores forman ginóforos (porciones alargadas del receptáculo o del eje de algunas flores en cuyo ápice se dispone el gineceo) que se alargan y penetran en el suelo. El periodo desde el inicio de la fructificación hasta la cosecha dura de 40-50 días (Câmara, 1998), y durante este lapso hay muchos agentes infecciosos (bióticos), como hongos y bacterias que enferman a la planta.

Son alrededor de 20 millones de hectáreas de siembra y producción del cacahuate, 55 de la soya (*Glycine max* L. Merrill) y 26 del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) (FAO, 1998).

China, India y África son los mayores productores de cacahuate. En Latinoamérica, Brasil posee los suelos y clima apropiados para el cultivo del cacahuate, con una producción estimada de 267,800 toneladas en la cosecha 2005/2006, con el estado de Sao Paulo como el mayor productor (Chang, 2013).

El resto de países importan cacahuate para satisfacer sus necesidades de consumo interno, por su falta de condiciones de agricultura tropical para cultivar esta leguminosa (Zorzete, 2011). La temperatura óptima de desarrollo está entre 21 y 27°C, a 12°C el crecimiento se detiene y a más de 30°C aumenta la transpiración y las flores pueden deshidratarse. Los mejores suelos para el cultivo del cacahuate son los permeables, sueltos, profundos, sin agua freática en un 1 m de profundidad. Las tierras con los mejores rendimientos en grasa de cacahuate contienen: arcilla 5 a 7%, limo 5 a 7%, arena silíceo 75 a 85% y materia orgánica 2 a 3% (SIAP, 2012).

Los cacahuates se utilizan en la fabricación de dulces, caramelos, pastas, etc., **Figura 1.** Alrededor del 60% de la producción mundial de cacahuate se consume como aceite (Santos, 2000). La semilla de cacahuate posee un alto valor nutricional y comercial

debido a la presencia de proteínas, ácidos grasos, carbohidratos y fibra, además de vitaminas, calcio y fósforo (Cámara, 1998).



Figura 1: Productos del cacahuete: palanqueta, aceite, bebida con ron, salsas, cacahuete japonés, helados, dulces, galletas, crema, garapiñados, tamales, mole, mazapán, cacahuete natural, pastel, cosméticos, shampoo y antioxidante.

La densidad de siembra de los cacahuates es de 30 a 40 cm entre plantas y de 130 a 200 Kg de semilla por hectárea. La siembra se puede hacer a mano, o usando una sembradora de tracción animal ó mecánica, el número de días de crecimiento depende de la variedad, altitud y latitud, y las plantas empiezan a florecer profusamente después de 6 a 8 semanas (SIAP, 2012). El cacahuete por su tipo de fructificación subterránea y hábito de crecimiento indeterminado, ocasiona que la cosecha sea una de las prácticas más costosa y delicada.

Un punto crítico del cultivo es determinar su tiempo de cosecha, los frutos que se desarrollan primero están maduros para su germinación, y los prematuros aún no llenan la vaina y carecen de valor. La práctica general es sacar varias plantas en intervalos a lo largo del surco, hasta observar que la mayor parte de las vainas estén maduras. Las semillas maduras deben ser de color rosa o rojo, cuando la vaina se despega por dentro y su testa se desprende fácilmente. Las vainas se cosechan extrayendo la planta completa del suelo, mediante una pala, o con un excavadora mecánica (SIAP, 2012). **Figura 2.**



Figura 2. Planta de cacahuete (*Arachis hypogaea*), semilla y cosecha.

El cultivo se utiliza de manera integral, como forraje para el ganado, para el consumo humano directo o para la elaboración de productos industrializados. En el primer caso se consume tostado como fruto seco y en confitería, ensaladas, etc. En el segundo caso se destina para la fabricación de aceite, harina, crema de cacahuete, tintas, lápices labiales, colores, jabón, entre otros (DGAPEAS, 2011).

Para la obtención de aceite, el grano es sometido a una serie de operaciones sucesivas: depuración de los cuerpos extraños (mediante cribas vibrantes y corrientes de aire); cernido según el tamaño, descascarado, separación de la cutícula, molienda de la semilla y finalmente extracción. El contenido óptimo de humedad es de cerca del 6%.

Tabla 1: Composición química del cacahuete (Venkatachalam & Sathe, 2006; Tuberoso *et al.*, 2007).

Valor Nutritivo	g	Minerales	mg	Vitaminas	mg
Proteínas	25.60	Calcio	92	Vit. B ₁	0.640
Grasa total	49.20	Potasio	705	Vit. B ₂	0.135
Grasa saturada	6.83	Zinc	3.27	Niacina	16.200
Calorías (Kcal)	567	Fósforo	376	Vit. B ₆	0.348
Hidratos de carbono	7.64	Magnesio	168	Folatos	240
Sodio (mg)	18	Hierro	4.50	Vit. E	9.130

Los cacahuates, presentan un alto contenido nutricional, lo cual debe atribuirse a la presencia de compuestos como: tocoferoles, flavonoides, fitoesteroles, resveratrol, así como un nivel relativamente alto de proteína (Venkatachalam & Sathe, 2006; Tuberoso *et al.*, 2007). **Tabla 1.** El contenido de grasa en los cacahuates se encuentra en el rango del 50-55%, de los cuales, aproximadamente el 30% es ácido linoléico y 45% es ácido oleico. Este último puede volverse rancio por la oxidación de los lípidos. La relación oleico/linoléico, se utiliza actualmente como un índice de estabilidad y de vida útil para la aplicación industrial. Se prevé que el uso del alto contenido del ácido oleico en el cacahuete aumenta su vida de anaquel y por lo tanto mejora la estabilidad oxidativa de sus productos (Isleib *et al.*, 2006).

El cacahuete es la tercera fuente más importante de proteína vegetal, que constituye el 11% del suministro de proteínas del mundo. Debido a que la proteína del cacahuete es vegetal tiene compuestos como fibra y bioactivos tales como la arginina. Estas proteínas se han clasificado tradicionalmente como albúminas (solubles en agua) o globulinas (solubles en solución salina) (Hefle, 1996).

I.2. Importancia económica, producción, consumo mundial y en México.

I.2.1. Producción y consumo mundial.

La producción mundial de cacahuete en 2011 fue de 35.9 millones de toneladas (tons) anuales, que equivale a 25.7 millones de tons de cacahuete sin cáscara; de las que se exporta alrededor de 8.1%. El principal productor de cacahuete en el mundo es China,

con 39% de la producción mundial, seguido de la India, Nigeria y Estados Unidos, con 19.9% y 5%, respectivamente (SIAP, 2011).

El volumen de cacahuate que se intercambia a nivel mundial equivale a 2.1 millones de tons sin cáscara; 85% se intercambia, con el grano sin cáscara y sólo el restante 15% se intercambia con cáscara; los principales derivados son pasta y aceite.

Los países que exportan más cacahuate son China (26.8%), India (14.7%), Estados Unidos (14.6%) y Argentina (13.3%). Los países importadores de cacahuates y sus derivados son: Holanda (18%), Indonesia (8%), Reino Unido (7%), Rusia, Canadá y México, cuentan con un promedio de 6% y Alemania, con un 5%.

En el 2010 las exportaciones de cacahuates sin tostar ni cocer, alcanzaron 1,141 tons (2.4 millones de dólares), lo que representó un incremento de 31.8% respecto a 2009 que es un 87.5% inferior a lo exportado en el año 2000, en donde se alcanzaron 9,105 tons (DGAPEAS, 2011). Las importaciones en 2010 ascendieron a 112,723 tons (129.8 millones de dólares), 42.5% más que las registradas en 2000. Los países que venden esta oleaginosa en el último año fueron: EEUU, del cual importamos el 51.0%, Nicaragua (26.3%), China (15.2%), Argentina (5.0%) y Brasil (2.0%).

La diferencia entre el precio del cacahuate importado y del exportado se ha incrementado desde el año 2000. En este año el precio de las exportaciones se encontraba un 6.2% por arriba del precio de las importaciones, sin embargo, para el año 2009 la diferencia fue de 125.2 % y en 2010 fue de 86.0%, **Tabla 2**.

Tabla 2: Principales países productores de cacahuates del mundo en 2011 (SIAP, 2011).

País	Producción (Miles de toneladas)	Rendimiento(Ton/Ha)
China	6,100	0.86
India	5,067	3.32
Nigeria	2,783	1.04
Estados Unidos	1,491	2.8
Indonesia	1,000	1.53
Senegal	828	1.08
Sudán	990	0.67
México	137	1.49

La ventaja en precio del cacahuate extranjero ha logrado su penetración en nuestro país, junto con la falta de competitividad del producto mexicano.

Tabla 3. Producción, consumo y comercio mundial de cacahuate en millones de toneladas (USDA., 2011).

CICLO	Sup. Cosecha (mil ha)	Producción	Rendimiento (Ton/Ha)	Importaciones	Exportaciones	Consumo
2005/06	21.7	33.2	1.5	1.9	2.2	32.7
2006/07	20.3	31.0	1.5	1.9	2.4	30.9
2007/08	20.9	32.6	1.6	2.0	2.4	32.3
2008/09	21.4	34.8	1.6	1.9	2.4	33.8
2009/10	20.4	33.4	1.6	1.9	2.4	33.1
2010/11	21.3	35.3	1.7	2.0	2.5	34.7
2011/12	21.3	35.1	1.6	2.0	2.5	34.8

La producción mundial de cacahuate aumentó 12.2% entre el 2005/06 y 2010/11, alcanzando en este último 32.3 millones de tons. El consumo de cacahuate alcanzó en el ciclo 2010/11 las 34.7 millones de tons y ha crecido a un ritmo de 1.1% anual desde hace 10 años (USDA, 2011) **Tabla 3.**

I.2.2. Producción de cacahuate en México.

En México, el cacahuate se cultiva en alrededor de 62,000 hectáreas, con una producción promedio anual de 60,000 tons, y un valor de 653 millones de pesos. Se cultiva principalmente en los Estados de Sinaloa, Puebla, Chiapas, Oaxaca, Chihuahua y Guerrero, que en conjunto acumulan 84% de la superficie dedicada a este cultivo. Sinaloa fue el mayor productor de cacahuate en el país en 2012, al generar 21,122 tons, un 24.7% del total nacional. Este Estado mantuvo el 100% de su producción en zonas de temporal y su liderazgo se debió, a la extensa superficie sembrada, un 29.3% de la superficie total de siembra de cacahuate (DGAPEAS, 2012). La situación de Sinaloa contrasta con la de Chihuahua que es el segundo productor. El cual mantiene prácticamente la totalidad de la

siembra en superficies de riego, y en 2009 tuvo una producción muy cercana a la Sinaloa de 20,566 tons, que representó el 24.1% de la producción nacional. En el año 2000 la producción de cacahuate alcanzó 142,216 tons, y en el año 2006 sufrió una notable caída hasta 68,243 tons lo que representó una reducción de 52%. Posteriormente, la producción se recuperó ligeramente, alcanzando en 2009 las 85,502 tons, lo que significa un incremento de 25.3% respecto al 2006, la superficie cosechada se redujo en 44.0% durante este periodo (DGAPEAS, 2012). Un 97.8% del cacahuate producido en México corresponde al ciclo Primavera- Verano, mientras que sólo el 2.2% corresponde al Otoño-Invierno. La cosecha de temporal es de un 67.9%, mientras que el 32.1% restante se produce en riego, por lo que este cultivo depende en su mayor parte de las condiciones climáticas (DGAPEAS, 2012).

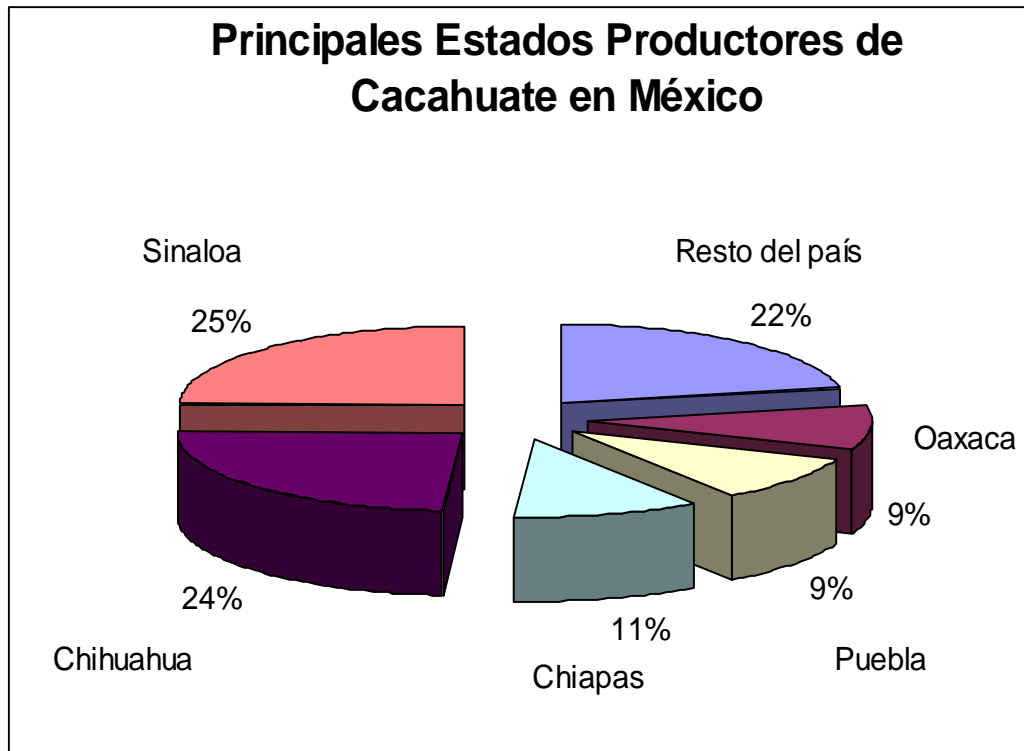


Figura 3: Principales Estados productores de cacahuate en México (DGAPEAS, 2012).

Chihuahua representó un 11.6% de la superficie dedicada a este cultivo a nivel nacional, con altos rendimientos alcanzados por su superficie tecnificada, que alcanzó los 3.2 ton/Ha en 2009, mientras que Sinaloa alcanzó únicamente 1.5 ton/Ha. Chiapas, Puebla y Oaxaca también son importantes productores, en conjunto generaron casi el 30%

de la producción nacional en 2009 (DGAPEAS, 2012). La mayor producción de cacahuete en México fue en 1983 con 170,433 tons. Con una eficiencia de 2.04 ton/Ha, lo cual hoy en día sólo es posible lograr con riego (DGAPEAS, 2012), **Tabla 4**.

Tabla 4: Superficie sembrada, cosechada, producción y rendimiento (ton/Ha) del cacahuete (DGAPEAS, 2012).

Año	Superficie (Miles Ha)		Producción (Miles Ton)	Rendimiento (Ton/Ha)			Precio Medio Rural (pesos)	Valor de la producción. (Millones de pesos)
	Siembra	Cosecha		Riego (R)	Temporal (T)	R+T		
2000	92.7	91.8	142.2	2.43	1.37	1.55	4,774.0	678.9
2001	80.2	79.4	119.5	2.55	1.33	1.51	4,983.3	595.6
2002	64.0	62.0	74.6	2.49	1.03	1.20	4,407.4	329.0
2003	50.7	50.2	91.6	2.95	1.63	1.82	4,672.5	428.1
2004	67.2	65.5	98.9	2.52	1.36	1.51	5,504.7	544.6
2005	65.5	48.0	72.9	2.80	1.23	1.52	5,346.4	389.5
2006	45.7	44.9	68.2	2.77	1.35	1.52	5,680.9	387.7
2007	54.2	52.2	82.8	2.49	1.45	1.59	6,228.9	515.8
2008	53.1	52.0	80.7	2.73	1.39	1.55	6,874.2	552.8
2009	55.5	51.3	85.5	2.87	1.39	1.67	7,958.4	680.5
2010	54.2	51.9	86.6	N/D	N/D	1.67	N/D	N/D

N/D. No hay datos

1.2.3. Consumo de cacahuete en México.

El consumo de cacahuete en México es de alrededor de 160,000 tons anualmente: 145,000 tons se destinan al consumo humano; 6,000 tons, al procesamiento industrial; 8,000 tons, a otros usuarios y 1,000 tons, a semilla para siembra (SIAP, 2011).

1.2.4. Exportación de cacahuete.

Las exportaciones que realiza México de alrededor de 11,000 tons se destinan principalmente a Estados Unidos, y las importaciones, que promedian 111,000 tons anuales, provienen de varios países como Estados Unidos, China, Nicaragua, Argentina y en menor medida de Brasil, India y Paraguay.

En 2010 México exportó el 99.9% de su cacahuate a Estados Unidos y el 0.1% restante a Perú y a Honduras. El rendimiento ha crecido paulatinamente, alcanzando hoy en día un promedio de 1.67 tons por hectárea, lo que representa 428 Kg más por unidad sembrada que hace veinte años. La balanza comercial del cacahuate presentó entre los años 2000 y 2010 cifras negativas a tasas crecientes, debido a la tendencia a la baja de las exportaciones y al incremento en las importaciones. Ya que en el año 2000 se importó un 37.3% del consumo, para el año 2010 se importó el 56.9% (DGAPEAS, 2012).

I.3. Micotoxinas

Las micotoxinas son metabolitos secundarios tóxicos, son moléculas relativamente pequeñas ($P_m < 700$) (Frisvad *et al.*, 2007; Soriano, 2007). Las Aflatoxinas (AF) químicamente corresponden a bis-dihidro-furanocumarinas, producidas por varios hongos filamentosos que se desarrollan en productos vegetales y pueden contaminar diversos sustratos, incluyendo los alimentos, que al ser ingeridos por humanos y animales causan una respuesta tóxica denominada *micotoxicosis* (Vaamonde, 1995; Gilbert, 2002; Binder 2007), además de causar pérdidas económicas en las cosechas de granos (García & Heredia, 2006).

Los hongos utilizan para su crecimiento una serie de sustancias químicas denominadas metabolitos primarios, como son los ácidos nucleicos, proteínas, carbohidratos y lípidos principalmente, y su uso se asocia con la fase exponencial de rápido crecimiento. Los metabolitos secundarios son una serie de compuestos que no son esenciales para el crecimiento y fisiología del organismo productor (Soriano 2007; Vaamonde, 1995), y dentro de este grupo, se encuentran los antibióticos y las micotoxinas. Las micotoxinas se suelen formar cuando la fase de crecimiento de las especies fúngicas micotocógenas llega a su etapa final y al principio de la fase estacionaria (Soriano, 2007).

Al aislar los metabolitos producidos por el hongo, se detectaron unos compuestos fluorescentes, los cuales se demostró por estudios con animales, que tenían efectos tóxicos que variaban con la dosis suministrada.

En Rusia, en 1932, hubo una micotoxicosis por tricotecenos con una mortalidad del 60% ligada a la presencia de *Fusarium sporotrichioides* Sherb. y *F. poae* (Pk.) Wr. en granos enmohecidos de cereales, y que provocó la muerte de millones de rusos de Siberia y del distrito de Orenburgo. En sus orígenes se confundió con la escarlatina, difteria,

pelagra e incluso escorbuto, pero fue hasta 1943 cuando el gobierno ruso lo nombró como Aleucia Tóxica Alimentaria (ATA) (Joffe, 1950).

