



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**“ESTUDIO COMPARATIVO, IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN
DE LAS TOXINAS, MUTÁGENAS Y CANCERÍGENAS, DEL HONGO
Aspergillus spp. LLAMADAS AFLATOXINAS EN PIMIENTAS
BLANCA, NEGRA Y VERDE (*Piper nigrum, L.*) DE MÉXICO,
EGIPTO, INDIA Y TURQUÍA”.**

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO DE ALIMENTOS

PRESENTA
JESÚS ISMAEL GARDUÑO GARCÍA



MÉXICO, D.F.

2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



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: ELBA ROJAS ESCUDERO
VOCAL: JUAN DIEGO ORTIZ PALMA PÉREZ
SECRETARIO: MAGDA CARVAJAL MORENO
1er. SUPLENTE: ARACELI PATRICIA PEÑA ÁLVAREZ
2° SUPLENTE: ILIANA ELVIRA GONZÁLEZ HERNÁNDEZ

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM. DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA. LABORATORIO DE MICOTOXINAS C-119.

ASESORA DEL TEMA:

DRA. MAGDA CARVAJAL MORENO

SUSTENTANTE:

JESÚS ISMAEL GARDUÑO GARCÍA

INDICE

	Página
Jurado.....	ii
Dedicatoria.....	iii
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 la pimienta.....	1
I.1.1. Composición química de la pimienta.....	3
I.2. Importancia económica, producción y consumo mundial.....	4
I.2.1. Producción y consumo mundial.....	5
I.2.2. Producción y consumo en México.....	7
I. 3. Generalidades de las Aflatoxinas (AFs).....	8
I.3.1. Estructura química y propiedades fisicoquímicas.....	11
I.3.2. Efectos en la salud animal y humana.....	12
I.3.3. Mecanismo de acción de la AFB ₁	14
I.3.4. Aflatoxinas en pimienta.....	16
I.3.5. Métodos de control de Aflatoxinas.....	17
I.3.6. Análisis de las Aflatoxinas.....	18
II. Hipótesis.....	20
III. Objetivos.....	21
III.1. General.....	21
III.2. Particulares.....	21
IV. Materiales y Métodos.....	22
IV.1. Diseño experimental. Planteamiento de la metodología.....	22
IV.2. Muestreo, molienda y pesaje.....	23
IV.3. Validación del método en pimientos.....	25
IV.4. Análisis químico.....	27
IV.4.1. Extracción, elución y secado de las muestras.....	27
IV.4.2. Formación de los derivados.....	27
IV.4.3. Cuantificación por Cromatografía de líquidos.....	28
IV.5. Análisis estadístico.....	28
V. Resultados y Discusión.....	29
V.1. Validación del método.....	29
V.1.1. Selectividad.....	29
V.1.2. Linealidad.....	30
V.1.2.1. Curva de AFB ₁	31
V.1.2.2. Curva de AFB ₂	32
V.1.2.3. Curva de AFG ₁	33
V.1.2.4. Curva de AFG ₂	34
V.1.3. Límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ).....	35
V.1.4. Porcentaje de recuperación.....	35
V.2. Concentración de Aflatoxinas en muestras.....	36
V.3. Análisis estadístico.....	42
VI. Conclusiones.....	45
VII. Bibliografía.....	46

LISTA DE TABLAS

No	Descripción	Pág.
1	Proceso para la obtención de pimienta negra y blanca (IICA, 1989).....	3
2	Valor nutrimental en 2 cucharadas de pimienta negra (4.28 g) (Waard & Anunciado, 1999).....	4
3	Producción y comercio mundial de pimienta (FAO, 2010).....	5
4	Países productores de pimienta en el mundo y su producción en toneladas en 2011 (FAOSTAT, 2011).....	6
5	Producción y suministro en toneladas de pimienta en los principales países productores para 2013 (Ned Spice, 2013).....	7
6	Producción de toneladas de pimienta en México (Financiera Rural, 2011).....	7
7	Estados productores de pimienta en México, en 2009 (Financiera Rural, 2011)...	8
8	Límites de tolerancia máxima de Aflatoxinas en cereales para consumo animal según la NOM-188-SSA1-2002 (Norma Oficial Mexicana, 2002).....	10
9	Límites de tolerancia máxima permitidos de aflatoxinas para la India, Egipto, Turquía y México en diferentes alimentos según la legislación correspondiente...	11
10	Muestreo de pimienta en el Distrito Federal.....	23
11	Muestreo de pimientos extranjeros.....	24
12	Pesos moleculares y coeficientes de absorción molar para aflatoxinas en metanol (Trucksess, 2006).....	26
13	Reactivos para preparar 5 L de PBS.....	27
14	Concentraciones de Aflatoxinas (ng mL^{-1}) para las curvas de calibración.....	30
15	Concentraciones ($n=28$) para formar la curva de calibración de AFB_1	31
16	Concentraciones ($n=19$) para formar la curva de calibración de AFB_2	32
17	Concentraciones ($n=26$) para formar la curva de calibración de AFG_1	33
18	Concentraciones ($n=38$) para formar la curva de calibración de AFG_2	34
19	Criterios de aceptación para recuperar residuos y contaminantes en alimentos y agua (SSA, 2011) y Criterios para recuperar aflatoxinas (CE, 2006).....	35
20	Porcentaje de recuperación de las Aflatoxinas por tipo de pimienta.....	36
21	Intervalos de tiempos de retención de cada AF obtenidos en los experimentos de linealidad, selectividad y porcentaje de recuperación	36
22	a. Concentración ajustada ($\mu\text{g Kg}^{-1}$) en un gramo de muestra de pimienta del DF..	37
	b. Concentración ajustada ($\mu\text{g Kg}^{-1}$) en un gramo de muestra de pimienta de Egipto, India y Turquía.....	38
23	Muestras de pimientos más contaminadas por Aflatoxinas y lugar de origen.....	42
24	Prueba estadística de Kruskal-Wallis para Aflatoxinas en pimientos.....	42

LISTA DE FIGURAS

No	Descripción	Pág.
1	Arbusto y fruto de la pimienta.....	1
2	Pimientas verde, blanca y negra.....	2
3	Estructura química de la piperina.....	3
4	Participación estatal en la producción nacional de pimienta en 2009 (Financiera Rural, 2011).....	8
5	Morfología de A) <i>Aspergillus flavus</i> , B) <i>A. parasiticus</i> , C) <i>A. nomius</i> y D) <i>A. pseudotamarii</i>	10
6	Estructura química de las Aflatoxinas.....	12
7	Activación y reacción de AFB ₁ con el ADN (Smela <i>et al.</i> , 2001).....	15
8	Reacción de formación del derivado de AFB ₁ y AFG ₁	18
9	Metodología experimental para el análisis de Aflatoxinas en pimienta.....	22
10	Cromatogramas del experimento de selectividad. 1) Blanco; 2) Pimienta negra; 3) Pimienta blanca; 4) Pimienta verde.....	29
11	Curva de calibración de AFB ₁ . Pendiente (m) = 2.8299 y coeficiente de correlación (R ²) = 0.9973.....	31
12	Curva de calibración de AFB ₂ . Pendiente (m) = 1.7786 y coeficiente de correlación (R ²) = 0.9908.....	32
13	Curva de calibración de AFG ₁ . Pendiente (m) = 1.7607 y coeficiente de correlación (R ²) = 0.9969.....	33
14	Curva de calibración de AFG ₂ . Pendiente (m) = 1.2470 y coeficiente de correlación (R ²) = 0.9988.....	34
15	Concentración de AFB ₁ en muestras de pimienta según su lugar de origen.....	38
16	Concentración de AFB ₂ en muestras de pimienta según su lugar de origen.....	39
17	Concentración de AFG ₁ en muestras de pimienta según su lugar de origen.....	39
18	Concentración de AFG ₂ en muestras de pimienta según su lugar de origen.....	40
19	Aflatoxinas totales en muestras de pimientas según su lugar de origen.....	40
20	Concentración promedio de Aflatoxinas en pimienta negra, blanca y verde. Grupos con una letra (A, B) en común sin diferencias significativas, y grupos con letra diferente sí presentan diferencias significativas (p<0.05).....	43

RESUMEN

Las Aflatoxinas (AFs), bis-dihidro-furanocumarinas, son metabolitos secundarios producidos por mohos del género *Aspergillus spp.* con efectos adversos en la salud humana y animal. La Agencia Internacional para la investigación en Cáncer clasifica a las AFs en el grupo 1 de cancerígenos para humanos. Es por esto que los niveles de AFs en alimentos son regulados mundialmente.

La presente tesis tiene como objetivos la cuantificación e identificación de aflatoxinas (B₁, B₂, G₁ y G₂) en 54 muestras de pimienta (19 de negra, 19 de blanca y 16 de verde), de mercados de Egipto, India, Turquía y de las 16 Delegaciones del Distrito Federal; así como la validación del método experimental empleado para dichos fines.

Los resultados arrojaron que el 100% de las muestras, estuvieron contaminadas con al menos una de las 4 AFs; del total de muestras, el 94.45% (51/54) presentó contaminación por AFB₁, el 79.63% (43/54) de AFB₂, 66.67% de las muestras (36/54) con AFG₁ y 92.59% con AFG₂ (50/54).

Los Intervalos de contaminación presentes fueron: AFB₁ (0.11 a 217.50 µg Kg⁻¹); AFB₂ (0.39 a 381.87 µg Kg⁻¹); AFG₁ (0.4 a 611.88 µg Kg⁻¹) y AFG₂ (1.37 a 494.44 µg Kg⁻¹).

Sólo el 9.26% de las muestras analizadas (5/54) cumplen con el límite establecido por la legislación mexicana, en tanto que todas las muestras extranjeras sobrepasaron los límites permisibles de sus países (Egipto, India y Turquía).

El análisis estadístico reveló que existen diferencias significativas en la contaminación por AFB₂, AFG₁ y AF_t. No se encontraron diferencias significativas en la contaminación de la pimienta verde, que además fue la más contaminada de las 3 pimientas, seguida de la pimienta negra y la pimienta blanca.

ABSTRACT

Aflatoxins (AFs), bis-dihydro-furancoumarins, are secondary metabolites produced by molds of the *Aspergillus sp* genre. With adverse effects in human and animal health. The International Agency for Research on Cancer classifies the natural born AFs in group 1 of proven human carcinogens. AFs in foods are worldwide regulated.

This thesis has as objectives the identification and quantification of AF in 54 pepper samples (19 of black, 19 of white and 16 of green), from the markets of Egypt, India, Turkey and the 16 boroughs of Mexico City; as well as the validation of the experimental method used.

The results show that 100% of the samples were contaminated with at least one of the 4 AFs; from the total of samples the 94.45% (51/54) were contaminated with AFB₁, 79.63% (43/54) with AFB₂, 66.67% (36/54) with AFG₁ and 92.59% with AFG₂ (50/54).