I.3.1. Generalidades de Aflatoxinas

En 1960 Inglaterra importó harina de cacahuete de Brasil, y su ingestión causó la muerte a 100 000 pavos, patos y otros animales domésticos, a causa de una enfermedad conocida como “Enfermedad X de los Pavos”, por toxinas de *Aspergillus flavus* (D’Mello & MacDonald, 1997; Jaimez *et al.*, 2000; Soriano, 2007).

Estas toxinas, se denominaron “Aflatoxinas” con poder cancerígeno. Las cuatro AF principales se denominaron B₁, B₂, G₁ y G₂. De éstas, la B₁ y la G₁ se presentan con mayor frecuencia y en mayores cantidades. Cuando se iluminan con luz ultravioleta, las AFs B₁ y B₂ presentan una fluorescencia azul (= **Blue**) y las AFs G₁ y G₂ una fluorescencia verde (= **Green**), de ahí su designación como AFs B y G (Carrillo, 2003).

Los estudios realizados sobre los efectos de estas toxinas, demuestran que son hepatotóxicos y cancerígenos muy potentes y sus efectos, además de variar con la dosis, dependen también del tiempo de exposición, la especie animal, la edad, la dieta y el estado nutricional de los animales naturalmente afectados o bajo experimentación (Papp *et al.*, 2002; Arzandeh *et al.*, 2010).

Las especies de hongos tales como *Aspergillus*, en particular *A. flavus* y *A. parasiticus*, (Li *et al.*, 2009) pueden crecer en los productos agrícolas, especialmente en regiones cálidas y húmedas, y son un blanco potencial para la producción de las AFs (Han *et al.*, 2010).

Las AFs se han encontrado en gran número de semillas, en especial, cacahuete, semilla de algodón, trigo, maíz, frijol, arroz, cacao, nueces, pistaches y almendras, así también en los productos de su procesamiento y en las secreciones y excreciones de los animales alimentados con estos tipos de alimento (Cervino *et al.*, 2008).

La contaminación en los alimentos tales como arroz, cacahuete y especias, especialmente chile, es algo generalizada. El arroz, es uno de los alimentos más consumidos en el mundo, y es uno de los cultivos menos susceptibles a la contaminación por micotoxinas, mientras que el chile y el cacahuete pueden ser afectados por AFs durante la etapa de pre- o post- cosecha. (Cho *et al.* 2008, O’Riordan & Wilkinson, 2008; O’Riordan & Wilkinson 2009; Reiter *et al.*, 2010; Ellis *et al.*, 1991).

El reglamento (Commission Regulation, 2010) ha establecido que el límite permitido es de 5.0 ng g⁻¹ de AFB₁ y 10.0 ng g⁻¹ para el total de AFs en las especias; 2.0 ng g⁻¹ de

AFB₁ y 4 ng g⁻¹ para el total de AFs en los cacahuates y otras semillas del tipo oleaginosas, además de productos transformados y destinados para el consumo humano.

El límite era de 5.0 ng g⁻¹ y 10.0 ng g⁻¹ de AFB₁ y AFs totales (AFt), respectivamente, para los frutos secos destinados a ser sometidos al proceso de selección u otro tratamiento físico, antes del consumo humano o su utilización como ingredientes de productos alimenticios (Commission Regulation, 2010).

Varios métodos analíticos se han descrito para la determinación de AFs en alimentos; la principal, es el ensayo inmunoenzimático de ELISA (O'Riordan &Wilkinson, 2009), la cromatografía de capa fina (Stroka *et al.*, 2000), cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Herzallah, 2009; Quinto *et al.*, 2009; Khayoon *et al.*, 2010), cromatografía líquida de ultra alta resolución (UPLC) (Fu *et al.*, 2008) y la electroforesis capilar (Peña *et al.*, 2002). Para la técnica de HPLC, la detección por fluorescencia es útil debido a su buena sensibilidad, mientras que la espectrometría de masas (MS) es excelente para la confirmación (Frenich *et al.*, 2009).

I.3.2. Estructura química

Las AFs son difuranocumarinas que se producen por *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus* mediante una vía policétido (Turner *et al.*, 2009). Las AFs poseen una estructura de derivados policíclicos a partir de un núcleo de cumarina conectada a un sistema bi-furano, **Figura 4**. La serie B de AFs están unidas a una pentanona; mientras que las AFs de la serie G, están unidos a una lactona de seis miembros. Las AFs son muy solubles en disolventes moderadamente polares, tales como cloroformo, metanol y dimetilsulfóxido y poco soluble en agua. La AFB₁ es la más toxica para los mamíferos que induce efectos mutagénicos, teratogénicos y los efectos hepatotóxicos (Nakai *et al.*, 2008).

Basado en la clasificación proporcionada por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC), la AFB₁, ha sido clasificada como cancerígeno del Grupo 1 probado para humanos (IARC, 2002).

El nombre sistemático de la Aflatoxina G₁ (AFG₁), es el siguiente: 1-ciclopenten-4-ácido, carboxílico [2-(3a, 8a-dihidroxi-6-metoxi-furano 2,3-b) bezofuran-5-il]-5-oxo. Su nombre sistemático, es el siguiente: di-o-lactona del ácido malónico [1-(3a, 8a-dihidro-4-hidroxi-6-metoxi-furo [2,3b] benzofuran-5-il)-3-hidroxiopilden].

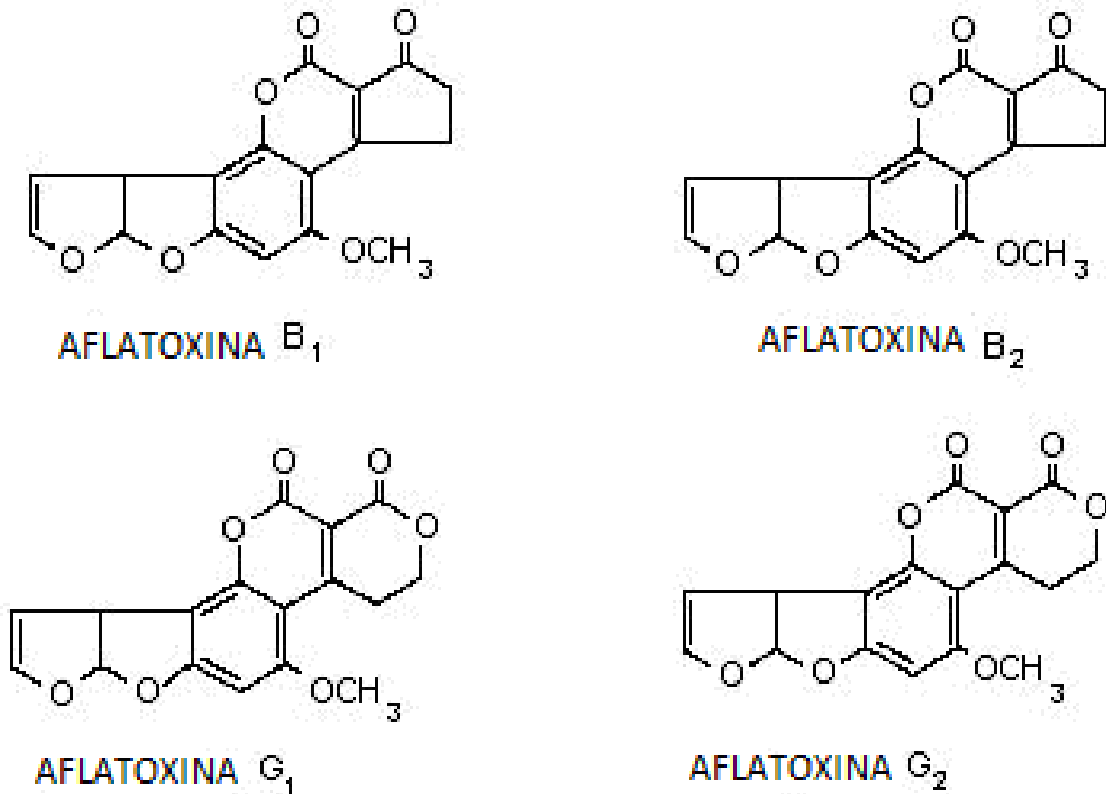


Figura 4: Estructuras químicas de las Aflatoxinas (Soriano, 2007).

Las AFB₂ y AFG₂ son los productos de la reducción de las AFB₁ y AFG₁ en las posiciones 2-3 del anillo de furo-furano.

Se han aislado también, de cultivos de *A. flavus*, dos derivados hidroxilados de las AFB₁ y AFG₁, en la posición dos denominada AFB_{2a} y AFG_{2a}.

I.3.3. Propiedades fisicoquímicas

Las AFs presentan características diferentes, tanto en su peso molecular, sus puntos de fusión y principalmente los niveles de emisión que tienen cada una de ellas, como se puede observar en la **Tabla 5**. Se conocen actualmente, dieciocho compuestos, sin embargo, las AFB₁, B₂, G₁ y G₂ son los comunes en la naturaleza (Oga, 1996) y se nombran según su fluorescencia que emiten cuando se exponen a la luz ultravioleta (B=azul y verde=G). Las AFs son estables a altas temperaturas, el punto de fusión de la AFB₁ es de 269 °C y se desactivan mediante tratamientos en autoclave, en la presencia de amonio y por tratamiento con hipoclorito (WHO, 1979).

Presentan un bajo peso molecular, son poco solubles en agua, y altamente solubles en disolventes moderadamente polares, tales como cloroformo, metanol y dimetilsulfoxido (WHO, 1979), (Tabla 5).

Tabla 5: Fórmulas, peso molecular y propiedades fisicoquímicas de las aflatoxinas (OPS, 1983).

Aflatoxina	Formula molecular	Peso molecular	Punto de fusión	Absorción 360-362 nm	Emisión de fluorescencia (nm)
B₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	312	268-269	21,800	425
B₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	314	286-289	23,400	425
G₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328	244-246	16,100	450
G₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330	237-240	21,000	450
B_{2a}	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330	240	20,400	-
G_{2a}	C ₁₇ H ₁₆ O ₈	346	190	18,000	-

I.3.4. Efectos en la salud animal y humana.

Las AF, especialmente AFB₁, afectan directamente a la calidad del cacahuate y sus derivados utilizados en el consumo de alimentos en animales y humanos. Las AFs son toxinas cancerígenas, teratogénicos e inmunosupresores (Turner *et al.*, 2000; Wild & Turner, 2002; Yu *et al.*, 2002; Hall & Wild, 2003; Benedetti *et al.*, 2005). Después de la ingestión, estas toxinas son absorbidas en el tracto gastrointestinal, y se biotransforma en el hígado por las enzimas microsomales del citocromo P450, la creación de la forma activa de la AFB₁ (AFB₁ epóxido), que es capaz de afectar el metabolismo de los ácidos nucleicos, como el ADN y el ARN, y la síntesis de proteínas. La unión covalente de las AFs es el resultado de una disminución tanto del ADN y las tasas de síntesis de RNA en el hígado. La inhibición de la síntesis de proteínas no es tan rápida o extensa que la de los ácidos nucleicos (Roebuck *et al.*, 1991).

El grado de toxicidad decreciente es AFB₁>AFG₁>AFB₂>AFG₂, indica que la fracción terminal de furano de AFB₁ es el punto crítico para determinar el grado de actividad biológica de este grupo de micotoxinas (Chiavaro *et al.*, 2001).

En el hombre la AFB₁ tiene un papel importante en la etiología del cáncer hepático, sobre todo en individuos que tuvieron el virus de la hepatitis B (VHB) y que son

portadores del antígeno del VHB. Finalmente, las AF se han asociado con desórdenes en el crecimiento, como enanismo en niños (Guzmán de Peña, 2007).

Los efectos de las AF “*in vivo*”, varían de acuerdo a la dosis, tipo de AF, la exposición y la edad del animal, su dieta y estado nutricional, **Tabla 6**.

Las AF pueden causar toxicidad aguda, cuando se administran en grandes dosis, las dosis subletales producen toxicidad crónica y los niveles bajos y prolongados de exposición resultan con respuestas cancerígenas en muchos animales. Estos compuestos se ingieren con alimentos de animales y del hombre (Aycicek *et al.*, 2005)

Como efectos en el sistema inmunitario, la AFB₁, provoca una hipoplasia del timo y una depleción de los timocitos (leucocitos inmaduros del timo), mientras que la Ocratoxina A, provoca una necrosis del tejido linfático, que tiene una función inmunológica diferente a la del timo.

Del elevado número de micotoxinas, las AF son las más estudiadas. Producidas esencialmente por *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus*.

Las AF, también infectan el organismo de varios animales, por lo que la dosis letal medial DL₅₀, varía, en un rango de 0.3 a 10 µg Kg⁻¹ (**Tabla 6**), mientras que para los seres humanos, el rango varia de 0.54 a 1.62 µg Kg⁻¹ (Wild & Gong, 2010).

Tabla 6: DL₅₀ (µg Kg⁻¹) dependiendo la especie animal (Soriano, 2007).

Especie	DL ₅₀ (µg Kg ⁻¹)
Conejo	0.30
Pato	0.43
Gato	0.55
Cerdo	0.60
Trucha	0.80
Perro	0.5-1
Oveja	1-2
Pollo	6.30
Rata	5.50-17.90
Ratón	9

Existen estudios epidemiológicos, donde se muestra que la exposición a las AF contribuye a la formación de cáncer de hígado (Chung *et al.*, 2009; Lui y Wu, 2010; McMahon *et al.*, 1986; Smela *et al.*, 2002).

La contaminación por AF es el principal problema de seguridad alimentaria de los cultivos, especialmente de materias primas que se producen en climas tropicales y subtropicales, en los países donde la alta temperatura y la humedad promueven el crecimiento y la proliferación de *Aspergillus spp.* Una serie de encuestas se han llevado a cabo para identificar un patrón general aflatoxicogénico y la contaminación por AF en los cultivos susceptibles. Las AF se encuentran con frecuencia en el arroz (Bansal *et al.*, 2011; Makun *et al.*, 2011), cacahuete (Shank *et al.*, 1972), frijoles (Pitt *et al.*, 1994), hierbas y especias (Candlish *et al.*, 2001; Colak *et al.*, 2006; Cho *et al.*, 2008; Adzahan *et al.*, 2009), chiles (Paterson, 2007; Ravi *et al.*, 2005), y frutos secos (Shenasi *et al.*, 2002; Trucksess y Scott, 2008).

Hoy en día, parece que las AF se han convertido en un problema crónico, no sólo en los países tropicales y subtropicales sino también a todo el mundo debido al aumento del comercio mundial y el transporte de productos alimenticios entre los países que dan lugar a la presencia del molde y / o sus toxinas en estos productos. Para gestionar este riesgo, más de un centenar de países han establecido regulaciones para limitar el contenido de micotoxinas en los alimentos y los productos agrícolas (Van Egmond, 2002; Van Egmond *et al.*, 2007).

La agencia internacional para la investigación sobre el cáncer, clasificó a las AF, en el Grupo 1 como cancerígenos probados de humanos (Ventura *et al.*, 2006; Cavaliere *et al.*, 2007;). En el Reino Unido, los reglamentos relativos a las AF en los alimentos están armonizados con el reglamento de la Comisión Europea (EC, 2006b) de los cuales los límites máximos de AFB₁ y AFt que son la suma de AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂ se establecieron en los productos alimenticios específicos que van desde 2 a 12 µg Kg⁻¹ de AFB₁ y 4 a 15 µg Kg⁻¹ de AFt. La Organización para la Alimentación y la Agricultura (FAO) de las Naciones Unidas y el programa de la Organización Mundial de la Salud (OMS) sobre normas alimentarias adoptaron un nivel de 15 µg Kg⁻¹ de AF en los cacahuates sin procesar (CAC, 2001). Para el caso de México, se había establecido la Norma Oficial Mexicana NOM-188-SSA1-2002, donde el límite de tolerancia permitido para AF en cereales de consumo humano y alimentos era de 20 µg Kg⁻¹ de AFt. Sin embargo, a partir de 2013 dejó de aplicarse toda la legislación que protegía a los mexicanos contra las aflatoxinas en aras de un comercio internacional más fluido y con todos los riesgos que esto implica para la salud de los mexicanos.

I.3.5. Aflatoxinas en cacahuete.

El cacahuete es una de las especies huésped más susceptibles a los hongos *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus*, organismos productores de AFs. Las AF son metabolitos de bajo peso molecular e inducen diferente grado de toxicidad a vertebrados, invertebrados, plantas y microorganismos (Jones *et al.*, 2009; Guo *et al.*, 2009).

El suelo es la principal fuente de contaminación por *A. flavus* y *A. parasiticus*, y como el cacahuete se desarrolla bajo tierra, las vainas están en contacto directo con la población de hongos del suelo (Horn & Dorner, 1998).

El hongo infecta granos de cacahuete en condiciones de sequía antes de la cosecha. La contaminación también puede ocurrir después de la cosecha de los cacahuates, ya que si no se cortan rápidamente, se secan y se mantienen en un nivel de humedad seguro, o durante el almacenamiento, cuando las condiciones de humedad y temperatura son inadecuadas (Cole *et al.*, 1995).

La elevada concentración de AF es un problema para la calidad del cacahuete en todo el mundo, generando graves consecuencias en la salud de los seres humanos y para el ganado (Bhat & Vasanthi, 2003; D'Mello, 2003; Gong *et al.*, 2003; Waliyar *et al.*, 2003). Los granos de cacahuete actúan como buen sustrato para el crecimiento de moho cuando el contenido de humedad, temperatura y tiempo son óptimos para su crecimiento. El aumento de la contaminación por AF puede ocurrir en toda la cadena de producción (Mehan *et al.*, 1991), en el campo, formación del fruto, cosecha, secado, transporte, almacenamiento, así como durante la manipulación (Giray *et al.*, 2007), el procesamiento y la distribución (Bastianelli & Le Bas, 2002; Waliyar *et al.*, 2003).

Los hongos causan la decoloración, olor desagradable y la alteración en el valor nutricional de los cacahuates. La actividad de agua del sustrato también juega un papel importante en el crecimiento del hongo, ya que se define como la relación entre la presión de vapor de un alimento (Ej. cacahuete) en relación con la presión de vapor del agua pura bajo las mismas condiciones de temperatura (Pitt, 1997).

El crecimiento de hongos toxicogénicos requiere de una actividad de agua mínima, en rangos de 0.78 a 0.80. Mientras que el valor, para que no exista crecimiento de hongos se observa generalmente por debajo de 0.60 (Atayde *et al.*, 2012). La contaminación de los cacahuates con AFs es uno de los principales factores que comprometen la calidad del producto.

El impacto económico, generado por la invasión del hongo, incluye la reducción de las tasas de germinación de semillas y la calidad del producto. Una gran cantidad de cacahuates, con niveles excesivos de contaminación no se pueden utilizar para el consumo humano y por lo tanto representan grandes pérdidas económicas para la industria del cacahuate (Lamb & Sternitzke, 2001).

El control de AF en cacahuate se basa en varios criterios, tanto en pre-cosecha (buenas prácticas agrícolas (BPA), el riego y el uso de variedades resistentes a la sequía), o por métodos de post-cosecha (buenas prácticas de fabricación (GMP) y de manufactura (BPM), el análisis de riesgos y puntos críticos de control (HACCP) en las industrias), finalmente por clasificación de dispositivos electrónicos y palidez (Dorner, 2008). En la **Figura 7** se observa al hongo *Aspergillus parasiticus* y una muestra de cacahuate contaminado por él. Las BPA y BPM son herramientas para controlar las fuentes de contaminación y asegurar que los cacahuates y sus productos tengan los estándares de calidad y seguridad (CAC, 2004; Castilho *et al.*, 2009).

Estos procedimientos son caros y no siempre eficaces. El control biológico reduce la contaminación de AF antes de la cosecha, y utiliza cepas del hongo no toxicogénicas (Dorner & Cole, 2002). Cuando muchas esporas de las cepas de hongo no toxicogénicas se añaden al suelo, compiten con las cepas toxicogénicas por los sitios de infección y por los nutrientes esenciales en los cacahuates y tienen un efecto de arrastre y protegen de la contaminación durante el almacenamiento de los cacahuates (Dorner & Cole, 2002).

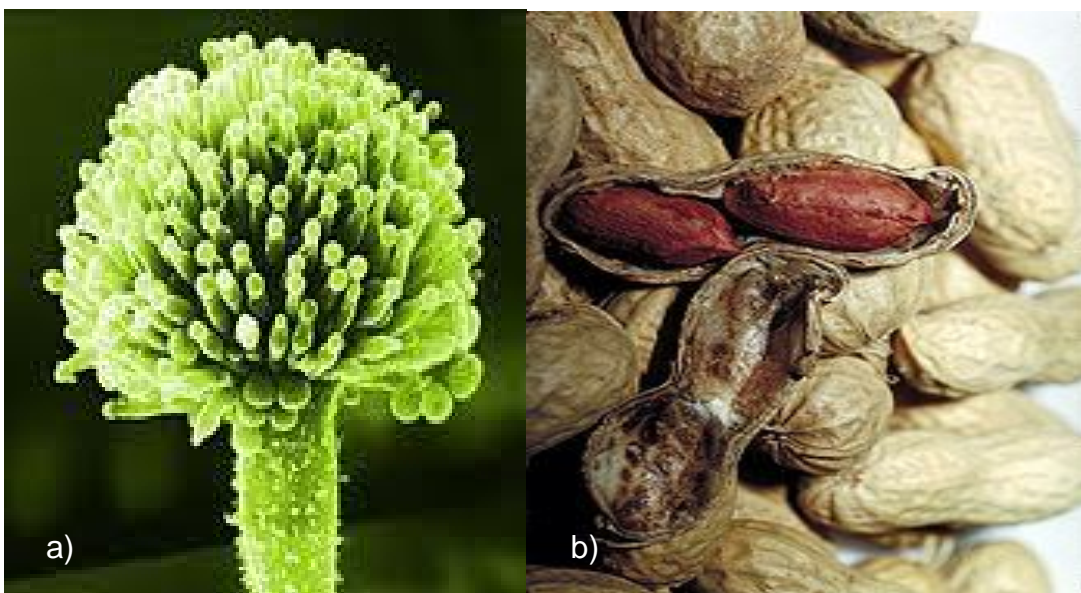


Figura 5. (a) Imagen del hongo *A. parasiticus* al microscopio. b) Cacahuate contaminado por *A. parasiticus*

II. HIPÓTESIS

El cacahuete es un cultivo altamente susceptible a la contaminación por AFs a nivel mundial, por tanto es posible que exista una contaminación apreciable en México, y que se pueda determinar su contribución al aporte de cancerígenos a la dieta del hombre en este país.

III. OBJETIVOS

III.1. Objetivo General

1. Identificar y cuantificar las AF (B_1 , B_2 , G_1 y G_2) de 48 muestras de cacahuete nacionales y 10 muestras del extranjero (de Estambul, Turquía, y Bophal, India).

III.1.2. Objetivos Particulares

- a. Obtener muestras de 50 g de cacahuete natural de tres los mercados más representativos de las 16 Delegaciones del D.F.
- b. Validar la técnica de extracción y cuantificación por Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (HPLC), por los parámetros de linealidad, selectividad, porcentaje de recuperación, límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ).
- c. La concentración y purificación de estas toxinas mediante columnas de inmunoafinidad con anti-aflatoxinas totales, y la cuantificación e identificación por HPLC.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

Se desarrollaron varios métodos para determinar AFs en alimentos: técnicas de inmunoensayos (Li *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2004), electroforesis capilar (Peña *et al.*, 2002), cromatografía en capa fina (Braicu *et al.*, 2008). Algunas técnicas analíticas, tales como la cromatografía de capa fina (TLC) (Trucksess *et al.*, 1984; Stroka *et al.*, 2000), la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Manetta *et al.*, 2005; Giray *et al.*, 2007), cromatografía en capa fina de dos dimensiones (Van Egmond *et al.*, 1991), y por último, el ensayo inmunoenzimático (ELISA) (Saha *et al.*, 2007; Reddy *et al.*, 2001; Sarimehmetoglu *et al.*, 2004).

Recientemente, los métodos analíticos, basados en la limpieza con columnas de inmunoafinidad y HPLC con derivatización post-columna y fluorescencia, han ganado mucha atención para la terminación de AFs en matrices de alimentos (Daradimos *et al.*, 2000).

El objetivo de este estudio fue desarrollar un método rápido, preciso y confiable para el análisis de AFs en cacahuates. El método propuesto con la columna de inmunoafinidad, derivatización y HPLC con detección por fluorescencia, fue validado en términos de selectividad, linealidad, límites de detección y de cuantificación, y porcentaje de recuperación (Muscarella *et al.*, 2007; Tavcar-Kalcher *et al.*, 2007).

IV.1. Muestreo

IV.1.1. En el Distrito Federal

Se realizó un muestreo representativo de los tres principales mercados cada una de las 16 Delegaciones del Distrito Federal, en la Ciudad de México. Se hizo un estudio de los mercados más representativos que se encontraban en las Delegaciones, comprando 50 g de cacahuete natural.

En la **Tabla 7**, se presentan las Delegaciones, fechas y mercados donde se realizó el muestreo.

Tabla 7: Muestreo de cacahuete de 48 mercados de las 16 Delegaciones de la Ciudad de México en 2012.

Nº de muestra	Año 2012	Delegación	Mercado
1	30/ago	Álvaro Obregón	Melchor Múzquiz: Av.Revolución Col. San Angel, 01000 México, DF
2			Olivar del Conde: Agustin Lara y Ernesto P. Uruchurtu,Col. Olivar del Conde, 01400 México D.F.
3			Corpus Christi: San Luis,Corpus Christi, 01530 México D.F.
4	19/sep	Azcapotzalco	Azcapotzalco: Azcapotzalco S/N, Centro de Azcapotzalco, 02000 México, D. F.
5			Prohogar: Eje 1 poniente (calzada vallejo). Num 12, Pro Hogar (Azcapotzalco, 02600 México, D.F.
6			Nueva Santa María: Av. Camarones, Nueva Santa María, Azcapotzalco, 02800 México, D.F.
7	30/ago	Benito Juárez	De Mixcoac: Revolución SN, Col. Mixcoac 03849 México D.F.
8			Portales: Santa Cruz S/N Col. Portales C.P. 03300 México, D.F.
9			Independência: Eje 6 Sur e Independência, Col. Independência 03630 México D.F.
10	29 /ago	Coyoacán	Ajusco-Moctezuma: Mixtecas 92, Col. Ajusco,04300Méx. DF
11			Santo Domingo Las Rosas: Papalotl, Col. Pedregal de Sto Domingo, 04369 México,DF
12			De Coyoacán: Ignacio Allende, Col. Del Carmen, 04100 México, DF
13	13/sep	Cuajimalpa	Contadero: Av. 16 de Septiembre esq. Mariano Escobedo. Col. Loma de la Papa. 05088 México D.F
14			Rosas Torres: Calle San José de los Cedros esquina con Sauce. Col. San José de los Cedros. 05200 México D.F.
15			Cuajimalpa: Av. Veracruz esquina con Ocampo. Col. Manzanito. 05040 México D.F.
16	6/sep	Cuauhtémoc	Hidalgo: Dr. Balmis. Col, Obrera, 6800. D.F
17			Arcos de Belén: Arcos de Belén esquina con Dr. Valenzuela. Col. Centro.06010 México D.F.
18			San Juan: Calle Ernesto Pugibet 71. Col. Centro.06010 Méx. DF.
19	19/sep	Gustavo A. Madero	Río Blanco: Col. Mártires de Río Blanco Gustavo A. Madero, México D.F. 07880
20			De la Estrella: Joyas, La Estrella, Gustavo A. Madero, 07810 Méx. DF
21			Martín Carrera: José J. Herrera, Martín Carrera, Gustavo A. Madero, 07070 DF.
22	26/sep	Iztacalco	San Miguel Iztacalco: Calle Julio García. Col Barrio de San Miguel.08650
23			Tlacotal: Calle Oriente y Sur 123, Col Gabriel Ramos Millán. 08730, DF
24			Santa Anita. Eje 1 oriente. Av. Andrés Molina Enríquez, Col Viaducto Piedad. 08200
25	26/sep	Iztapalapa	Central de Abastos: Eje 6 Sur Esq. Río Churubusco. Col Central de Abasto. 09040
26			Santa Cruz Meyehualco: Calle 55 Esq. Calle 4, Col. Santa Cruz Meyehualco. 09290
27			Jacarandas: Calle Manlio Fabio Altamirano. Col. Jacareadas 09280 DF

Tabla 7: Continuación.

28	12/sep	La Magdalena Contreras	Cerro del Judío: Av. San Bernabé Esq. con Independencia. Col. Barros Sierra. 10380 México D.F.
29			La Loma: José Moreno Salido Esq. con Fresno. Col. Pueblo Nuevo Bajo. 10640 México D.F.
30			Turístico “La Magdalena”: Magdalena esq. Emilio Carranza. Col. Rancho Totolapan. 56580 México D.F.
31	12/sep	Miguel Hidalgo	Tacubaya: Arquitecto Carlos Lazo esq. con Arq. Luis Ruiz. Col. Observatorio.11860 México D.F.
32			Plutarco Elías Calles, “El Chorrillo”: Melchor Muzquiz esq. Parque Lira. Col. San Miguel Chapultepec.11850 México DF
33			Argentina: Lago Atitlan Esq. con Lago Viedma. Col. México Nuevo. 11260 México D.F.
34	5/sep	Milpa Alta	San Antonio Tecómitl: Calle 5 mayo Col. San Antonio Tecómitl 12100 México, D.F.
35			Villa Milpa Alta: Yucatán sur Col. Villa Milpa Alta 12000 México DF
36			San Pedro Actopan: Francisco I. Madero Col. San Pedro Atocpan. 12200 México D.F.
37	27/sep	Tláhuac	Colonia del Mar: Calle Camarón, Colonia del Mar, Delegación Tláhuac. D.F. C.P. 13270
38			Mercado de la Nopalera: Calle Falsta. Col. La Nopalera, Delegación Tlahuac. D.F. 13220
39			Mercado Tlahuac: Gral Severino Cisnero, Col. La Magdalena. 13070 DF
40	6/sep	Tlalpan	Tlalcoligía: Cristóbal Colón Col. Tlalcoligía. 14430 México D.F.
41			Torres de Padierna: Calle Tixpehual Col. Torres de Padierna 14209 México D.F.
42			De la Luz: Calle Francisco I. Madero Col. Tlalpan Centro 14000 México DF.
43	20/sep	Venustiano Carranza	La Merced: General Anaya S/N, Merced Balbuena, V. Carranza, 15810 Ciudad de México, D.F.
44			Jamaica Guillermo Prieto 45 Depto C-15, Jamaica, 15800 Venustiano Carranza, D.F.
45			San Ciaprían. Dulcería Hidalgo Esq. General Anaya con Juan de la Granja, DF
46	5/sep	Xochimilco	De Xochimilco: Calle Morelos, Col. El Rosario, 16070 Méx. DF
47			San Gregorio Atlapulco: Belisario Domínguez.16600 Méx.DF
48			Tulyehualco: División del Norte, Col. Santiago Tulyehualco, 16700 México D.F.

IV.1.1. Muestreo en el extranjero

Se realizó un muestreo al azar de 8 muestras de cacahuete provenientes del mercado de Estambul, en Turquía y 2 muestras con 50g del mercado de Bophal, en India. (Tabla 8).

Tabla 8. Muestras extranjeras

País	Mercado	Muestras
Turquía	Estambul	1a, 1b, 1c, 1d, 1e, 1f, 1g, 1h
India	Bophal	2a y 2b

IV.2. Preparación de las muestras.

Se etiquetaron y pesaron las muestras tanto nacionales como del extranjero.

IV.2.1. Extracción química de las AF del cacahuete.

Se molieron 25 g de cacahuete en una licuadora (Jump Start Juicer modelo CDE-38), con 50 mL de una mezcla de MeOH:H₂O (80:20 v/v) (MeOH J.T. Baker N° Cat 67-56-1) y 1 g de cloruro de sodio (Cloruro de Sodio N° Cat. 3624-19 NaCl 400.0 g) para obtener una muestra homogénea, se filtraron por decantación los extractos de las 48 muestras nacionales y de las 10 muestras extranjeras. En la extracción, se utilizó un buffer de fosfatos (PBS), preparado con los reactivos presentados en la **Tabla 9**.

Tabla 9. Reactivos de la solución amortiguadora de fosfatos (PBS).

Reactivo	Marca J.T. Baker	Fórmula	Cantidad
Cloruro de potasio	N° Cat 3040	KCl	10.0 g
Fosfato de potasio monobásico	N° Cat 3246-20	KH ₂ PO ₄	10.0 g
Fosfato de sodio monobásico hidrogenado	N° Cat.3818-01	Na ₂ HPO ₄	58.0 g
Cloruro de sodio	N° Cat. 3624-19	Na Cl	400.0 g
Azida sódica	N° Cat. V01	Na N ₃	2.5 g
Agua destilada		H ₂ O	Aforar a 5L

Se utilizaron 20 mL de solución amortiguadora de fosfatos ajustada a un pH de 7.4, para acondicionar las columnas de inmunoafinidad, las cuales contienen un gel de agarosa con anticuerpos anti-aflatoxinas totales (α -AFB₁, α -AFB₂, α -AFG₁, α -AFG₂) que purifican y concentran a estas toxinas por una reacción antígeno-anticuerpo, cuando el

extracto diluido de la muestra pasa por ellas y dan la seguridad de que el compuesto eluido son aflatoxinas puras, pues colorantes, proteínas, lípidos y otros compuestos salen en el lavado de las columnas. El método por columnas de inmunoafinidad tiene un porcentaje de recuperación del 97 al 100% y esto hace que sea muy superior a otros, como el Método de Stoloff que tiene una recuperación del 34%.

Dos mL de cada submuestra pura y filtrada se diluyeron en 14 mL de PBS, y los 16 mL se pasaron por la columna de inmunoafinidad lentamente para que las AFs puedan quedar atrapadas en el gel de agarosa. Posteriormente, se realizó un lavado con 20 mL de agua destilada para eliminar cualquier rastro de colorantes o impurezas en la columna.

Finalmente, se eluyó con 1.5 mL de metanol HPLC, el cual ayuda a separar las AF de los anticuerpos que las tienen atrapadas, y se añade 1.5 mL de agua destilada, regresando el émbolo de la jeringa para romper el gel de agarosa y desprender a las AF. Se obtuvo al final un eluido de 3 mL que se seca a 40 °C en un horno.

IV.3. Derivatización de AF

Se derivatizaron tanto los estándares de las AF, para hacer las curvas de calibración, como los eluidos de las AF de las muestras. En el caso de los estándares de cada AF (B₁, B₂, G₁ y G₂)(Sigma-Aldrich, St. Louis MO, USA) se evaporaron a sequedad y se resuspendieron con 200 µL de acetonitrilo (J.T. Baker N° 75-05-8, Xalostoc, Estado de México) y con objeto de aumentar su fluorescencia se 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., USA) por 30 segundos. Los viales se mantuvieron en un baño María a 65 °C por 10 minutos según describen Akiyama *et al.* (2001) y Kok (1994). Posteriormente se llevaron a temperatura ambiente y se inyectaron 60 µL en el cromatógrafo de líquidos con loop de 20 µL para su análisis. En el caso de las muestras, 1 mL del eluido se evaporó a sequedad, y se resuspendió en 100 µL de ACN, a este volumen se le adicionaron 400 µL de solución derivatizante, se agitó la mezcla por 30 segundos y se continuó calentando como se describió anteriormente

IV.4. Validación del método.

Validación es la confirmación mediante el suministro de evidencia objetiva de que se han cumplido los requisitos para el uso o aplicación de un método analítico (IRAM 32, 1997). El procedimiento de validación se realizó de acuerdo con la AOAC (2000). Para validar se consideraron los criterios de Linealidad (curvas de calibración), Límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ), y el Porcentaje de Recuperación.

IV.4.1. Linealidad ó Curvas de calibración.

a. Solución de un microgramo por mL

El procedimiento de análisis de AFs, partió de una solución estándar de cada una de las AFs a estudiar (AFB_1 , AFB_2 , AFG_1 y AFG_2), se determinó la absorbancia de los estándares utilizando el espectrofotómetro (Genesys 10 UV Termo Electro Corporation UV/Vis).

Para ajustar el equipo, se colocó en una celda de cuarzo, con metanol puro, el cual se utilizó como blanco, posteriormente se midió la absorbancia a 362 nm correspondiente a cada una de las AFs. El principal objetivo que tiene el blanco, es evitar que la absorbancia dada por el solvente interfiera en la señal generada por la absorbancia de la solución estándar. Se obtienen de la siguiente manera:

$$\frac{\text{Absorbancia de AF} \times \text{peso molecular de la AF}}{\text{Coeficiente de extinción de la AF}} = \text{Concentración de } 1 \mu\text{g mL}^{-1}$$

Posteriormente se obtiene el inverso de x ($1/x$), el resultado es la cantidad de AF en microlitros (μL) necesarios para preparar una solución de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cada AF. Las curvas de calibración son la referencia para la medición en el HPLC.

b. Curvas de calibración

Una curva de calibración es la aptitud para obtener resultados proporcionales a la concentración de analito. Para hacer cada curva de calibración se hicieron diez concentraciones (0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0, 16.0, 32.0, 64.0 y 128.0 ng mL^{-1}) a partir de las soluciones patrón o stock de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ de los estándares de AFB_1 , AFB_2 , AFG_1 y AFG_2

por separado. Las curvas de calibración se construyeron graficando las áreas de los picos contra las concentraciones de cada solución estándar de AF.

Los estándares de AF en su vial etiquetado, se disolvieron en una solución de 1 mL de benceno (Merck, Naucalpan, Edo. Mex., México): acetonitrilo (98:2 v/v), de acuerdo a las indicaciones sugeridas por los Métodos Oficiales AOAC 970.43 para micotoxinas (AOAC, 2000) y se homogeneizó en un agitador orbital (Vortex G-560, Bohemia, N.Y., USA). Después se tomó un poco del estándar de AF en benceno/acetonitrilo y se midió la Absorbancia en un espectrofotómetro (Genesys 10 UV Modelo Thermo Electron Corporation, USA). En una celda de cuarzo se colocó metanol como blanco y se ajustó la calibración a cero para que se le reste la absorbancia del mismo a la medición del estándar de AF. Se colocó la solución de AF en metanol dentro de una 2ª celda y se midió la absorbancia en el espectrofotómetro. Se escogió la absorbancia más grande entre 360 y 362 nm siendo esta última la usada para las AF. Se aplicó la fórmula anteriormente mencionada para hacer una concentración de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ de AF. Se evaporó el solvente a sequedad en un horno (Novatech BTC-9100 Houston Texas, USA) para derivatizar la muestra o estándar de AF. Cada solución patrón se calculó con los pesos moleculares y coeficientes de extinción correspondientes a cada AF.