The contamination ranges were for AFB₁(0.11 to 217.50 $\mu\text{g Kg}^{-1}$); AFB₂ (0.39 to 381.87 $\mu\text{g Kg}^{-1}$); AFG₁ (0.4 to 611.88 $\mu\text{g Kg}^{-1}$) and AFG₂(1.37 to 494.44 $\mu\text{g Kg}^{-1}$).

Only 9.26% of the samples (5/54) were under the Mexican legislation limit, all the foreign samples were above the limits of the Mexican, Egyptian, Indian and Turkish regulations.

The statistical analysis show significant differences between the AFB₂, AFG₁ and AFB₁ contamination. No significant differences were found in the green pepper contamination, it was also the most contaminated pepper, afterwards was black and finally white pepper.

I. INTRODUCCIÓN

I.1. Generalidades del cultivo de la pimienta.

La pimienta (*Piper nigrum* L.), es la especia más importante y cotizada del mundo, es un importante ingrediente de muchas recetas para dar sabor a los alimentos. Pertenece a la familia *Piperaceae*, es una liana perenne de 9 metros o más de altura, con un tallo que alcanza hasta los 1.2 cm de diámetro. Sus hojas de punta aguda y color verde brillante, crecen en el intervalo de los 13 a 25 cm de largo. Crece en numerosos racimos que dan un fruto de color verde, luego amarillo hasta llegar a un color rojo (Nelson & Eger, 2011). La planta tiene un promedio de vida de 15 a 25 años. Requiere un clima caliente y húmedo, con precipitaciones anuales entre 1,500 a 2,500 mm, no soporta períodos prolongados de sequía; la temperatura óptima de crecimiento es entre 25 y 30 °C con una humedad del 60 a 93% (Financiera Rural, 2011). La pimienta es considerada como la reina de las especias debido a su gran demanda y a su importancia económica en la historia.



Figura 1. Arbusto y fruto de la pimienta

Los tipos de pimienta se deben a la distinta maduración de los granos de la planta:

- **La pimienta verde** son granos totalmente sin madurar (verdes). Las bayas únicamente se secan o también se preservan en vinagre o ácido cítrico.
- **La pimienta negra** se recoge a la mitad de su maduración, se corta el fruto entero cuando presenta color verde amarillento; las bayas se sumergen en agua hirviendo por 10 minutos lo que propicia el inicio de la fermentación que proporciona el color negro característico,

además de desinfectar la superficie; finalmente se secan al sol alrededor de 14 días para alcanzar una humedad de 12% aproximadamente. Es la más usada desde la antigüedad y corresponde al fruto entero y desecado.

- **La pimienta blanca** es el grano totalmente maduro y sin cáscara, para su producción las frutas maduras se cosechan cuando, alrededor del 75% de los granos, presentan una coloración rojiza a naranja, se remojan por ocho días para quitarles la cáscara y posteriormente se secan hasta obtener la coloración café-blanca característica. Con un sabor un poco más suave que la negra, es también muy usada (Nelson & Eger, 2011).



Figura 2: Pimientas verde, blanca y negra.

La preparación de la pimienta varía según el tipo que se desea obtener, negra o blanca. Los racimos se cosechan cuando algunos granos empiezan a ponerse amarillos o rojos y el secado se hace al sol. Cuando la pimienta madura se seca y se quita la cáscara, removiendo el pericarpio con la epidermis y la parte externa del mesocarpio, se obtiene la pimienta blanca (IICA, 1989). La secuencia de preparación para ambas pimientas se muestra en la **Tabla 1**.

Tabla1. Proceso para la obtención de pimienta negra y blanca (IICA, 1989).

Obtención de la pimienta negra en grano a partir de pimienta fresca en racimos	
Proceso	Parte de la planta obtenida.
Secado	Racimos secos.
Desgranaje	Granos, tallos, pecíolos y residuos.
Cribado	Granos solos.
2° Secado	Granos secos.
2° Cribado	Granos secos y limpios.
Embalaje	Producto para almacenamiento y comercialización.

Obtención de la pimienta blanca en grano a partir de pimienta fresca en racimos	
Proceso	Parte de la planta obtenida.
Remojado de bayas	Granos ablandados.
Lavado	Granos de pimienta blanca.
Secado	Granos de pimienta blanca secos.
Embalaje	Producto para almacenamiento y comercialización.

I.1.1. Composición química de la pimienta.

La pimienta se reconoce por su principal componente pungente, la piperina (1-[5-[1,3-bensodioxol-5-il]-1-oxo-2,4, pentadienil] piperedina), sustancia que resalta, da aroma y sabor a los platillos. Se han reportado otras propiedades de la piperina como el ser bioactiva, inmunomoduladora, anticancerígena, antiasmática, estimuladora, hepatoprotectora, antiinflamatoria (Darshan & Doreswamy, 2004), antimicrobiana (Yang *et al.*, 2002) y con una actividad que previene la formación de úlceras (Bai & Xu, 2000).

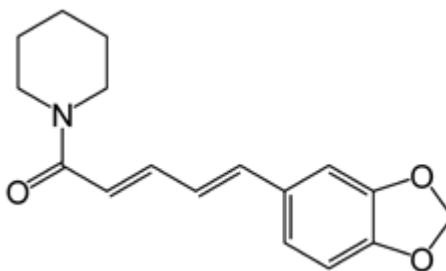
**Figura 3.** Estructura química de la piperina.

Tabla 2. Valor nutrimental en 2 cucharadas de pimienta negra (4.28 g) (Waard & Anunciado, 1999).

Componente	Pimienta negra
Aporte energético (cal)	10.88
Proteína (g)	0.48
Carbohidratos (g)	2.76
Fibra dietética (g)	1.12
Grasa total (g)	0.12
Ácidos grasos saturados	0.04
Ácidos grasos monoinsaturados	0.04
Ácidos grasos poliinsaturados	0.04
Vitamina A (IU)	8.12
Niacina (mg)	0.04
Vitamina C (mg)	0.88
Vitamina E (mg)	0.04
Folato (µg)	0.44
Vitamina K (µg)	6.88

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

De acuerdo con la International Pepper Community (IPC, 2010) esta especia tiene presencia en los cinco continentes y su valor comercializado supera los mil millones de dólares. Los principales países productores de pimienta son Vietnam con 110,000 toneladas métricas (TM) y es el mayor productor en el mundo, seguido por Indonesia 59,000 TM, India 50,000 TM, Brasil 34,000 TM, y China 24,800 TM. México es un importador neto de pimienta negra (*Piper nigrum*), que es la que se comercia en mucha mayor escala en el mercado internacional, pues en nuestro país las exportaciones corresponden típicamente a pimienta gorda (*Pimenta dioica*) (FAO, 2010).

Las importaciones de pimienta por parte de México en 2010 provinieron de 21 países, entre los que se encuentran: Brasil, al que se importó un 76.8% del volumen y un 57.8% del valor; EEUU, 10.2% y 20.3%; India, 5.9% y 9.2%; Vietnam, 4.5% y 5.9%; entre otros países como Indonesia, España, Italia, China, Guatemala (Financiera Rural, 2011).

En México la siembra de pimienta se realiza en su totalidad bajo la modalidad de temporal por tanto depende de las condiciones ambientales para desarrollarse. El periodo de mayor actividad para el corte y recolección es de junio a octubre, cuando el fruto alcanza la

madurez para ser procesado. Son cinco las entidades productoras de pimienta en México: Veracruz, Tabasco, Chiapas, Puebla y Oaxaca. En 2009, la entidad más importante fue Veracruz, que ocupó el 53.5% de la superficie sembrada, el 80.6% del volumen de producción y el 59.2% del valor generado (Financiera Rural, 2011).

I.2.1. Producción y consumo mundial

La pimienta es considerada como la reina de las especias debido a su gran demanda y a la importancia económica en la historia. De acuerdo con información de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), entre 2000 y 2008 la producción mundial de pimienta se incrementó 31.8% al pasar de 314,769 a 414,849 toneladas, lo que implicó una tasa media anual de crecimiento de 3.5% (Financiera Rural, 2011).
































Tabla 3. Producción y comercio mundial de pimienta (FAO, 2010).

Año	Sup. Cosechada (miles Ha)	Producción (miles Ton)	Rendimiento (Ton/Ha)	Cantidad (miles Ton)		Valor (Millones US\$)	
				Exportación	Importación	Exportación	Importación
2000	430.0	314.8	0.7	255.5	250.9	1,010.0	1,000.9
2001	483.5	359.2	0.7	269.6	229.9	523.0	560.6
2002	513.8	390.1	0.8	324.8	261.9	539.4	485.6
2003	500.0	399.9	0.8	292.4	271.9	533.9	530.8
2004	548.7	420.8	0.8	302.3	278.9	522.6	516.7
2005	552.4	436.3	0.8	301.0	282.8	529.6	515.5
2006	567.0	442.1	0.8	333.7	301.6	710.9	637.3
2007	548.2	425.8	0.8	309.8	284.6	1,052.7	950.1
2008	505.8	414.8	0.8	322.6	286.6	1,193.0	1,078.0
2009*	547.2	414.1	0.8	N/D	N/D	N/D	N/D

* = Cifras estimadas; N/D = Información no disponible.

Vietnam es el principal productor de pimienta en el mundo, en 2008 con 98,300 toneladas (22.4% del total mundial) (IPC, 2010); en 2009 produjo 127,000 ton (IPC, 2010), y para 2010 disminuyó su producción en un 13.4%, dando un total de 110,000 ton (IPC, 2010).

Tabla 4. Países productores de pimienta en el mundo y su producción en toneladas en 2011 (FAO, 2011).

País	Producción [tons]	País	Producción [tons]
Benin 	168	Kenia 	232
Bolivia 	855	Kirguistán 	172
Brasil 	44,610	Madagascar 	4,092
Brunei 	27	Malawi 	1,100
Camboya 	2,304	Malasia 	19,456
Camerún 	71	Mali 	17
China 	31,963	México 	3,453
Costa Rica 	1,040	Nigeria 	1,105
Costa de Marfil 	321	Perú 	346
Ecuador 	2,234	Ruanda 	2,750
Etiopía 	868	Santa Lucía 	215
Fiji 	117	Sri Lanka 	25,770
Filipinas 	3,369	Tanzania 	391
Georgia 	68	Tailandia 	4,395
Ghana 	3,082	Tayikistán 	212
Guatemala 	229	Uganda 	1,621
Guyana 	260	Uzbekistán 	197
Honduras 	347	Vietnam 	146,000
India 	52,000	Zambia 	51
Indonesia 	77,800	Zimbabwe 	1,606

El consumo mundial de pimienta se estima alrededor de 350,000 toneladas. Esto ha ido incrementado continuamente. El crecimiento en el consumo ha sido muy limitado en Norte América y Europa, en cambio, países productores como India y China han propiciado dicho incremento. En tanto que el consumo en países no productores de pimienta se estima alrededor de 210,000 toneladas (Ned Spice, 2013).