IV.4.2. Selectividad.

Es el grado al cual el método puede determinar al analito, sin interferencia de la matriz. Con el objeto de conocer los tiempos de retención sin que haya interferencia de otros componentes del cacahuate, o sea el análisis de los 4 estándares solos (100 ng de cada AF) y el de la matriz. De las 48 muestras nacionales, se usó la que presentó menor cantidad de AFt, (muestra N° 19), correspondiente a la Delegación Gustavo A. Madero del mercado Río Blanco.

Se pesó un gramo de la muestra N° 19 y se enriqueció con 100 ng de cada una de las cuatro AF (AFB₁ + AFB₂ + AFG₁ + AFG₂) juntas. Se inyectaron 60 μL en el HPLC que lo analizó por triplicado.

IV.4.3. Límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ).

El LOD se calculó por medio de un análisis de regresión de la curva de calibración de la AF correspondiente. El LOQ consiste en preparar una serie de muestras con

cantidades decrecientes de analito y analizar cada una de ellas 6 veces consecutivas, representando CV (%). El LOQ se calcula en alrededor de 5 veces el LOD.

IV.4.4. Porcentaje de recuperación.

Es la eficiencia del método para detectar todo el analito presente en una muestra. Se pesó un gramo de cacahuete sin contaminación (muestra N° 19), para añadirle $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cada una de las AF por separado y se hizo una mezcla de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de los 4 estándares de AF para comparar con los estándares solos (blanco).

Se etiquetaron 4 tubos de centrifuga (Falcón) de 50 mL y se les colocó 1 g de muestra de cacahuete N° 19 con cada AF disuelta en 3 mL de MeOH. A los 4 tubos Falcon con una AF por separado, se les agregó un gramo de NaCl y 2 mL de agua destilada y se centrifugaron (ALC 4235 con sistema de enfriamiento CWS) a 4000 rpm por 15 minutos.

La columna de inmunoafinidad se estabilizó con 20 mL de PBS a un pH de 7.4, después se le hizo pasar los sobrenadantes de la centrifugación diluidos en PBS. Se lavaron las columnas de inmunoafinidad con agua destilada y se eluyeron con 1.5 mL de MeOH grado HPLC y después con 1.5 mL de agua retrayendo el émbolo de la jeringa para romper al gel de agarosa y que hubiera un contacto más completo con los solventes.

Los eluidos se secaron en horno a $40 \text{ }^\circ\text{C}$, se evaporó el solvente a sequedad en un horno (Novatech BTC-9100) para posteriormente derivatizar la muestra o estándar de AF. Se resuspendieron con $200 \mu\text{L}$ de ACN, y se les añadieron $800 \mu\text{L}$ de la solución derivatizante en la forma antes indicada.

Finalmente se inyectaron $60 \mu\text{L}$ en el HPLC por triplicado. Los pesos moleculares y los coeficientes de extinción correspondientes a cada AF se presentan en la **Tabla 10**.

Tabla 10. Pesos moleculares de cada AF

<i>Aflatoxinas</i>	<i>Peso molecular</i>	<i>Coficiente de extinción</i>
B ₁	312	21,800
B ₂	314	24,000
G ₁	328	17,700
G ₂	330	17,100

El porcentaje de recuperación, se obtuvo utilizando las ecuaciones de cada una de las rectas presentadas en las curvas de calibración, en donde **Y** represento al área de las

muestras, **m** a la pendiente y **x** al valor de la concentración, quedando la siguiente ecuación: x (% de recuperación) = y (área de las muestras) / m (pendiente Ej: 2.8299 de AFB₁).

Después de haber obtenido la concentración, se hizo un ajuste al 100% para conocer la cantidad recuperada de las AF en las muestras que se detectaron en el análisis químico.

IV.5. Cuantificación de las AF

IV.5.1. Cromatografía de líquidos (HPLC)

La cromatografía de líquidos (HPLC) da una buena separación, identificación y cuantificación de los analitos en laboratorios de toxicología, química clínica, medicina forense, dopaje, contaminantes ambientales y análisis de alimentos. Hay varios enfoques modernos en los métodos de HPLC que permiten la reducción del tiempo de análisis sin comprometer la eficiencia de la resolución y separación: el uso del monolito de columnas, cromatografía de líquidos a altas temperaturas (Wales, *et al.*, 2008) y la cromatografía ultra alta presión de líquidos (UHPLC) ya sea usando un sub-2 de partícula **m** en columnas de relleno (D'Orazio, *et al.*, 2012) o poroso con columnas de concha (con sub-3 con partículas superficialmente porosas) (Salisbury *et al.*, 2008; Fekete *et al.*, 2011).

Otro enfoque analítico que se ha vuelto muy popular es el uso de otras fases estacionarias tales como la cromatografía de interacción líquido-hidrofílica (HILIC) o fase estacionaria fluorado permitiendo mejor separación de compuestos muy populares y en algunos casos incluso compuestos isoméricos (Gallart-Ayala *et al.*, 2008).

IV.5.2. Cuantificación de AF por HPLC

Se inyectaron 60 μ L de cada muestra, para cuantificar en el HPLC por triplicado. Se obtuvieron las áreas y con base en 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.

Se utilizó un cromatógrafo de líquidos (Series 1200) con bomba isocrática (G1310A Serie DE62957044), detector de fluorescencia (G1321A Serie DE60456380) y auto muestreador (G1329A Serie DE64761666), todos de Agilent Technologies. La columna

cromatográfica Agilent Eclipse XDS- C18, 4.6×250 mm, 5 µm de grosor de partícula, el programa utilizado para HPLC fue ChemStation 32. La fase móvil o solución isocrática para el HPLC se preparó con H₂O/ACN/MeOH (65:15:20 v/v/v) y se filtró al vacío para desgasificarla. Las características de los reactivos fueron: metanol (CH₃OH) (J.T. Baker N° Cat. 9093-03), acetonitrilo (CH₃CN) (J.T. Baker N° Cat. 9017-03) y agua destilada (H₂O_{dest}). Los solventes tuvieron pureza de cromatografía de líquidos (HPLC).

IV.6. Análisis estadístico

Se utilizó el programa estadístico R para realizar la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para determinar si podían existir diferencias entre el contenido de AF en muestras de cacahuete y en las Delegaciones donde fueron conseguidos, de igual manera se llevó a cabo la prueba de rangos de Wilcoxon para determinar si había o no diferencias significativas.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

V.1. Validación del método

Con la recopilación y el análisis de datos obtenidos con la experimentación, se comprobó que el método de detección y cuantificación de AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂ en las muestras de cacahuete de México, Turquía e India por el método de cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC) cumple con los requisitos para el análisis de las muestras.

V.1.1. Linealidad (Curvas de calibración de AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂)

Los tiempos de retención (T_r) y concentraciones de las diluciones de cada AF, sirvieron para formar las curvas de calibración, al conocer los minutos en que salía cada pico, indicando la identificación y cuantificación de las AF por muestra (Tabla 11).

Tabla 11: Concentraciones de AF (ng mL⁻¹) para obtener las curvas de calibración.

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

En la Tabla 12 se compararon los rangos de tiempos de retención, de las curvas de calibración, selectividad y porcentaje de recuperación para determinar el rango adecuado para la identificación de las AF de las muestras.

Tabla 12. Rango de tiempos de retención (T_r) de cada AF obtenido de las pruebas de recuperación, selectividad y de las curvas de calibración.

AF	Curvas de calibración	Selectividad	% de Recuperación	Rango de T_r (min) Utilizado
AFB ₁	7.612-7.886	8.246-8.293	7.537-7.726	7.537 – 8.293
AFB ₂	17.590-17.61	18.205-18.340	18.146-18.454	17.590 – 18.454
AFG ₁	5.710-5.930	6.026-6.050	5.584-5.644	5.584-6.050
AFG ₂	11.353-11.391	12.254-12.336	11.968-11.976	11.353 – 12.336

Una vez obtenidos los tiempos de retención para las cuatro AF, se obtuvieron las gráficas respectivas de concentración del analito y con ellas las curvas de calibración de cada AF.

Las siguientes **Figuras 6 a 9** y **Tablas 13 a16**, muestran las curvas de calibración de cada AF y los parámetros de la regresión lineal.

Curva de Calibración de la AFB₁

Tabla 13: 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	7.886
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	-	-

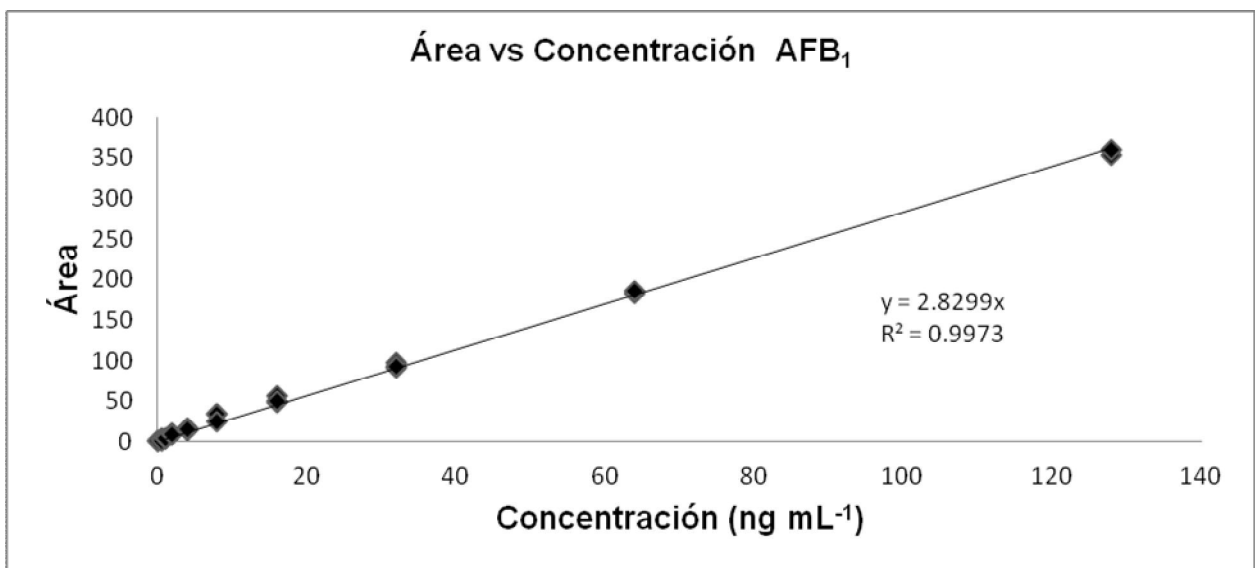


Figura 6. Gráfica de la curva de calibración de AFB₁

Curva de Calibración de AFB₂

Tabla 14: 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

Tr = Tiempo de retención.

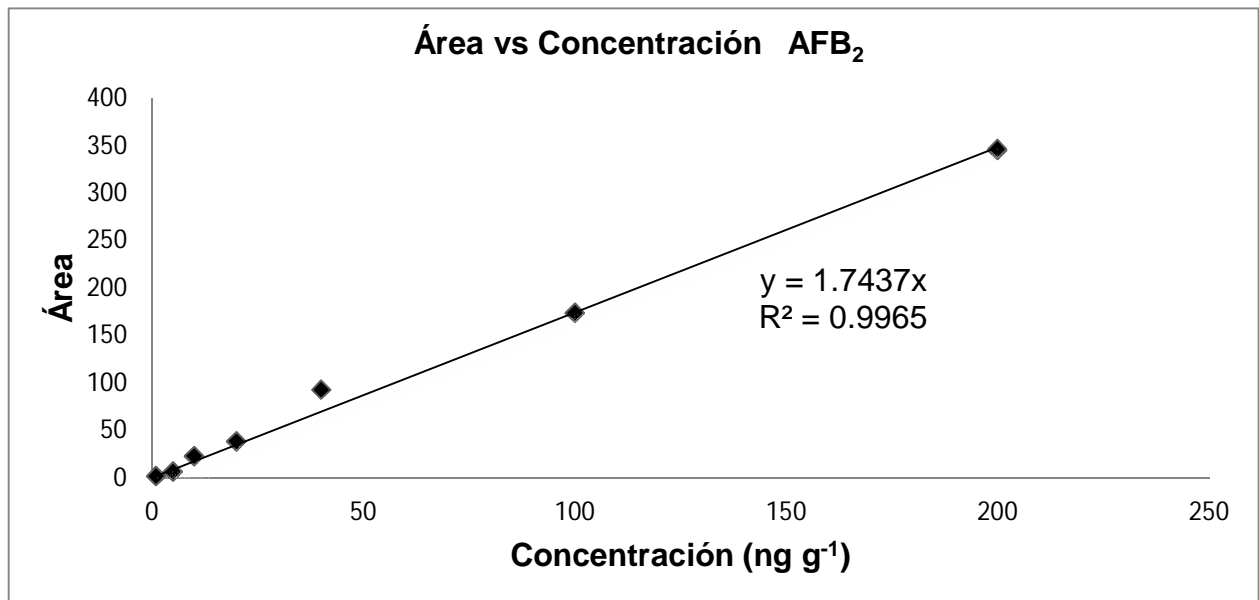


Figura 7. Gráfica de la curva de calibración de AFB₂

Curva de Calibración de AFG₁

Tabla 15: Curva de calibración de AFG₁.

Concentración (ng mL ⁻¹)	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

Tr = Tiempo de retención.

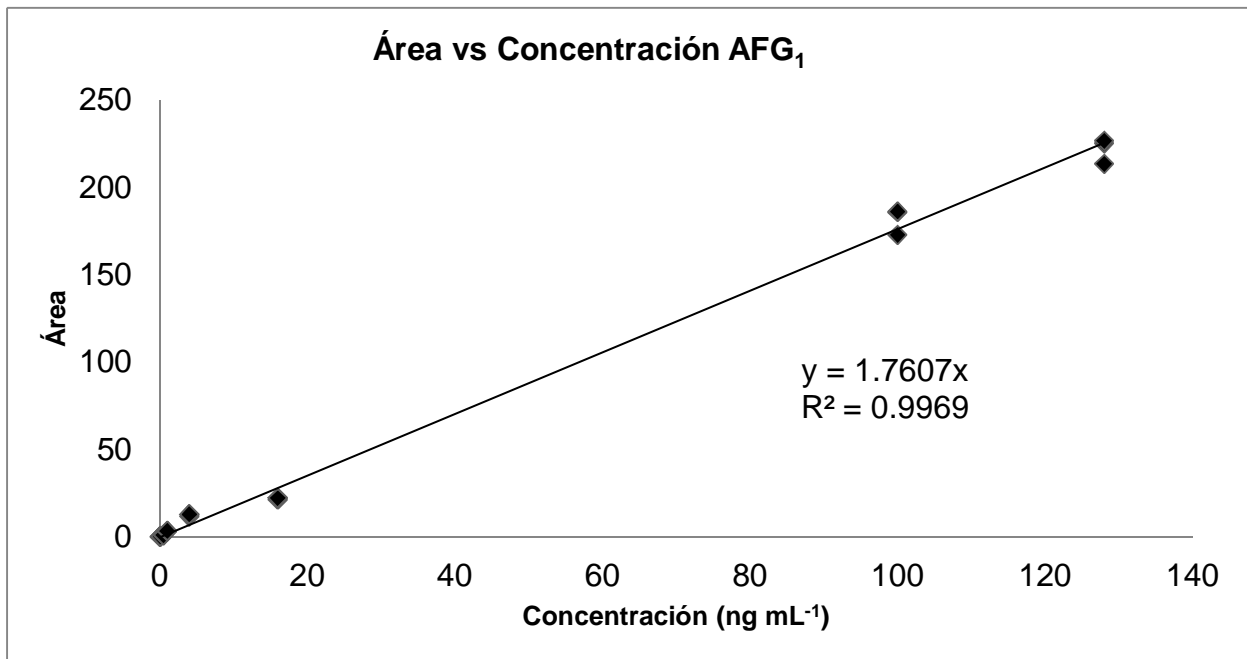


Figura 8. Gráfica de la curva de calibración de AFG₁.

Curva de Calibración de AFG₂

Tabla 16: 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	-	-

Tr = Tiempo de retención.

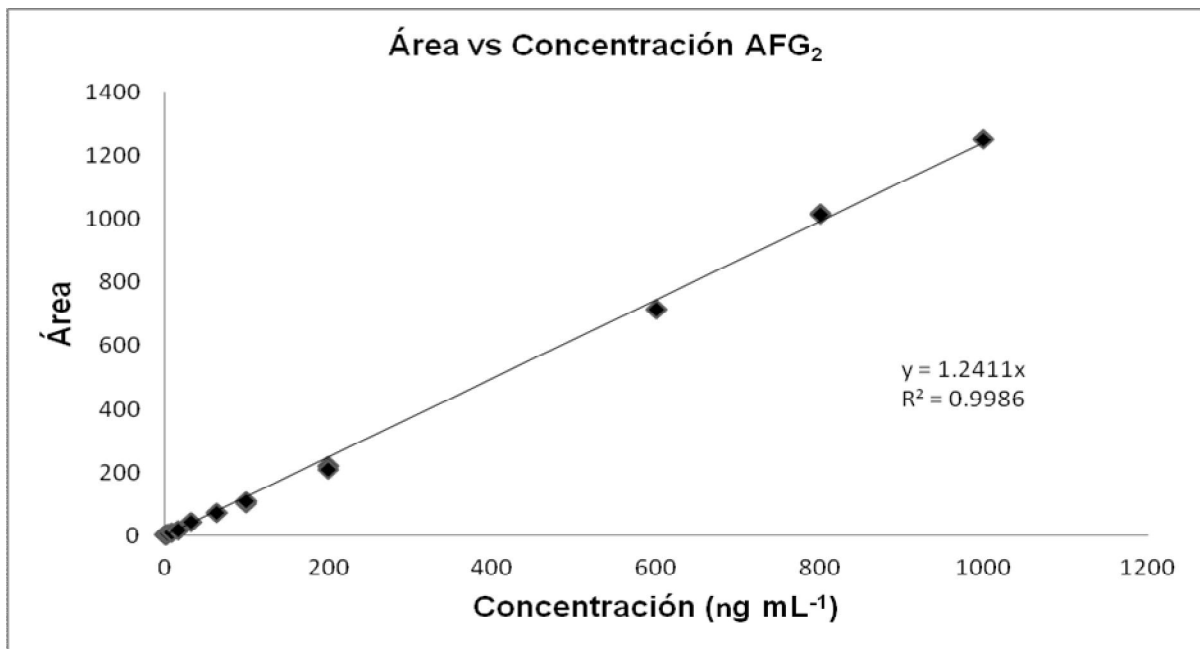


Figura 9. Gráfica de la curva de calibración de AFG₂.

V.1.2. Límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ)

Las curvas de calibración muestran, los Límites de Detección (LOD) de los estándares de AF en HPLC, detectando la cantidad más pequeña obtenida de cada AF. Mientras que el límite de cuantificación (LOQ) se tomó como 5 veces el valor del LOD

Tabla 17.

Tabla 17: Valores de Límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ).