Tabla 5. Producción y suministro en toneladas de pimienta en los principales países productores para 2013 (Ned Spice, 2013).

País	En existencia	Producción	Consumo	Importaciones	Exportaciones	Existencia final
Indonesia	15,084.0	65,000.0	10,000.0	0.0	60,000.0	10,084.00
Vietnam	20,004.0	142,000.0	57,000.0	8,000.0	137,000.0	27,304.0
Brasil	12,060.0	39,000.0	6,000.0	0.0	35,000.0	10,060.0
India	12,938.0	65,000.0	57,000.0	18,000.0	22,000.0	16,938.0
Malasia	10,098.0	16,000.0	2,800.0	1,500.0	11,000.0	13,798.0
China	11,398.0	35,000.0	45,000.0	13,000.0	2,500.0	11,898.0
Sri Lanka	5,669.0	17,600.0	4,000.0	0.0	11,000.0	8,269.0
Otros	3,325.0	22,000.0	13,000.0	0.0	10,600.0	1,725.0
Total	90,576	401,600.0	143,500.0	40,500.0	289,100.0	100,076.0

I.2.2. Producción y consumo en México

La siembra de pimienta en México se realiza en su totalidad bajo la modalidad de temporal por lo que depende de las condiciones ambientales para desarrollarse. El periodo de mayor actividad para el corte y recolección es de junio a octubre, cuando el fruto alcanza la madurez para ser procesado (Financiera Rural, 2011).

Tabla 6. Producción de toneladas de pimienta en México (Financiera Rural, 2011).

Año	Superficie (Ha)		Producción (Ton)	Rendimiento (Ton/Ha)	Precio medio rural (\$/Ton)	Valor producción (miles \$)
	Sembrada	Cosechada				
2000	5,812.0	3,435.0	4,893.1	1.4	7,669.2	37,526.2
2001	3,480.0	3,478.0	5,016.7	1.4	5,444.8	27,314.7
2002	3,520.5	3,518.5	5,117.0	1.5	8,554.5	43,773.4
2003	3,520.0	3,454.0	5,596.1	1.6	9,592.8	53,682.3
2004	3,705.0	3,639.0	6,127.5	1.7	9,235.2	56,588.6
2005	3,712.0	3,646.0	3,882.6	1.1	12,171.7	47,257.8
2006	3,779.0	3,756.0	4,915.4	1.3	12,044.0	59,201.2
2007	3,789.5	3,741.5	6,854.3	1.8	14,494.3	99,348.3
2008	3,797.5	3,774.5	6,653.5	1.8	9,671.1	64,346.4
2009	3,670.5	3,663.5	6,269.0	1.7	10,118.4	63,431.7
2010*	3,752.5	3,726.5	6,335.1	1.7	11,515.3	72,950.2

* Cifras estimadas

Las entidades productoras de pimienta en México son cinco: Veracruz, Tabasco, Chiapas, Puebla y Oaxaca. En 2009, la entidad más importante fue Veracruz, que ocupó el 53.5% de la superficie sembrada, el 80.6% del volumen de producción y el 59.2% del valor generado.

Tabla 7. Estados productores de pimienta en México, en 2009 (Financiera Rural, 2011).

Entidad	Sup. Sembrada (Ha)	Sup. Cosechada (Ha)	Vol. Producción Toneladas	Valor de producción (miles de \$)	Rendimiento (Ton/Ha)	Precio Medio Rural (\$/Ton)
Veracruz	1,964.0	1,964.0	5,053.7	37,528.9	2.6	7,426.1
Tabasco	1,206.0	1,206.0	900.0	21,218.0	0.8	23,575.6
Chiapas	435.0	435.0	174.0	3,480.0	0.4	20,000.0
Puebla	50.5	50.5	138.5	1,192.3	2.7	8,608.3
Oaxaca	15.0	8.0	2.8	12.6	0.4	4,511.3
Nacional	3,670.5	3,663.5	6,269.0	63,431.7	1.7	10,118.4

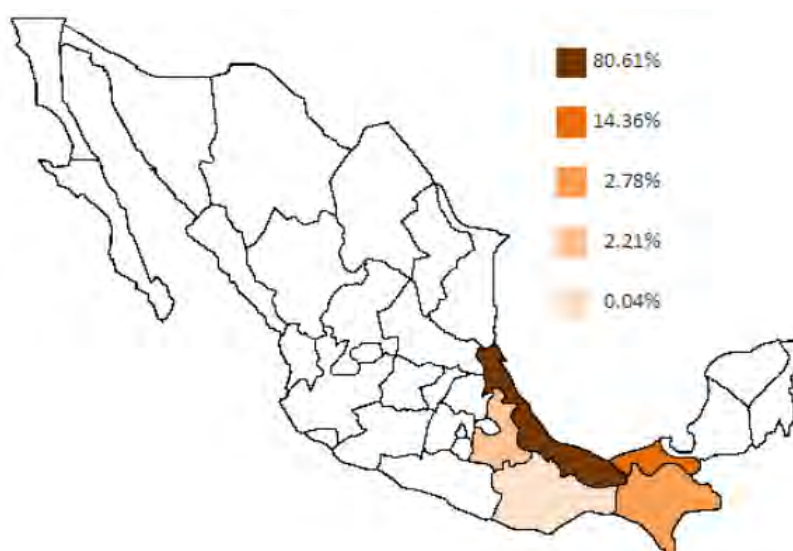


Figura 4. Participación estatal en la producción nacional de pimienta en 2009 (Financiera Rural, 2011).

I.3 Generalidades de las Aflatoxinas (AFs).

Cuando las condiciones de temperatura y humedad son favorables, el crecimiento de mohos ocurre en productos agrícolas procesados y no procesados, incluyendo a las especias (Pariza, 1996; Chu, 1997). Alrededor del 5 al 10 % de los productos agrícolas en el mundo son dañados por mohos al grado de no poder ser consumidos por el hombre y/o animales

(Erkmen & Bozoglu, 2008). El crecimiento de mohos en dichos productos forma metabolitos tóxicos llamados “micotoxinas”, y pueden ser un peligro importante a la salud humana. Entre las 400 micotoxinas conocidas, las AFs son las más peligrosas debido a su alta toxicidad, y a sus propiedades cancerígenas, teratógenas, mutágenas, inmunosupresoras (Eaton & Gallagher, 1994) y hepatotóxicas (Pariza, 1996; Chu, 1997).

Las AFs son metabolitos secundarios altamente tóxicos de *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius* y *A. pseudotamarii*. El crecimiento de estos hongos y la producción de toxinas dependen de muchos factores como pueden ser el tipo de alimento, el grado de acidez, la temperatura o la humedad ambientales, y la presencia de microflora competidora. En términos generales, el crecimiento de *A. flavus* y *A. parasiticus* se da a temperaturas entre los 25 y los 35°C, condiciones de humedad relativa entre el 88 y 95%, pH entre 3.5 y 5.5, y una aw (actividad acuosa) alta. Para el caso particular de *A. flavus* se requiere de una aw de 0.99 y temperaturas entre 20 y 30°C para una producción óptima de las toxinas; en tanto que *A. parasiticus* requiere de un aw de 0.87 y temperaturas entre 28 y 30 °C. Otro factor que influye en el crecimiento de estos hongos, y en particular, la síntesis de las AFs es la composición gaseosa ambiental en la que crece el hongo y la presencia de luz, ya que al ser hongos aerobios, su crecimiento es bueno a concentraciones de CO₂ del 20% y a concentraciones superiores al 10% detienen la producción de AFs (Soriano, 2007).

Los principales tipos de aflatoxinas son: aflatoxina B₁ (AFB₁), aflatoxina B₂ (AFB₂), aflatoxina G₁ (AFG₁), aflatoxina G₂ (AFG₂) y el metabolito hidroxilado de AFB₁ llamado Aflatoxina M₁ (AFM₁). La toxicidad de las AFs en orden decreciente es: AFB₁> AFG₁> AFB₂> AFG₂ (Erkmen & Bozoglu, 2008). Las Aflatoxinas son también potentes cancerígenos, la Agencia Internacional para la investigación en Cáncer (IARC) clasifica a las AFs en el Grupo 1 de cancerígenos probados para humanos (IARC, 2002), es por esto que los niveles de AFs en alimentos son regulados mundialmente. Diversas regulaciones hacen énfasis en concentraciones de AFB₁ y en concentración de aflatoxinas totales (AF_t) que son la suma de AFB₁, AFG₁, AFB₂, AFG₂ y AFM₁.

Para la Unión Europea se estableció un nivel de tolerancia máximo para AFs en especias (entre ellas *Piper spp.*) de 5 µg Kg⁻¹ para AFB₁ y 10 µg Kg⁻¹ para AF_t. Turquía retomó estos límites de tolerancia en un intento por pertenecer a la Unión Europea.

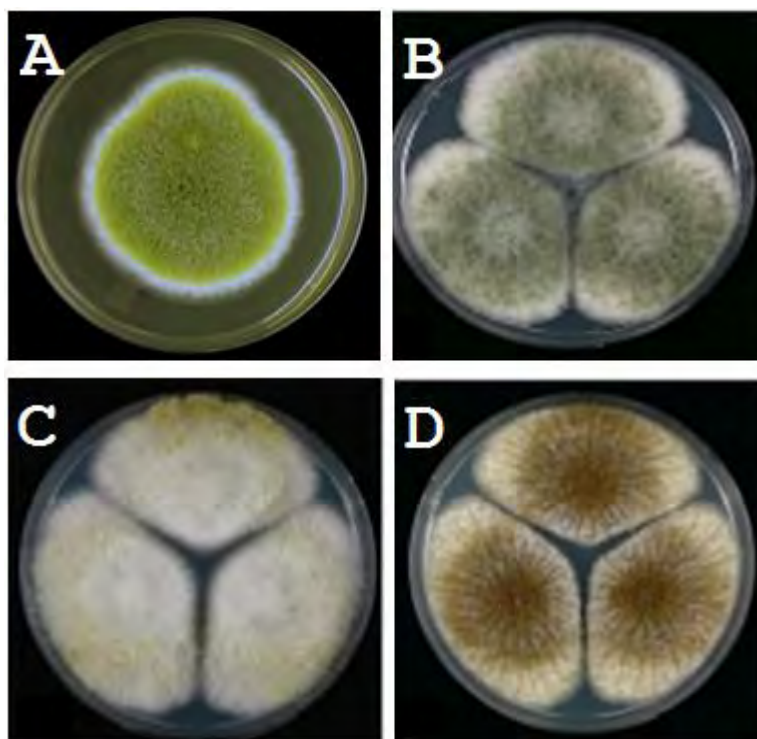


Figura 5. Morfología de A) *Aspergillus flavus*, B) *A. parasiticus*, C) *A. nomius* y D) *A. pseudotamarii*

El *Codex Alimentarius* ha establecido límites de tolerancia máximos para Aft de $15 \mu\text{g Kg}^{-1}$ para algunas nueces (almendras, cacahuates, avellanas, pistaches y nueces de Brasil) destinadas a ser procesadas, en comparación con los $10 \mu\text{g Kg}^{-1}$ permitidos en los mismos alimentos listos para su consumo; esto con base en la información proporcionada por la JECFA (*Codex Alimentarius*, 2008).