Aflatoxina	LOD (ng mL ⁻¹)	LOQ (ng mL ⁻¹)
AFB ₁	0.1	5
AFB ₂	0.01	0.5
AFG ₁	0.01	0.5
AFG ₂	0.5	2.5

V.1.3. Porcentaje de recuperación

El porcentaje de recuperación fue del 88.5 al 100 % para cada una de las AF que se analizaron, esto quiere decir que el método de extracción fue confiable y eficaz.

La **Tabla 18** muestra los porcentajes de recuperación obtenidos.

Tabla 18: Porcentaje de recuperación

AF	Concentración basal µg Kg ⁻¹	Contaminación µg Kg ⁻¹	% Recuperación
AFB ₁	0.04	100	81.5
AFB ₂	0.02	100	100.0
AFG ₁	0.06	100	88.7
AFG ₂	0.03	100	97.0

V.1.4. Prueba de selectividad

Las siguientes **Figuras 10 y 11** muestran cromatogramas del blanco con mezcla de las cuatro AF y un cromatograma de una muestra completamente limpia y contaminada.

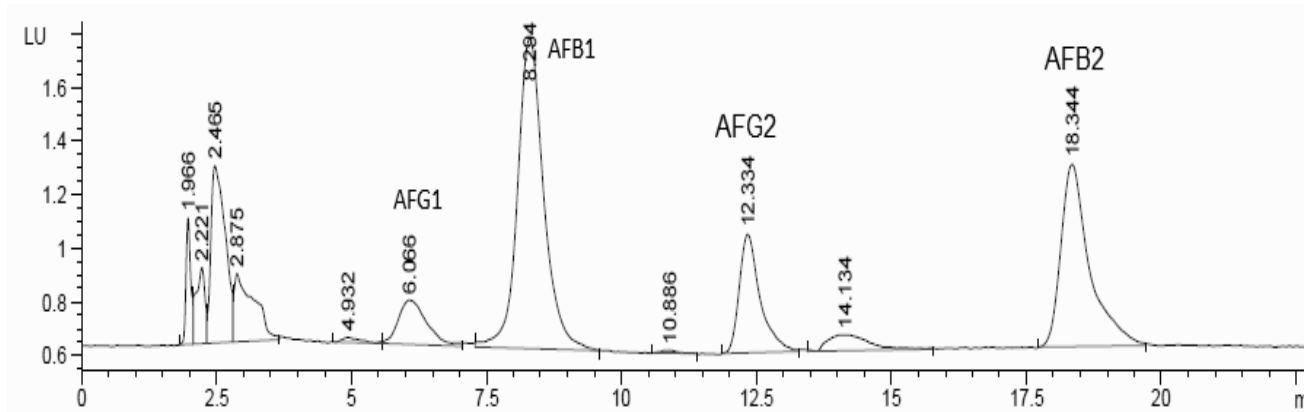


Figura 10. Cromatograma de selectividad para el blanco.

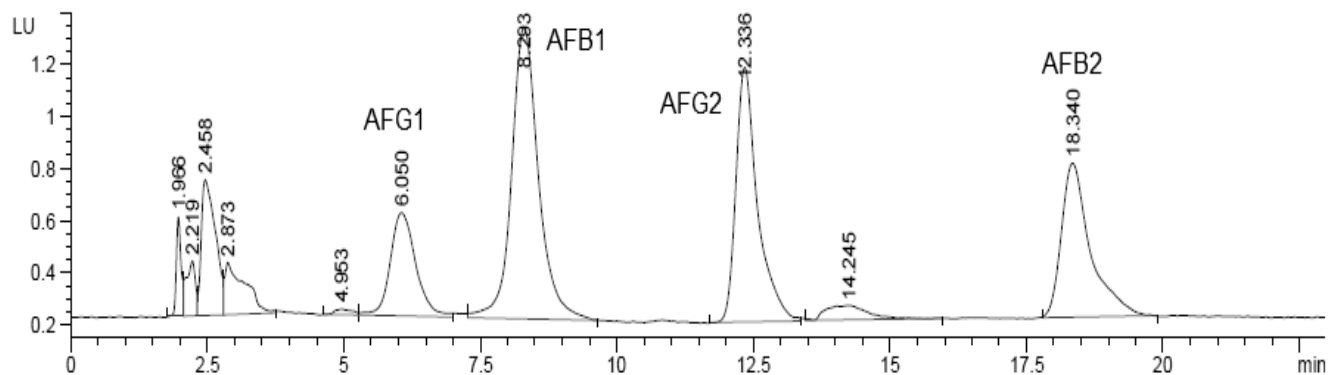


Figura 11. Cromatograma de selectividad para la muestra de cacahuate contaminada con AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂.

V.2. Cuantificación de AF en cacahuate por HPLC

La cuantificación de AF totales en cacahuate se presenta en la **Tabla 19**. Hubo una elevada incidencia de contaminación de algunas AF en algunas muestras del D.F. y del extranjero.

De las 58 muestras analizadas, el 80 % se encontró contaminada, con tres de las cuatro AF, la AFB₁ que es la más importante, estuvo presente en 57% de las muestras, por otro lado, el 100 % de las muestras tuvieron AFB₂ y AFG₁ y no se encontró ninguna muestra contaminada con AFG₂. El 100% de las muestras se encontró contaminado con AFt, con una concentración promedio de 8.53 $\mu\text{g Kg}^{-1}$, y tomando en cuenta que la cantidad de cacahuate consumida por habitante en México es de 1.8 Kg, lleva a ingerir 15.4 μg ó sea 15,400 ng de AFt al año (DGAPEAS, 2011).

Tabla 19. Concentración de aflatoxinas ($\mu\text{g Kg}^{-1}$) en cacahuate del D.F.

Delegación	Mercado	Promedio Concentración de AF				
		AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂	AFt
Álvaro Obregón	Melchor Múzquiz	<LOD	0.04	0.09	<LOD	0.13
	Olivar del Conde	<LOD	0.04	0.09	<LOD	0.14
	Corpus Christi	<LOD	0.04	0.11	<LOD	0.15
Azcapotzalco	Azcapotzalco	<LOD	0.10	0.15	<LOD	0.25
	Prohogar	<LOD	0.17	0.12	<LOD	0.28
	Nueva Santa María	<LOD	0.11	0.12	<LOD	0.23
Benito Juárez	De Mixcoac	<LOD	0.09	0.07	<LOD	0.16
	Portales	0.56	79.04	0.09	<LOD	79.69
	Independência	<LOD	0.06	0.09	<LOD	0.15
Coyoacán	Ajusco-Moctezuma	0.13	1.12	0.09	<LOD	1.39
	Santo Domingo	<LOD	0.06	0.14	<LOD	0.15
	De Coyoacán	<LOD	0.09	0.10	<LOD	0.19
Cuajimalpa	Contadero	<LOD	0.14	0.13	<LOD	0.26
	Rosas Torres	<LOD	0.15	0.09	<LOD	0.24
	Cuajimalpa	<LOD	0.12	0.10	<LOD	0.22
Cuauhtémoc	Hidalgo	<LOD	0.10	0.11	<LOD	0.21
	Arcos de Belén	<LOD	0.12	0.07	<LOD	0.19
	San Juan	<LOD	0.06	0.08	<LOD	0.13
Gustavo A. Madero	Río Blanco	<LOD	0.06	0.05	<LOD	0.11
	De la Estrella	<LOD	0.06	0.06	<LOD	0.12
	Martín Carrera	43.39	0.16	0.17	<LOD	43.71
Iztacalco	San Miguel Iztacalco	23.94	0.11	0.07	<LOD	24.12
	Tlacotal	24.73	0.18	0.13	<LOD	25.04
	Santa Anita	20.92	0.10	0.09	<LOD	21.11
Iztapalapa	Central de Abastos	11.04	0.07	0.09	<LOD	11.20
	Santa Cruz Meyehualco	19.48	0.09	0.12	<LOD	19.68
	Jacarandas	21.38	0.08	0.09	<LOD	21.55
La Magdalena Contreras	Cerro del Judío	14.69	0.08	0.09	<LOD	14.86
	La Loma	4.94	0.06	0.09	<LOD	5.09
	Turístico La Magdalena	0.13	0.06	0.09	<LOD	0.19
Miguel Hidalgo	Tacubaya	1.24	0.04	0.08	<LOD	1.36
	Plutarco Elías Calles	0.52	0.04	0.09	<LOD	0.65
	Argentina	0.85	0.04	0.07	<LOD	0.96
Milpa Alta	San Antonio Tecómitl	0.64	0.10	0.07	<LOD	0.91
	Villa Milpa Alta	1.03	0.06	0.06	<LOD	1.15
	San Pedro Actopan	1.76	0.16	0.11	<LOD	2.03
Tláhuac	Colonia del Mar	3.81	0.22	0.09	<LOD	1.59
	Mercado de la Nopalera	1.16	0.09	0.06	<LOD	1.31
	Mercado de Tláhuac	23.30	8.77	0.64	<LOD	32.71
Tlalpan	Tlalcoligia	0.43	0.12	0.09	<LOD	0.64
	Torres de Padierna	12.45	0.64	0.12	<LOD	13.21
	De la Luz	7.50	0.16	0.14	<LOD	7.80
Venustiano Carranza	La Merced	8.24	0.12	0.14	<LOD	8.49
	Jamaica	8.12	0.45	0.15	<LOD	8.72
	San Ciprian	2.48	0.16	0.12	<LOD	2.76
Xochimilco	De Xochimilco	6.17	0.11	0.12	<LOD	6.40
	San Gregorio Atlapulco	11.10	0.56	0.19	<LOD	11.85
	Tulyehualco	0.92	0.12	0.17	<LOD	1.22
India	Bophal	<LOD	0.54	0.09	<LOD	0.72
	Bophal	<LOD	0.64	0.08	<LOD	0.73
Turquía	Estambul	8.76	0.45	0.50	<LOD	9.70
	Estambul	8.70	0.15	0.15	<LOD	9.30
	Estambul	0.31	0.58	0.23	<LOD	1.01
	Estambul	0.43	0.41	0.05	<LOD	0.90
	Estambul	0.44	0.62	0.07	<LOD	1.14
	Estambul	0.13	0.93	0.06	<LOD	1.03
	Estambul	<LOD	1.23	0.10	<LOD	1.32
Estambul	<LOD	0.82	0.07	<LOD	0.89	

La concentración más elevada encontrada en AFB₁, fue de 43.49 µg Kg⁻¹, proveniente de la Delegación Gustavo A. Madero, del mercado Martin Carrera, seguida de la Delegación Iztacalco, mercado Tlacotal, con una concentración de 24.73 µg Kg⁻¹, la concentración de AFB₂ fue de 79.52 µg Kg⁻¹, en la Delegación Benito Juárez del mercado Portales, mientras que para la AFG₁ las concentraciones fueron trazas, y la más elevada fue de 0.64 µg Kg⁻¹, de la Delegación Tláhuac en el mercado Tláhuac y no se encontró ningún tipo de contaminación por AFG₂ en las muestras, puede ser a que las condiciones para la síntesis de este grupo fue el pH inadecuado para su producción (Buchanan & Ayres, 1975).

De las muestras extranjeras, Turquía, mercado de Estambul, presentó una mayor contaminación de AFt con un promedio de 3.17 µg Kg⁻¹, ya que las muestras del mercado de Bophal de la India tuvieron un promedio de 0.73 µg Kg⁻¹.

Cerca del 64.2% de muestras de cacahuete de Nigeria se encontraron contaminadas con AFB₁ (25.5 µg Kg⁻¹) (Bankole *et al.*, 2005). En Togo se encontró un 58.3% de las muestras con *A. flavus* (Egal *et al.*, 2005). Se reportaron AFs en las cáscaras y en los granos de cacahuete en Brasil, donde 20 muestras (33.3%) estuvieron contaminadas por AFB₁ (7.0 a 116 µg Kg⁻¹), las 17 muestras restantes, un 28.3%, estuvieron contaminadas con AFB₂ (3.3 hasta 45.5 µg Kg⁻¹) (Nakai *et al.*, 2008). Las muestras de cacahuete de México, se encontraron más contaminadas que las de África o de Brasil.

El contenido de AF en cacahuete se puede controlar, por ejemplo, en Estados Unidos, el contenido de AF debe de ser <15 µg Kg⁻¹, para aprobar la calidad de las muestras (CFR, 2010a). La FDA, establece que los productos de cacahuete deben contener menos de 20 µg Kg⁻¹ de AF (FDA, 2000).

La elevada presencia de AF en cacahuete sin procesar, puede atribuirse a las condiciones durante la pre-cosecha, ya que el suelo es el lugar ideal para el crecimiento de muchos hongos, incluyendo al género *Aspergillus* (Smith & Ross, 1991). La actividad de agua (a_w) del sustrato también juega un papel importante para el crecimiento del hongo (Pitt & Hocking, 1997). El estrés por la sequía, las temperaturas elevadas del suelo (>22°C) y cualquier daño físico, durante la etapa de crecimiento de las vainas, puede acentuar la invasión de hongos y la producción de AF en los cacahuates (Nageswara Rao *et al.*, 2002; Horn, 2005; Arunyanark *et al.*, 2009). Los cacahuates son susceptibles a la

contaminación por AFs (Smith & Moss, 1985; Lisker *et al.*, 1993; Wu & Khlangwiset, 2010), y en México son de amplio consumo para la elaboración de dulces típicos, como palanquetas, mazapanes, o como aperitivo. Algunos alimentos que contienen cacahuete en su elaboración, con su contenido de AF se muestran en la **Tabla 20**. Podemos observar la alta contaminación de AF ya en el consumo de 100 g que es una bolsa pequeña, lo cual muestra un alarmante aporte de cancerígenos por esta oleaginosa.

Tabla 20. Alimentos y cálculo de AFt en cacahuete procesado.

Alimento	Gramos de cacahuete	Promedio AFt ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)	Total de AF (μg) calculado por consumo
Paquete cacahuete	50	8.53	427
	75		640
	150		1280
Mazapán (1 pieza)	28		240
Palanqueta (1 pieza)	50		427
	100		853
	250		2133
Crema de cacahuete (1 taza)	370		3156
Mantequilla de cacahuete	300		2560
Galletas	200		1706

Las siguientes **Figuras 12-15**, indican de menor a mayor la Delegaciones del Distrito Federal con la concentración de AF que presentaron las muestras de cacahuete con las cuatro AF por separado.

La AFB₁ es el cancerígeno y tóxico más importante y al comparar su procedencia y su concentración se observa que las Delegaciones más contaminadas fueron Iztapalapa e Iztacalco, **Figura 12**. La Central de Abasto se encuentra en Iztapalapa y es el centro de distribución más importante del D.F., de ahí la importancia de que la mayor concentración de esta AF se encuentre en esa Delegación (IARC, 1993 y 2002; Kamika & Takoy, 2011).

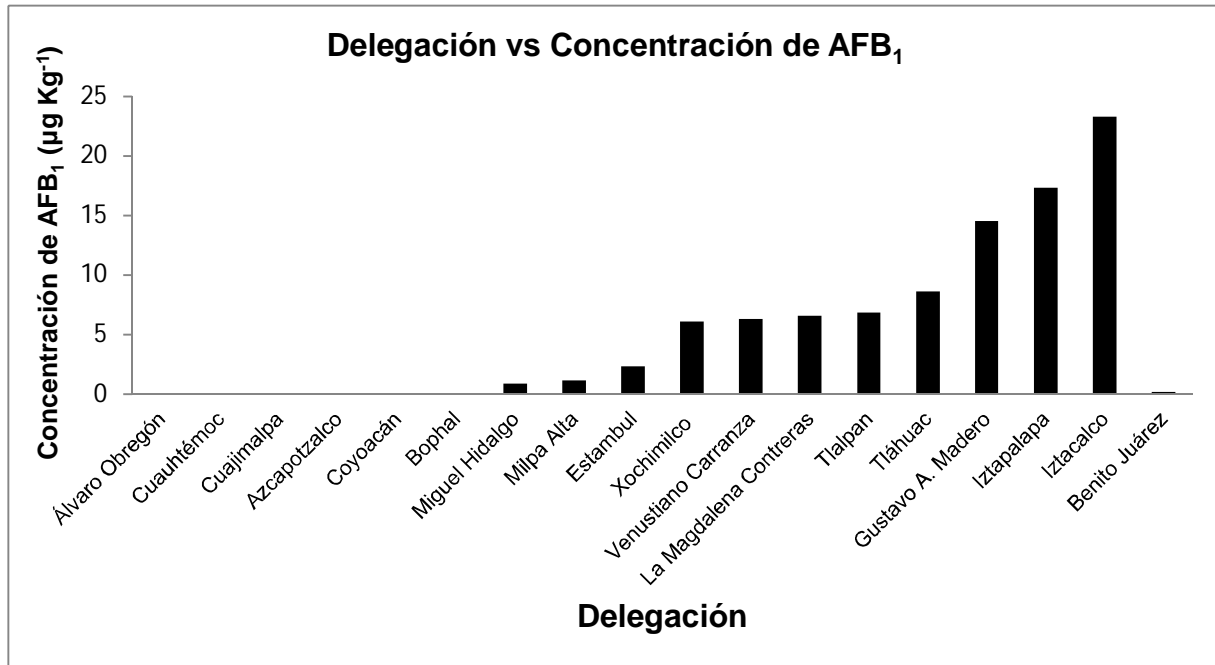


Figura 12. Procedencia y concentración de AFB₁ de las muestras.

La **Figura 13**, indica la procedencia del cacahuete y la concentración de la AFB₂, donde la Delegación con más alta concentración fue la Benito Juárez. La AFB₂, no es tan cancerígena como la AFB₁, sin embargo es bioacumulable para el organismo, tanto de animales como de humanos (Wild & Gong, 2010).

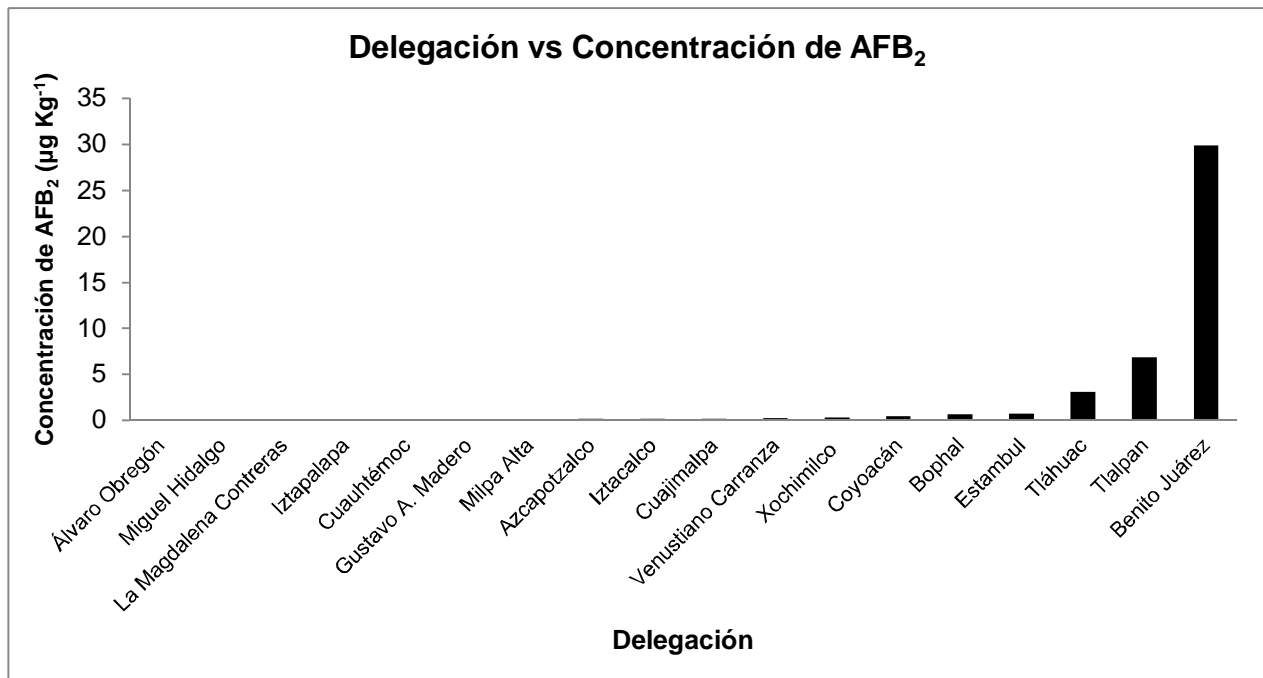


Figura 13. Procedencia y concentración de AFB₂ de las muestras.