Tabla 8. Límites de tolerancia máxima de Aflatoxinas en cereales para consumo animal según la NOM-188-SSA1-2002 (Norma Oficial Mexicana, 2002).

Especie/etapa de producción	Límite máximo $\mu\text{g Kg}^{-1}$
Aves (excepto pollos de engorda)	100
Cerdos en engorda:	
Entre 25 y 45 Kg	100
Mayores de 45 Kg	200
Maduros destinados a reproducción	100
Rumiantes:	
Maduros destinados a reproducción	100
De engorda en etapa de finalización	300

En México la Norma Oficial Mexicana NOM-188-SSA1-2002, para el control de AFs en cereales para consumo humano y animal, estableció un nivel máximo permisible de $20 \mu\text{g Kg}^{-1}$ de AF_t, y también menciona que de observarse concentraciones desde 21 y hasta $300 \mu\text{g Kg}^{-1}$, el cereal únicamente podrá utilizarse para consumo animal. Sin embargo, este nivel además de no haber sido ratificado, es para cereales y no para especias. La pimienta no tiene reglamentación en México.

Tabla 9. Límites de tolerancia máxima permitidos de aflatoxinas para la India, Egipto, Turquía y México en diferentes alimentos según la legislación correspondiente

País	Límite máximo permitido ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)	Alimento	Fuente
India	30 (AF _t)	Todos los alimentos	Food Safety and Standards Authority of India, 2011.
Egipto	10 (AF _t), 5 (AFB ₁)	Cacahuates y cereales	Egyptian Standard UDC 615.91, 2014.
Turquía	10 (AF _t), 5 (AFB ₁)	Especias	Turkish Food Codex Regulation on Contaminants, 2011.
México	20 (AF _t)	Cereales	Norma Oficial Mexicana, 2002.*

* A partir de 2013 esta norma ya no se aplica. AF_t = Aflatoxinas totales.

I.3.1. Estructura química y propiedades fisicoquímicas

Químicamente las AFs son bis-dihidrofurano cumarinas y la unidad de cumarina puede variar y tener configuración tipo pentanona en las AFB₁ y AFB₂, o bien tipo lactona en las AFG₁ y AFG₂. Las AFB₁ y AFG₁ son menos fluorescentes que las AFB₂ y AFG₂, esta propiedad es de utilidad para la cuantificación e identificación de ellas con detectores de fluorescencia. AFB₁ y AFB₂ fluorescen de color azul, en tanto que AFG₁ y AFG₂ lo hacen de color amarillo/verde bajo luz ultravioleta de onda larga (Sargeant, 1963). Sus pesos moleculares oscilan entre 312 y 350 g mol^{-1} , la mayoría son poco solubles en agua, pudiéndose extraer con disolventes orgánicos moderadamente polares, como el cloroformo, acetonitrilo o metanol. Las AFs purificadas en forma cristalina son bastante termoestables, a temperaturas de $260 \text{ }^\circ\text{C}$, de modo que resisten la cocción y tratamiento con microondas (Midio *et al.*, 2001), son estables en un intervalo de pH entre 3 y 10. Los hidroxilados como son las AFM₁ de la leche resisten hasta $320 \text{ }^\circ\text{C}$ de modo que la ultrapasteurización no las degrada.

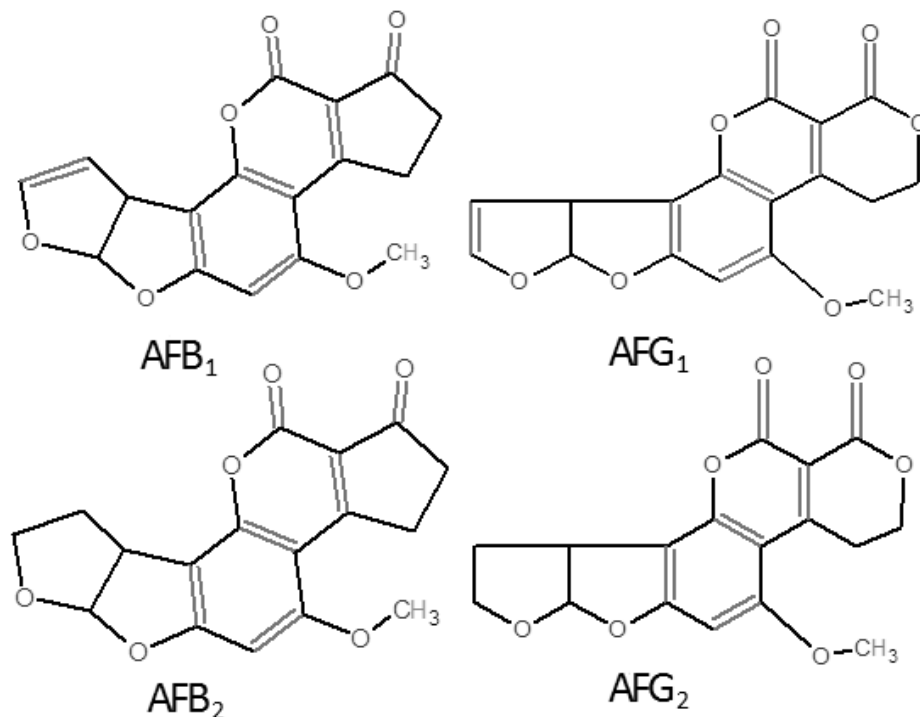


Figura 6. Estructura química de las Aflatoxinas.