La **Figura 14** indica la concentración de AFG₁ que se encuentra en las muestras de cacahuates de los 48 mercados y Delegaciones del D.F., donde se puede apreciar que la contaminación por este tipo de AF se encuentra en Tláhuac, además la AFG₁ se presentó en todas las muestras.

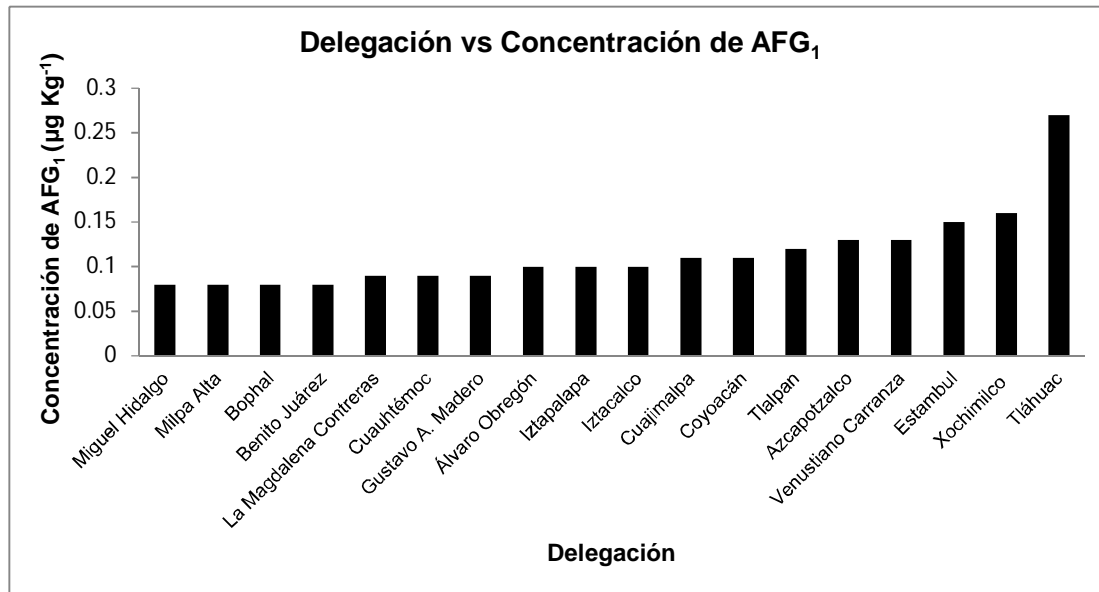


Figura 14. Procedencia y concentración de AFG₁ de las muestras.

Algunos reportes del norte de China indican que se encuentra frecuentemente en cereales y productos alimenticios, generando cáncer de pulmón y de estómago (Zhang *et al.*, 2003). Además de que confirmaron que una administración intra-gastrointestinal de la AFG₁ a largo plazo, puede inducir adenocarcinomas de pulmón en ratones (Huang *et al.*, 2004).

Los cacahuates comercializados en la Ciudad de México son muy susceptibles a la contaminación por *A. parasiticus*, *A. flavus* y en muy poco por *A. nomius* (Iqbal *et al.*, 2012; Iqbal & Asi, 2013). *A. parasiticus* produce los cuatro tipos de AF encontradas en las muestras, donde las AFt tuvieron concentraciones muy elevadas en las Delegaciones como Benito Juárez, Iztacalco, Iztapalapa y Tláhuac (**Figura 15**).

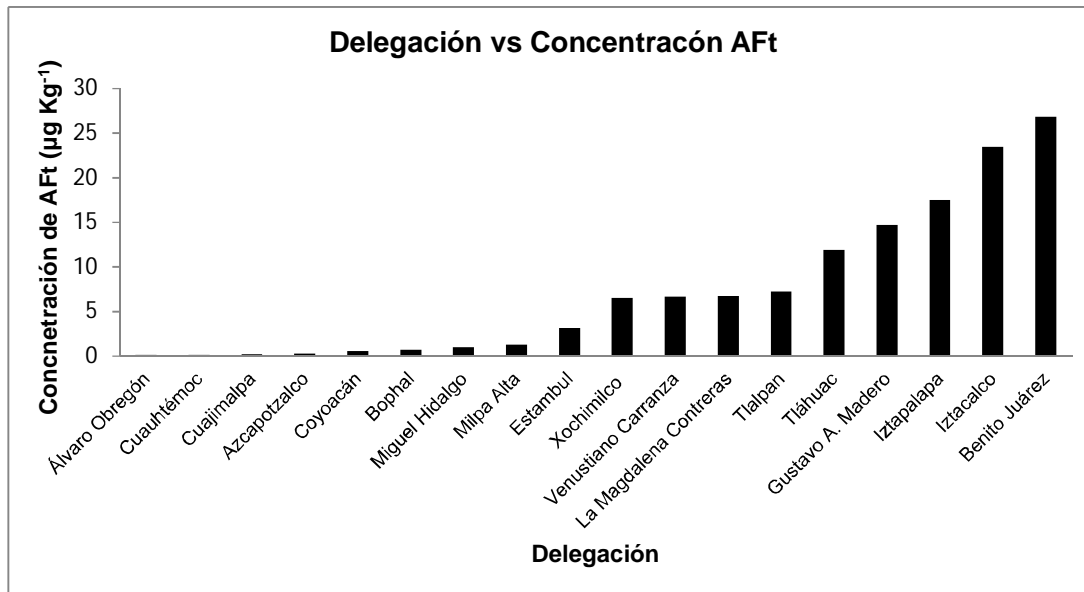


Figura 15. Procedencia y concentración de Aflatoxinas totales (AFt) de las muestras

V.3. Análisis estadístico.

Para conocer si existía diferencia significativa entre las Delegaciones del D.F y las muestras extranjeras, se realizó el estudio estadístico llamado Kruskal-Wallis, que es una prueba no-paramétrica, la cual evalúa si dos o más muestras provienen del mismo lugar (Suxin *et al.*, 2013).

Tabla 21. Resultados obtenidos por la prueba Kruskal-Wallis

Aflatoxina	Valor de la prueba	Significancia	¿Existe diferencia por procedencia?
AFB₁	116,50	<0,05	SI
AFB₂	98,00	<0,05	SI
AFG₁	38,20	<0,05	SI
AFG₂	-	-	-
AFt	93,34	<0,05	SI

Como se puede observar en la **Tabla 21**, sí existen diferencias significativas entre los lugares de origen de cada una de las muestras, ya que presentó valores de la prueba

menores a <0.05 , cada cacahuete es un individuo diferente con una contaminación específica según sus condiciones de cultivo y hay una distribución aleatoria de las AF.

Las siguientes **Figuras 16-19**, muestran las gráficas correspondientes a concentraciones de AFs y su lugar de origen, donde se observan igualdades y diferencias por Delegación.

Las gráficas muestran letras en cada una de las barras, las letras iguales muestran similitud en la concentración de AF.

El análisis estadístico compara la procedencia y la concentración de AFB₁, **Figura 16**, las muestras de Iztacalco e Iztapalapa no presentan diferencia significativa en la concentración de AFB₁, aunque en Iztacalco estén más contaminadas.

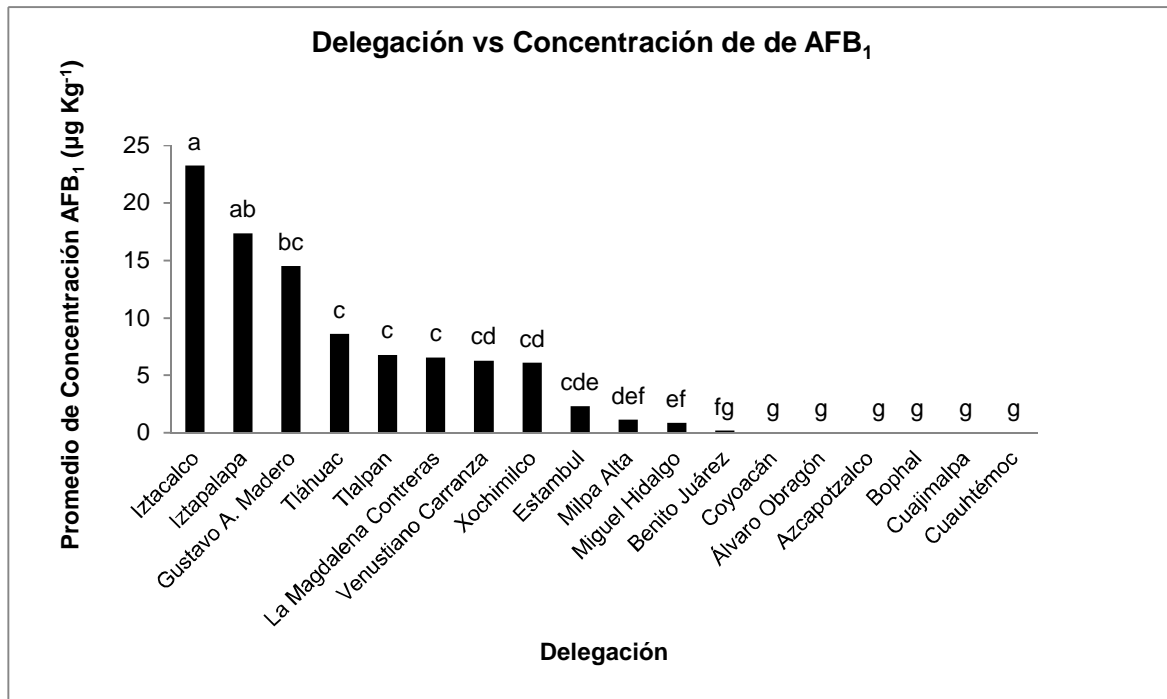


Figura 16. Comparación entre Delegaciones y concentración de AFB₁.

La **Figura 17** muestra la diferencia significativa de la concentración de AFB₂ de la Delegación Benito Juárez respecto al resto de las Delegaciones.

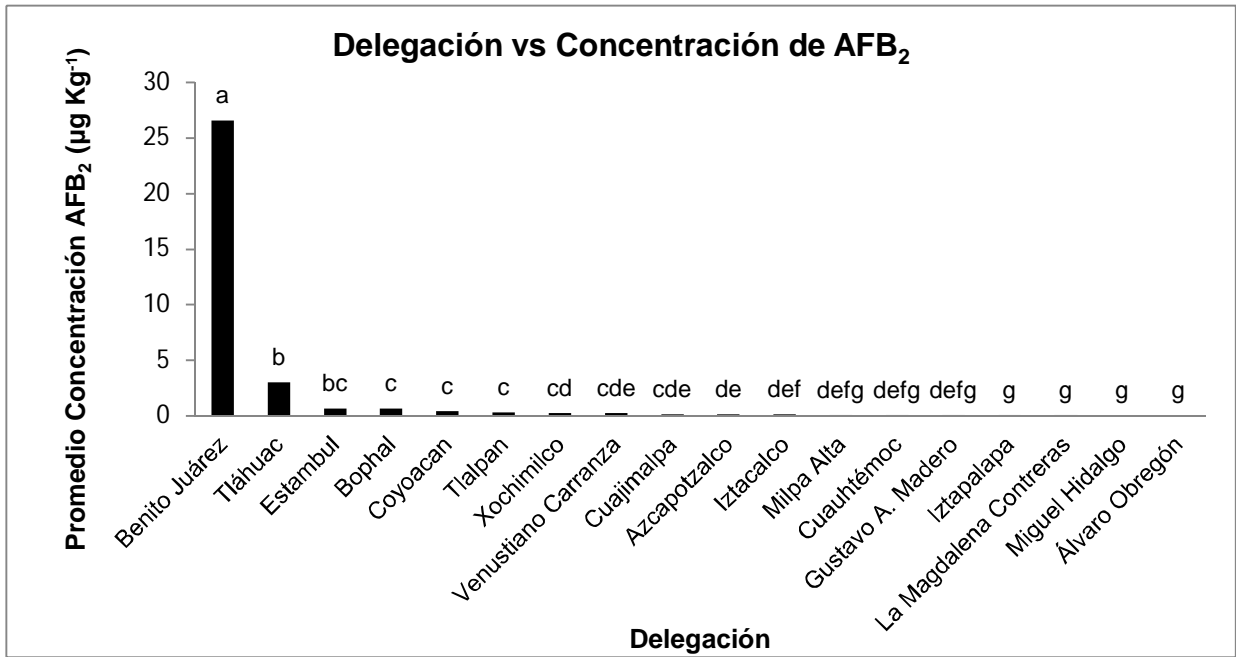


Figura 17. Comparación entre Delegaciones y concentración de AFB₂.

La Figura 18 indica las concentraciones de la AFG₁ y las Delegaciones donde se obtuvieron, todas las muestras contienen AFG₁, provenientes de lugares similares.

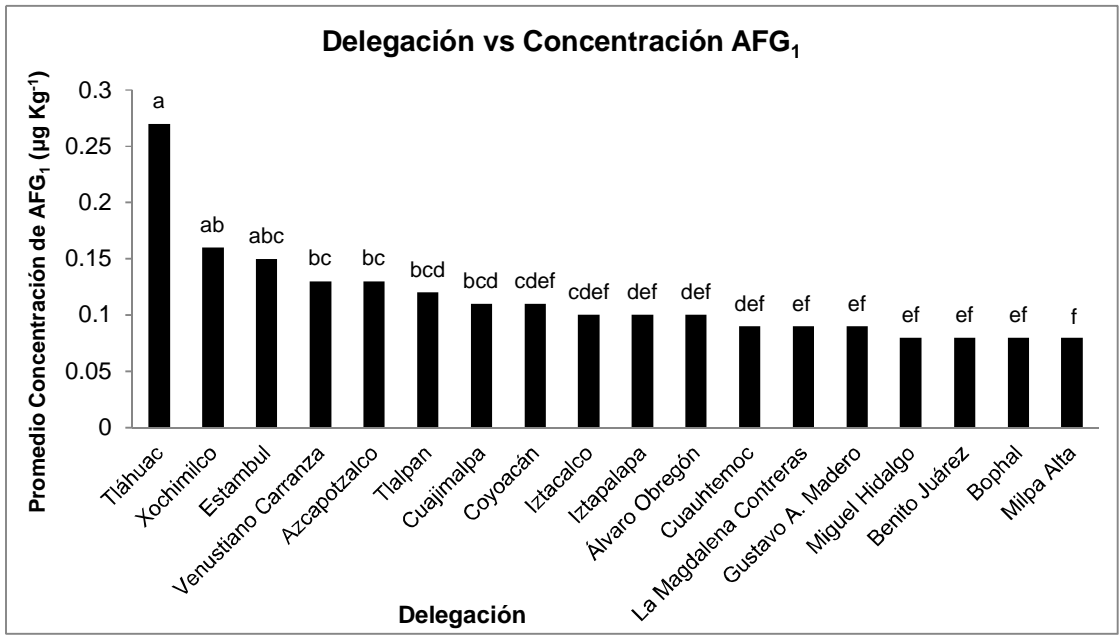


Figura 18. Comparación entre Delegaciones y Concentración de AFG₁.

La mayoría de las AFt encontradas en las muestras, presentan diferencia significativa con respecto a su lugar de origen, excepto Coyoacán con Azcapotzalco y Cuajimalpa, Cuauhtémoc y Álvaro Obregón, **Figura 19**.

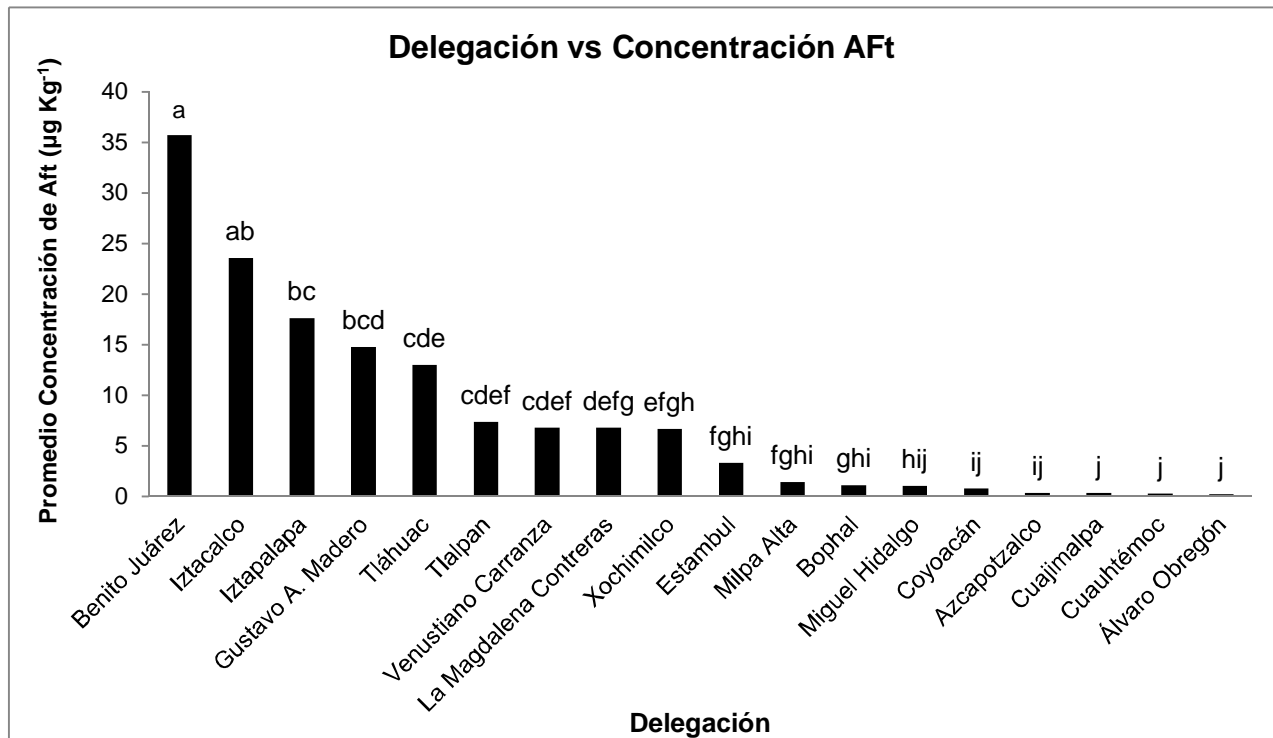


Figura 19. Comparación entre Delegaciones y concentración de AFt.

De acuerdo a la regulación que tuvo México de AFt en los alimentos ($20 \mu\text{g Kg}^{-1}$), siete mercados tuvieron muestras que superaron los límites permitidos con concentraciones de 20 a $80 \mu\text{g Kg}^{-1}$. Según la legislación de la Comisión Europea, que permite un límite de $\leq 2 \mu\text{g Kg}^{-1}$ de AFB₁ y $10 \mu\text{g Kg}^{-1}$ de AFt, en este estudio se encontraron 13 muestras fuera de norma con concentraciones de 10 a $80 \mu\text{g Kg}^{-1}$. En el estudio se encontraron tres de las cuatro AF en cacahuete, y una serie de estudios, indican que todas ellas son cancerígenas (EFSA, 2007).

Gran número de las muestras que se analizaron, presentaron trazas de AFt, pero las Delegaciones Benito Juárez tuvieron muestras con $80 \mu\text{g Kg}^{-1}$ AFt, la Gustavo A. Madero con $44 \mu\text{g Kg}^{-1}$ AFt, Iztacalco con $25 \mu\text{g Kg}^{-1}$ AFt, Iztapalapa con $22 \mu\text{g Kg}^{-1}$ AFt y Tlalpan con $33 \mu\text{g Kg}^{-1}$ AFt, que sobrepasaron los límites permitidos por las Normas Oficiales de FDA (Food and Drug Administration) de Estados Unidos y de Codex Alimentarius en muchos países del mundo. Lo cual es un problema grave para la sociedad

mexicana, ya que el consumo de cacahuete en nuestro país es elevado y puede causar una serie de enfermedades, entre ellas el cáncer.

Una amplia gama de alimentos como cacahuates, nueces, frutos secos, especias, arroz, maíz, soya y trigo, se encuentran contaminados con AFt (Bankole *et al.*, 2010; Egal *et al.*, 2005; Ok *et al.*, 2007; Razzazi-Fazeli *et al.*, 2004; Shundo *et al.*, 2009; Williams *et al.*, 2004).

En el caso del cacahuete produce resveratrol que es una fitoalexina polifenólica en respuesta a estímulos exógenos, y es generado por el daño por hongos (Sobolev *et al.*, 1999). Se puede encontrar en vinos (Lamuela-Raventos *et al.*, 1995), legumbres (Burns *et al.*, 2002), bayas (Lyons *et al.*, 2003) y pistaches (Tokusoglu *et al.*, 2005).

El interés por el resveratrol, es porque protege contra el cáncer (Aggarwal *et al.*, 2004), en enfermedades coronarias (Orallo *et al.*, 2002), además de presentar efectos benéficos para la salud, como neuroprotector (Han *et al.*, 2004) y anti-inflamatorio (De la Lastra & Villegas, 2005). Parece ser que la convivencia de millones de años del cacahuete con el *Aspergillus* ha hecho que la planta trate de protegerse de las aflatoxinas y si bien están presentes ya no serían tan dañinas para la oleaginosa. La presencia de aflatoxinas y resveratrol muestra una lucha del cacahuete por la supervivencia y que afecta al hombre en forma no totalmente aclarada.

Debido a estas propiedades benéficas, el resveratrol se utiliza en complementos alimenticios y para obtener alimentos funcionales (López *et al.*, 2007).

El presente estudio estuvo validado en su metodología y el muestreo se realizó con sumo cuidado y abarcó todo el Distrito Federal que recibe cacahuete de todo el país. Esta investigación nos demuestra la necesidad de revisar los niveles de AF en cacahuete en México pues las concentraciones encontradas llegan a ser muy altas en algunas muestras. Dado que estas AF se acumulan en el ADN y que el consumo de esta oleaginosa es continuo, su ingestión representan un riesgo para la salud.

VI. CONCLUSIONES

- Se validó el método analítico para la determinación y cuantificación de AF en cacahuete natural, por medio de columnas de inmunoafinidad y utilizando un equipo de Cromatografía de Alta Eficiencia (HPLC).
- Se muestrearon los tres mercados más importantes y representativos de cada una de las Delegaciones del Distrito Federal para el estudio y análisis de las 48 muestras de cacahuete natural.
- Se determinaron los tiempos de retención de cada una de las AF, por medio de las tres pruebas de validación: linealidad (curvas de calibración), selectividad y recuperación, se tomó el rango de tiempos de retención de estos tres experimentos.
- Las concentraciones de las AF fueron muy elevadas, incluso superan los límites permitidos por la Comisión Europea (CE), de AFB₁ la cual es de 12 µg Kg⁻¹, y la concentración más alta que presentaron los cacahuates fue de 44 µg Kg⁻¹, 4 veces más que lo permitido, por lo que el cacahuete mexicano se encuentra altamente contaminado por la AFB₁ que es la más importante y cancerígena de las cuatro estudiadas. Además sobrepasa la Norma Oficial de FDA de Estados Unidos de 20 µg Kg⁻¹.

Para el caso de México, a partir de 2013 se dejó de aplicar toda la legislación que protegía a los mexicanos contra las aflatoxinas en aras de un comercio internacional más fluido y con todos los riesgos que esto implica para la salud de los mexicanos.

- No hubo presencia de AFG₂ en ninguna de las muestras, presentaron trazas menores al límite de detección (<LOD). Es posible que las condiciones para su producción no fueran las adecuadas, esto viene desde el cultivo del cacahuete, y para su análisis, ya no hubo esta AF.
- Existió diferencia significativa en la presencia de las AF (B₁, B₂, G₁, G₂ y AFt) de las muestras.
- La Delegación Benito Juárez presentó mayor contaminación de AFt.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Adzahan, N., Jalili, M., Jinap, S., 2009. Survey of aflatoxins in retail samples of whole and ground black and white peppercorns. *Food Additives and Contaminants B*, 2: 178–182.
- Aggarwal, B.B., Bhardwaj, A., Aggarwal, R.S., Seeram, N.P., Shishodia, S., Takada, Y., 2004. Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies. *Anticancer Research*, 24:2783-2840.
- Akiyama, H., Goda, Y., Tanaka, T., Toyoda, M., 2001. Determination of aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ in spices using a multifunctional column clean-up. *Journal of Chromatography A*, 932:153-157.
- AOAC, Association of Official Analytical Chemists., 2000. Official Methods of Analysis of AOAC International. Gaithersburg, MD,USA. Atkinson, A., & Donev, A., 1992. Optimum Experimental Designs. London, UK: Oxford University Press.
- Arunyanark, A., Jogloy, S., Wongkaew, S., Akkasaeng, C., Vorasoot, N., Wright, G.C., Rachaputi, R.C.N., Patanothai A., 2009. Association between aflatoxin contamination and drought tolerance traits in peanut. *Field Crops Research*, 114: 14–22.
- Arzandeh, S., Jinap, S., Lioe, H., 2010. Aflatoxin in raw peanut kernels marketed in Malaysia. *Journal of Food and Drug Analysis*, 18: 44-50.
- Atayde D.D., Reis T.A., Godoy I.J., Zorzete P., Reis G.M., Corrêa B., 2012. Mycobiota and aflatoxins in a peanut variety grown in different regions in the state of São Paulo, Brazil. *Crop Protection*, 33: 7-12.
- Aycicek, H., Aksoy, A., Saygi, S., 2005. Determination of aflatoxin levels in some dairy and food products which consumed in Ankara, Turkey. *Food Control*, 16: 263-266.
- Bansal, J., Tam, A., Cavlovic, A., Kwong, A., 2011. Survey of rice sold in Canada for aflatoxins, ochratoxin A and fumonisins. *Food Additives and Contaminants*, 28: 767–774.

- Bankole, S.A., Ogunsanwo, B.M., Eseigbe, D.A., 2005. Aflatoxins in Nigerian dryroasted groundnuts. *Food Chemistry*, 89: 503-506.
- Bankole, S.A., Adenusi, A.A., Lawal, O.S., Adesanya, O.O., 2010. Occurrence of aflatoxin B1 in food products derivable from 'egusi' melon seeds consumed in southwestern Nigeria. *Food Control*, 21: 974-976.
- Bastianelli, D., Le Bas, C., 2002. Evaluating the role of animal feed in food safety: perspectives for action. In: Hanak, E., Boutrif, E., Fabre, P., Pineiro, M. (Eds.), *Food Safety Management in Developing Countries*. CIRAD-FAO, Montpellier, France.1-4.
- Benedetti, S., Iametti, S., Bonomi, F., Mannino, S., 2005. J. Head space sensor array for the detection of aflatoxin M1 in raw ewe's milk. *Journal of Food Protection*, 68:1089–1092.
- Bhat, R.V., Vasanthi, S., 2003. Food safety in food security and food trade: Mycotoxin Food Safety Risk in Developing Countries. *International Food Policy Research Institute*, 10:3-17.
- Binder, E.M. 2007. Managing the risk of mycotoxins in modern feed production. *Animal Feed Science and Technology*, 133: 149–166.
- Braicu, C., Puia, C., Bodoki, E., Socaciu, C., 2008. Screening and quantification of aflatoxins and ochratoxin in different cereals cultivated in Romania using thin layer chromatography-densitometry. *Journal of Food Quality*, 31:108–120.
- Buchanan, R.L., Ayres, J.C., 1975. Effect of initial pH on aflatoxin production. *Applied Microbiology*, 30: 1050-1051.
- Burns, J., Yakota, T., Ashihara, H., Lean, M.E.J., Crozier, A., 2002. Plant foods and herbal sources of resveratrol. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 50:3337-3340.

- Candlish, A.A.G., Peason, S.M., Aidoo, K.E., Smith, J.E., Kelly, B., Irvine, H., 2001. A survey of ethnic foods for microbial quality and aflatoxin content. *Food Additives and Contaminants*, 18: 129–136.
- Câmara, G.M.S., 1998. Introdução à cultura do amendoim. Piracicaba: Departamento de Agricultura, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. 1–21.
- Carrillo, L., 2003. Los hongos de los alimentos y forrajes. Universidad Nacional de Salta. Argentina. 128 pp.
- Castilho Gorayeb, T.C., Casciatori, F.P., Del Bianchi, V.L., Thoméo, J.C., 2009. HACCP plan proposal for a typical Brazilian peanut processing company. *Food Control*, 20: 671–676.
- Cavaliere, C., Foglia, P., Guarino, C., Nazzari, M., Samperi, R., Laganà, A., 2007. Determination of aflatoxins in olive oil by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytical Chimica Acta*, 596:141–148.
- Cervino, C., Saucedo, J.C., Niessner, R., Knopp, D., 2008. Mycotoxin analysis by automated flow-through immunoassay with chemiluminescence readout. *Luminescence*, 23: 206–207.
- Chang, A.S., Sreedharan, A., Schneider, K.R., 2013. Peanut and peanut products: A food safety perspective. *Food Control*, 32:296-303.
- 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: 31-40.

- Cho, S.H., Lee, C.H., Jang, M.R., Son, Y.W., Lee, S.M., Choi, I.S., Kim, S.H., Kim, D.B., 2008. Aflatoxins contamination in spices and processed spice products commercialized in Korea. *Food Chemistry*, 107: 1283–1288.
- Chung, S., La Vecchia, C., Boffetta, P., 2009. Liver cancer: descriptive epidemiology and risk factors other than HBV and HCV infection. *Cancer Letters*, 286: 9–14.
- CFR, Code of Federal Regulations., 2010 a. Minimum quality and handling standards for domestic and imported peanuts marketed in the United States: Negative aflatoxin content. Title 7, Part 996.11. Washington, D.C: US Food and Drug Administration, Office of the Federal Register.
- CAC, Codex Alimentarius Commission., 2001. Joint FAO/WHO food standards program, codex committee on food additives and contaminants. Thirty-third Session. Dordrecht, The Netherlands.
- CAC, Codex Alimentarius Commission., 2004. Code of practice for the prevention and reduction of aflatoxin contamination in peanuts. CAC/RCP, 55.
- Colak, H., Bingol, E.B., Hampikyan, H., Nazli, B., 2006. Determination of aflatoxin contamination in red-scaled, red and black pepper by ELISA and HPLC. *Journal of Food and Drug Analysis*, 14: 292–296.
- Cole, R.J., Dorner, J., Holbrook, C., 1995. Advances in mycotoxin elimination and resistance. In: Pattee, H.E., Stalker, H.T. (Eds.). *Advances in Peanut Science*. American Peanut Research and Education Society, Inc., 456–474.
- Commission Regulation (EU) No. 165/2010 of 26 February 2010 amending Regulation (EC) No. 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards aflatoxins. Official Journal of the European Union, L50, 8–12.
- D’Mello, J.P.F., 2003. Mycotoxins in cereal grains, nuts and other plant products. In: D’Mello, J.P.F. (Ed.), *Food and Safety: Contaminants and Toxins*, 65–90.

- D'Mello, J.P.F., Macdonald, A.M.C., 1997. Mycotoxins. *Animal Feed Science Technology*, 69:155-166.
- D'Orazio, G., Rocco, A., Fanali, S., 2012. Fast-liquid chromatography using columns of different internal diameters packed with sub-2 μm silica particles. *Journal of Chromatography A*, 1228: 213-220.
- Daradimos, E., Marcaki, P., Koupparis, M., 2000. Evaluation and validation of two fluorometric HPLC methods for the determination of aflatoxin B1 in olive oil. *Food Additives and Contaminants*, 17: 65–73.
- De la Lastra, C.A., Villegas, I., 2005. Resveratrol as an anti-inflammatory and anti-aging agent: mechanisms and clinical implications. *Molecular Nutrition & Food Research*, 49: 405–430.
- DGAPEAS, Dirección General Adjunta de Planeación Estratégica y Análisis Sectorial., 2011. Monografía del Cacahuete. Dirección Ejecutiva de Análisis Sectorial. Financiera Rural. México. 1-6.
- DGAPEAS, Dirección General Adjunta de Planeación Estratégica y Análisis Sectorial., 2012. Monografía del Cacahuete. Dirección Ejecutiva de Análisis Sectorial. Financiera Rural. México, 1-7.
- Dorner, J.W., Cole, R.J., 2002. Effect of application of nontoxigenic strain of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* on subsequent aflatoxin contamination of peanut in storage. *Journal of Stored Products Research*, 38: 329–339.
- Dorner, J.W., 2008. Management and prevention of mycotoxins in peanuts. *Food Additives and Contaminants A*, 25: 203–208.
- Ellis, W.O., Smith, J.P., Simpson, B.K., Oldham, J.H., 1991. Aflatoxins in food: occurrence, biosynthesis, effects in organisms, detection and methods of control. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 30: 403-439.

- Egal, S., Hounsa, A., Gong, Y.Y., Turner, P.C., Wild, C.P., Hall, A.J., 2005. Dietary exposure to aflatoxin from maize and groundnut in young children from Benin and Togo, West Africa. *International Journal of Food Microbiology*, 104: 215-224.
- CE, European Commission., 2006 b. No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal of the European Union*. L 364/5.
- EFSA, European Food Safety Authority., 2007. Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the Commission related to the potential increase of consumer health risk by a possible increase of the existing maximum levels for aflatoxins in almonds, hazelnuts and pistachios and derived products. *The European Food Safety Journal*, 446: 1-127.
- FAO, Food and Agricultural Organization., 1998. Food for the Future, Food, Nutrition and Agriculture No.1. Consultada 19 septiembre de 2012.
<http://www.fao.org/docrep/U3550T/U3550T00.htm>
- FDA, Food and Drug Administration., 2000. Guidance for industry: action levels for poisonous or deleterious substances in human food and animal feed. Consultado el 8 de Julio de 2013. <http://www.fda.gov/Food/GuidanceComplianceRegulatoryInformation>
- Fekete, S., Ganzler, K., Fekete, J., 2011. Efficiency of the new sub-2 μ m core-shell (KinetexTM) column in practice, applied for small and large molecule separation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 54: 482–490.
- Frenich, A.G., Vidal, J.L.M., Romero-González, R., Aguilera-Luiz, M.M., 2009. Simple and high-throughput method for the multimycotoxin analysis in cereals and related foods by ultra-high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, 117: 705–712.

- Frisvad, J.C., Thrane, U., Samson, R.A., 2007. Mycotoxin producers. *In: Dijksterhuis, J., Samson, R. A., (Eds.). A multifaceted approach to fungi and Food. Food Mycology*, 135-159.
- Fu, Z., Huang, X., Min, S., 2008. Rapid determination of aflatoxins in corn and peanuts. *Journal of Chromatography A*, 1209: 271–274.
- Gallart-Ayala, H., Moyano, E., Galceran, M.T., 2008. Liquid chromatography/tandem mass spectrometry (highly selective selected reaction monitoring) for the analysis of isopropylthioxanthone in packaged food. *Journal of Chromatography A*, 1208: 182-188.
- García, S., Heredia, N., 2006. Mycotoxins in Mexico: Epidemiology, management, and control strategies. *Mycopathologia*, 162: 255-264.
- Gilbert, J. 2002. Validation of analytical methods for determining mycotoxins in food stuffs. *Trends in Analytical Chemistry*, 21: 468-486.
- Giray, B., Girgin, G., Engin, A.B., Aydin, S., Sahin, G., 2007. Aflatoxin levels in wheat samples consumed in some regions of Turkey. *Food Control*, 18: 23–29.
- Gong, Y., Egal, S., Hounsa, A., Turner, P., Hall, A., Cardwell, K., Wild, C., 2003. Determinants of aflatoxin exposure in young children from Benin and Togo West Africa: the critical role of weaning. *Int. Journal of Epidemiology & Community Health*, 32: 556–562.
- Guo, B.Z., Yu, J., Holbrook, C.C., Cleveland, T.E., Nierman, W.C., Scully, B.T., 2009. Strategy in prevention of preharvest aflatoxin contamination in peanuts: Aflatoxin biosynthesis, genetics and genomics. *Peanut Science*, 36: 11–20.
- Guzmán de Peña, D., 2007. La exposición a la AFB₁ en animales de laboratorio y su significado en la salud pública, *Salud Pública de México*, 49: 227-235.

- Han, Y., Zheng, W., Bastianetto, S., Chabot, J., Quirion, R., 2004. Neuroprotective effects of resveratrol against β -amyloid-induced neurotoxicity in rat hippocampal neurons: involvement of protein kinase. *British Journal of Pharmacology*, 141:997–1005.
- Han, Z., Zheng, Y., Luan, L., Cai, Z., Ren, Y., Wu, Y., 2010. An ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of aflatoxins B₁, B₂, G₁, G₂, M₁ and M₂ in traditional Chinese medicines. *Analytica Chimica Acta*, 664: 165–171.
- Hall, A.J., Wild, C.P., 2003. Liver cancer in low and middle income countries: prevention should target vaccination, contaminated needles and aflatoxins. *British Medical Journal*, 326: 994–995.
- Hefle, S., 1996. The Molecular Biology of Food Allergy. *Immunology and Allergy Clinics of North America*, 16: 565-590.
- Herzallah, S.M., 2009. Determination of aflatoxins in eggs, milk, meat and meat products using HPLC fluorescent and UV detectors. *Food Chemistry*, 114: 1141–1146.
- Horn, B.W. & Dörner J.W., 1998. Soil populations of *Aspergillus* species from section Flavi along a transect through peanut-growing regions of the United States. *Mycologia*, 90: 767–776.
- Horn, B.W., 2005. Colonization of wounded peanut seeds by soil fungi: selectivity for species from *Aspergillus* section Flavi. *Mycologia*. 97: 202–217.
- Huang, X.H., Zhang, X.H., Li, Y.H., Wang, J.L., Yan, X., Xing, L.X., Wang, F.R., 2004. Experimental lung carcinogenic *in vivo* study of aflatoxin G₁ in NIH mice. *Zhonghua Bing*, 33: 260–263.
- IARC, International Agency for Research on Cancer., 1993. Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. IARC, Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 56: 245-395.

- IARC, International Agency for Research on Cancer., 2002. Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. IARC, Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 82: 1-556.
- Isleib, T., Patte, H., Sanders, T., Hendrix, K., Dean, L., 2006. Compositional and sensory comparisons between normal- and high oleic peanuts. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 54: 179-1763.
- Iqbal, S.Z., Asi, M.R., Ariño, A., Akram, N., Zuber, M., 2012. Aflatoxin contamination in different fractions of rice from Pakistan and estimation of dietary intakes. *Mycotoxin Research*, 28: 175-180.
- Iqbal, S.Z., Asi, M.R., 2013. Assessment of aflatoxin M1 in milk and milk products from Punjab, Pakistan. *Food Control*, 30: 235-239.
- Jaimez, J., Fuente, C.A., Vázquez, B.I., Franco, C., Cepeda, A., Mahuizer, G., 2000. Application of the assay of aflatoxins by liquid chromatography with fluorescence detection in food analysis. *Journal of Chromatography A.*, 882: 1-10.
- Joffe, A.Z., 1950. Toxicity of fungi on cereals overwintered in the field (on the etiology of Alimentary Toxic Aleukia). Dissertation, Inst. Bot. Acad. Sci. U.S.S.R., Leningrad. 205 p.
- Jones, S.M., Pons, L., Roberts, J.L., Scurlock, A.M., Perry, T.T., Kulis, M., Shreffler, W.G., Steele, P., Henry, K.A., Adair, M., Francis, J.M., Durham, S., Vickery, B.P., Zhong X., Burcks, A.W., 2009. Clinical efficacy and immune regulation with peanut oral immunotherapy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 124: 292.
- Kamika, I., Takoy, L.L., 2011. Natural occurrence of Aflatoxin B1 in peanut collected from Kinshasa, Democratic Republic of Congo. *Food Control*, 22: 1760-1764.
- Khayoon, W.S., Saad, B., Yan, C.B., Hashim, N.H., Ali, A.S.M., Salleh, M.I., Salleh, B., 2010. Determination of aflatoxins in animal feeds by HPLC with multifunctional column clean-up. *Food Chemistry*. 118: 882–886.

- Kok, W. Th., 1994. Derivatization reactions for the determination of aflatoxins by liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography Biomedical Sciences and Applications*, 659:127-137.
- Lamb, M.C., Sternitzke, D.A., 2001. Cost of aflatoxin to the farmer, buying point, and sheller segments of the southeast United States peanut industry. *Peanut Science*, 28: 58–63.
- Lamuela-Raventos, R.M., Romero-Pérez, A.I., Waterhouse, A.L., De la Torre-Boronat, M.C., 1995. Direct HPLC analysis of cis and trans-resveratrol and piceid isomers in Spanish red *Vitis vinifera* wines. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 43:281-283.
- Lee, N.A., Wang, S., Allan, R.D., Kennedy, I.R., 2004. A rapid aflatoxin B1 ELISA: development and validation with reduced matrix effects for peanuts, corn, pistachio and soyabeans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 2746–2755.
- Li, F., Yoshizawa, T., Kawamura, O., Luo, X., Li, Y., 2001. Aflatoxins and fumonisins in corn from the high-incidence area for human hepatocellular carcinoma in Guangxi, China. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 4122–4126.
- Li, P., Zhang, Q., Zhang, W., Zhang, J., Chen, X., Jiang, J., Xie, L., Zhang, D., 2009. Development of a class-specific monoclonal antibody-based ELISA for aflatoxins in peanut. *Food Chemistry*, 115: 313-317.
- Lisker, N., Michaeli, R., Frank, Z.R., 1993. Mycotoxigenic potential of *Aspergillus flavus* strains isolated from groundnuts growing in Israel. *Mycopathologia*, 122: 177-183.
- López-Hernández, J., Paseiro-Losada, P., Sanches-Silva, A.T., Loge-Yusty, M.A., 2007. Study of the changes of trans-resveratrol caused by ultraviolet light and determination of trans- and cis-resveratrol in Spanish white wines. *European Food Research and Technology*, 225 :789-796.

- Lui, Y., Wu, F., 2010. Global burden of aflatoxin-induced hepatocellular carcinoma: a risk assessment. *Environmental Health Perspectives*, 118: 818–824.
- Lyons, M.M., Yu, C., Toma, R.B., Cho, S.Y., Reiboldt, W., Lee, J., Van Breemen, R.B., 2003. Resveratrol in raw and baker blueberries and bilberries. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 51:5867-5870.
- Manetta A.C., Di Giuseppe, L., Giammarco, M., Fusaro, I., Simonella, A., Gramenzi, A., Formigoni, A., 2005. High-performance liquid chromatography with post-column derivatisation and fluorescence detection for sensitive determination of aflatoxin M₁ in milk and cheese. *Journal of Chromatography A*, 1083: 219–222.
- Makun, H., Dutton, M., Njobeh, P., Mwanza, M., Kabiru, A., 2011. Natural multioccurrence of mycotoxins in rice from Niger State, Nigeria. *Mycotoxin Research*, 27: 97–104.
- Mc Mahon, G., Hanson, L., Lee, J.J., Wogan, G., 1986. Identification of an activated c-Ki-ras oncogene in rat liver tumors induced by aflatoxin B₁. *Proceedings of the National Academy Science*, 118: 9418–9422.
- Mehan, V.K., Mayee, C.D., Jayanthi, S., McDonald, D., 1991. Preharvest seed infection by *Aspergillus flavus* group fungi and subsequent aflatoxin contamination in groundnuts in relation to soil types. *Plant Soil*, 136: 239–248.
- Muscarella, M., Lo Magro, S., Palermo, C., Centonze, D., 2007. Validation according to European Commission Decision 2002/657/ EC of a confirmatory method for aflatoxin M₁ in milk based on immunoaffinity columns and high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Analytica Chimica Acta*, 594:257–264.
- Nageswara, R.C., Wright, G.C., Krosch, S., 2002. Management practices to minimise pre-harvest aflatoxin contamination in Australia peanuts. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 42: 595–605.

- Nakai, V., de Oliveira Rocha, L., González, E., Fonseca, H., Ortega, E., Corrêa, B., 2008. Distribution of fungi and aflatoxins in a stored peanut variety. *Food Chemistry*, 106: 285-290.
- IRAM 32, 1997. Norma del Instituto Argentino de Normalización y Certificación. 1997. Quantifying uncertainty in analytical measurement. Metrologia. Vocabulario VIM. Guide Eurachem-Citac Guide:2000.
- Oga, S., 2003. Fundamentos de Toxicología. 2 ed. São Paulo: Atheneu Editorial. 474p.
- Ok, H.E., Kim, H.J., Shim, W.B., Lee, H., Bae, D.H., Chung, D.H., 2007. Natural occurrence of Aflatoxin B1 in the marketed foods and risk estimates of dietary exposure in Koreans. *Journal of Food Protection*, 70: 2824-2828.
- OPS, Organización Panamericana de la Salud. 1983. Criterios de Salud Ambiental 11. Publicación Científica N° 453. Organización Mundial de la Salud. USA. 131.
- Orallo, F., Alvarez, E., Caminã, M., Leiro, J.M., Gómez, E., Fernández, P., 2002. The possible implication of trans-Resveratrol in the cardioprotective effects of longterm moderate wine consumption. *Molecular Pharmacology*, 61:294-302.
- O'Riordan, M.J., Wilkinson, M.G., 2008. A survey of the incidence and level of aflatoxin contamination in a range of imported spice preparations on the Irish retail market. *Food Chemistry*, 107: 1429-1435.
- O'Riordan, M.J., Wilkinson, M.G., 2009. Comparison of analytical methods for aflatoxin determination in commercial chilli spice preparations and subsequent development of an improved method. *Food Control*, 20: 700-705.
- Paterson, R.R.M., 2007. Aflatoxins contamination in chilli samples from Pakistan. *Food Control*, 18: 817-820.

- Papp, E., H-Otta, K., Zaray, G., Mincsovcics, E., 2002. Liquid chromatographic determination of aflatoxins. *Microchemical Journal*, 73: 39-46.
- Peña, R., Alcaráz, M.C., Arce, L., Ríos, A., Valcárcel, M., 2002. Screening of aflatoxins in feed samples using a flow system coupled to capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography*, 967:303–314.
- Pitt, J.I., Hocking, A.D., Bhudhasamai, K., Miscamble, B.F., Wheeler, K.A., Tamboonek, P., 1994. The normal mycoflora of comondities form Thailand. 2. Beans, rice, small grains and other commodities. *International Journal of Food Microbiology*, 23, 35–53.
- Pitt, J.I., Hocking, A.D., 1997. *Fungi and Food Spoilage*. 2nd Ed. Blackie Academic & Professional, 4.
- Quinto, M., Spadaccino, G., Palermo, C., Centonze, D., 2009. Determination of aflatoxins in cereal flours by solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography and post-column photochemical derivatization- fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 1216: 8636–8641.
- Ravi, K.D., Narayana, K.J.P., Vijayalakshmi, M., 2005. Aflatoxin B1 production in chillies (*Capsicum annum* L.) kept in cold stores. *Journal Biotechnology*, 4: 791–795.
- Razzazi-Fazeli, E., Noviandi, C.T., Porasuphatana, S., Agus, A., & Böhm, J., 2004. A survey of aflatoxins and B1 and total afaltoxin contamination in baby food peanut and corn products sold at retail in Indonesia analysed by ELSA and HPLC. *Mycotoxin Research*, 20: 51-58.
- Reddy, S.V., Mayi, D.K., Reddy, M.U., Thirumala, D.K., Reddy, D.V., 2001. Aflatoxin B1 in different grades of chillies (*Capsicum annum* L.) in India as determined by indirect competitive ELISA. *Food Additives Contaminants*, 18:553-558.
- Reiter, E.V., Vouk, F., Bhm, J., Razzazi-Fazeli, E., 2010. Aflatoxins in rice – A limited survey of products marketed in Austria. *Food Control*, 21: 988–991.

- Roebuck, B.D., Liu, Y.L., Rogers, A.E., Groopman, J.D., Kensler, T.W., 1991. Protection against aflatoxin B1-induced hepatocarcinogenesis in F344 rats by 5-(2-pyrazinyl)-4-methyl-1,2-dithiole-3-thione (Oltipraz): predictive role for short-term molecular dosimetry. *Cancer Research*, 51:5501–5506.
- Saha, D., Acharya, D., Roy, D., Dhar, T., 2007. K. Filtration-based tyramide amplification technique: A new simple approach for rapid detection of aflatoxin B1. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387: 1121-1130.
- Salisbury, J.J., 2008. Fused-Core Particles: A Practical Alternative to Sub-2 Micron Particles. *Journal Chromatography Science*, 46: 883-886.
- Santos, R.C., 2000. BRS 151 L-7: Nova cultivar de amendoim para as condições do nordeste brasileiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 35: 665–670.
- Sarimehmetoglu, B., Kuplulu, O., Haluk Celik, T., 2004. Detection of aflatoxin M₁ in cheese samples by ELISA. *Food Control*, 15: 45–49.
- SIAP, Servicio de Información Agropecuaria y Pesquera. Consultada el 25/Ago/2012 http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=109&Itemid=427
- Shank, R.C., Wogan, G.N., Gibson, J.B., 1972. Dietary aflatoxins and human liver cancer. I. Toxicogenic molds in foods and food stuffs of tropical Southeast Asia. *Food and Cosmetics Toxicology*, 10:51.
- Shenasi, M., Aidoo, K.E., Candlish, A.A.G., 2002. Microflora of date fruits and production of aflatoxins at various stages of maturation. *International Journal Food Microbiology*, 79: 113–119.
- Shundo, L., Navas, S.A., Lamardo, L.C.A., Ruvieri, V., Sabino, M., 2009. Estimate of Aflatoxin M1 exposure in milk and occurrence in Brazil. *Food Control*, 20: 655-657.

- Smela, M., Hamm, M., Henderson, P.T., Harris, C., Harris, T., Essigmann, J., 2002. The aflatoxin B1 formamidopyrimidine adduct plays a major role in causing the types of mutations observed in human hepatocellular carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Science*, 99: 6655–6660.
- Smith, J.E., Moss, M.O., 1985. *Mycotoxins — Formation, Analysis and Significance*. 148 S., 54 Abb., 52 Tab. Chichester-New York-Brisbane-Toronto-Singapore John Wiley & Sons. ISBN: 0–471–90671–9.
- Smith, J.E., Ross, I.C., 1991. The toxigenic *Aspergillus*. In: Smith, J.E. and Henderson, R.S. (Eds.), *Mycotoxins and Animal Foods*. London: CRC Press. 31–61.
- Sobolev, V.S., Cole, R.J., 1999. Trans-resveratrol content in commercial peanuts and peanuts products. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 47:1435-1439.
- Soriano del Castillo, J.M. Editor. 2007. *Micotoxinas en Alimentos*. Ediciones Díaz de Santos. España. 396 pp.
- Stroka, J., Anklam, E., Jorissen, U., Gilbert, J., 2000. Immunoaffinity column cleanup with liquid chromatography using post-column bromination for determination aflatoxins in peanut butter, pistachio paste, fig paste, and paprika powder: collaborative study. *Journal International AOAC*, 83:30–340.
- Stroka, J., Otterdijk, R.V., Anklam, E., 2000. Immunoaffinity column clean-up prior to thin-layer chromatography for the determination of aflatoxins in various food matrices. *Journal of Chromatography A.*, 904: 251–256.
- Suxin, G., Sheng, Z., Aidong, Z., 2013. Privacy-preserving Kruskal–Wallis test. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, 112:13-145.

- Tavcar-Kalcher, G., Vrtac, K., Pestevsek, U., Vengust, A., 2007. Validation of the procedure for the determination of aflatoxin B1 in animal liver using immunoaffinity columns and liquid chromatography with postcolumn derivatisation and fluorescence detection. *Food Control*, 18: 333–337.
- Tokusoglu, O., Uenal, M.K., Yemis, F., 2005. Determination of the phytoalexin resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene) in peanuts and pistachios by high-performance liquid chromatographic diode array (HPLC-DAD) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). *Journal Agriculture Food Chemistry*, 53:5003–5009.
- Trucksess, M.W, Brumley ,W.C., Nesheim, S.,1984. Rapid quantitation and confirmation of aflatoxins in corn and peanut butter, using a disposable silica gel column, thin layer chromatography, and gas chromatograph/mass spectrometry. *Journal of the Association of Official Analytical Chemistry*, 67:973–975.
- Trucksess, M.W., Scott, P.M., 2008. Mycotoxins in botanicals and dried fruits: a review. *Food Additives Contaminants A.*, 25:181–192.
- Tuberoso, C., Kowalczyk, K.A., Sarritzu, E., Cabras, P., 2007. Determination of antioxidant compounds and antioxidant activity in commercial oilseeds for food use. *Journal Food Chemistry*, 103: 1494-1501.
- Turner, P.C., Mendy, M., White, H., Fortuin, M., Hall, A.J., Wild, C.P., 2000. Hepatitis B infection and aflatoxin biomarker levels in Gambian children. *Tropical Medicine and International Health*, 5: 837–841.
- Turner, N., Subrahmanyam, S., Piletsky, S., 2009. Analytical methods for determination of mycotoxins: a review. *Analytica Chimica Acta*, 632: 168-180.
- USDA. United States Department of Agriculture. Food availability (per capita) data system:peanuts and tree nuts., 2011. Consultado el 15 de junio de 2013 12:35:17 PM. http://usda.mannlib.cornell.edu/usda/current/CropProdSu/CropProdSu-01-12-2011_new_format.pdf.

- Vaamonde, G., 1995. Micotoxinas. *En: Toxicología de los Alimentos. Capítulo VIII.* Editor y Coordinador Silvestre A. A., Editorial Hemisferio Sur, 153-157 y 165-173.
- Van Egmond, H.P., Heisterkamp, S.H., Paulsch W.E., 1991. EC-collaborative study on the determination of aflatoxin B1 in animal feeding stuffs. *Food Additives and Contaminants*, 1:17-29.
- Van Egmond, H.P., 2002. Worldwide regulations for mycotoxins. *In: DeVries, J.W., Trucksess, M.W., Jackson, L.S., eds. Mycotoxins and Food Safety*, 257–269.
- Van Egmond, H.P., Schothorst, R.C., Jonker, M.A., 2007. Regulations relating to mycotoxins in food: perspective in a global and European context. *Analytical Chemistry*, 389: 147–157.
- Venkatachalam M, Sathe S. 2006. Chemical composition of selected edible nut Seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 4705-4714.
- Ventura, M., Guillén, D., Anaya, I., Broto-Puig, F., Lliberia, J.L., Agut, M., Comellas, L., 2006. Ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry for the simultaneous analysis of aflatoxins B1, G1, B2, G2 and ochratoxin A in beer. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 20: 3199–3204.
- WHO – World Health Organization., 1979. Mycotoxins Environmental Health Criteria. 1: 21–84.
- Waliyar, F., Ndunguru, B.J., Sharma, S.B., Bationo, A., 1992. Effect of liming and carbofuran on groundnut yield in sandy soils in Niger. *Fertilizer Research*, 33: 203–208.
- Wales, T.E., Fadgen, K.E., Gerhardt, G.C., Engen, J.R., 2008. High-speed and high resolution UPLC separation at zero degrees Celsius. *Analytical Chemistry*, 80: 6815-6820.

- Waliyar, F., Traore, A., Fatondji, D., Ntare, B.R., 2003. Effect of irrigation interval, planting date and cultivar on *Aspergillus flavus* and aflatoxin contamination of peanut in a sandy soil of Niger. *Peanuts Science*, 30: 79-84.
- Wild, C.P., Gong, Y.Y., 2010. Mycotoxins and human disease: a largely ignored global health issue. *Carcinogenesis*, 31: 71-82.
- Wild, C., Turner, C., 2002. The toxicity of aflatoxins as a basis for public health decisions. *Mutagenesis*, 17: 471–481.
- Williams, J.H., Phillips, T.D., Jolly, P.E., Stiles, J.K., Jolly, C.M., Aggarwal, D., 2004. Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences and interventions. *American Society and Clinical Nutrition*, 80: 1106-1122.
- Wu, F., Khlangwiset, P., 2010. Health economic impacts and cost-effectiveness of aflatoxin reduction strategies in Africa: case studies in biocontrol and postharvest interventions. *Food Additives and Contaminants*, 27: 496-509.
- Yu, J., Bhatnagar, D., Ehrlich, K., 2002. Aflatoxin biosynthesis. *Revista Iberoamericana de Micología*, 19:191–200.
- Zhang, X., Wang, F., Wang, J., Yan, X., Huang, X., Xie, T., Zhang, Z., 2003. Experimental lung carcinoma induced by fungi and mycotoxins—a review. *Mycotoxin Research*, 35:4-6.
- Zorzete, P., Reis, A.T., Felício, J.D., Baquião, C., Makimoto, P., 2011. Fungi, mycotoxins and phytoalexin in peanut varieties, during plant growth in the field. *Food Chemistry*, 129:957-964.