I.3.2. Efectos en la salud animal y humana.

Diversos factores que contribuyen a la contaminación de alimentos y piensos por AFs son ambientales, socioeconómicos y en la cadena de producción de alimentos. Las condiciones ambientales de alta humedad y temperatura, favorecen el crecimiento de mohos y por ende la contaminación de alimentos y piensos por AFs. El consumo de alimentos contaminados con aflatoxinas predispone a enfermedades y la muerte; ya sea por alimentos sin procesar o altamente industrializados en varios puntos de la cadena alimenticia (Wagacha & Muthomi, 2008). La intoxicación crónica es la forma más frecuente y se debe al consumo de alimentos contaminados con niveles bajos de AFs durante semanas, meses o años. Los efectos de este consumo crónico de AFs incluyen inmuno-supresión, abortos, malformaciones de fetos, hemorragias, vómitos, diarreas, deficiencia en el crecimiento, presencia de varios tipos de cáncer y muerte dependiendo del tiempo de consumo y cantidades ingeridas. Además se ha sugerido un efecto sinérgico entre la exposición a aflatoxinas y algunas enfermedades tales como la malaria, Kwashiorkor ó VIH/Sida (Gong *et al.*, 2003, 2004).

Se han asociado exposiciones agudas a AFs con epidemias de hepatitis B agudas en zonas de China y África con tasas de mortandad del 10 al 60% (Bhat & Krishnamachari, 1977).

En general, los efectos de las aflatoxinas en humanos se limitan a estudios de casos (Hussein & Brasel, 2001). Un caso en Senegal mostró que el consumo de AF de 5 a 20 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ de peso corporal al día, en 10 meses provocó anomalías en el hígado de niños con Kwashiorkor que pudieron ser diagnosticadas 6 años después por biopsia, debido al consumo de un suplemento proteínico contaminado con AFs para el tratamiento de esta enfermedad (Campbell & Stoloff, 1974).

Estudios de la ingestión de AFs puras, en intentos de suicidio, han demostrado que dosis únicas no son tan efectivas como las dosis a largo plazo. Los síntomas tóxicos en una mujer joven que intentó suicidarse con dosis de AFs puras de 5.5 mg por dos días y 53 mg por 2 semanas (seis meses después de la dosis inicial), incluyeron erupciones en la piel transitorias no pruriginosas, náusea y dolor de cabeza; la mujer se repuso por completo y no presentó signos considerables de lesiones en el hígado tras ser examinada 14 años después (Willis *et al.*, 1980). Dicho caso y otros sugieren que dosis subagudas prolongadas, como las vistas en dietas expuestas en ciertos países, son requeridas para inducir efectos tóxicos letales (Willis *et al.*, 1980; Peraica *et al.*, 1999).

La exposición de AFs se ha asociado también con carcinomas hepatocelulares humanos que empeoran por la presencia del virus de la hepatitis B. Aproximadamente 250 mil muertes son causadas anualmente por este padecimiento en China y África (Groopman *et al.*, 1992). Se han encontrado AFs en tejidos de niños con Kwashiorkor y con síndrome de Reye, y se concluyó que la presencia de AFs contribuye al desarrollo de estas enfermedades (Becroft & Webster, 1972).

Los síntomas en animales no son muy específicos: reducción de la ganancia de peso por menor índice de conversión, disminución de la producción de huevos y leche, y mayor susceptibilidad frente a diversas enfermedades infecciosas. Por ejemplo, se sabe que las AFs se unen al ADN y producen mutaciones y cáncer en ratas (Croy *et al.*, 1978; Bennett *et al.*, 1981; Foster *et al.*, 1983; Muench *et al.*, 1983). Además, depresión del timo, decremento de la función de células T e inmunidad celular son los efectos en bovinos (Paul *et al.*, 1977), ovinos (Fernández *et al.*, 2000), y porcinos (Pang & Pan, 1994).

En general las aves (patos < pavos < pollos) son más susceptibles a las AFs que los mamíferos (perros < cerdos < terneros < ovejas < ganado bovino). Los rumiantes presentan generalmente mayor resistencia a los efectos de estas micotoxinas (Wogan, 1966; Helferich *et al.*, 1986); estudios *in vitro* han demostrado la capacidad de los microorganismos del rumen para degradarlas (Ribelin *et al.*, 1978; Kiessling *et al.*, 1984; Swanson *et al.*, 2000).

Se ha determinado la dosis letal media (DL₅₀) para hembras (7.8 mg Kg⁻¹) y machos 2.2 mg Kg⁻¹ de monos macaco (Campbell & Stoloff, 1974); para patos pequeños (0.4 mg Kg⁻¹), ratas (1.0 mg Kg⁻¹) y ovejas (500 mg Kg⁻¹) (Wogan, 1966). No hay explicación exacta de la gran resistencia en ovejas, pero se piensa que los microorganismos ruminales de esta especie modifican las AFs haciéndoles perder gran parte de su toxicidad (Perusia & Rodríguez, 2001). La DL₅₀ en el cerdo varía de 0.3-0.6 mg Kg⁻¹ de AFB₁ y la dosis en bovinos por vía oral en una sola toma de 4 mg Kg⁻¹ produce la muerte en 15 horas por insuficiencia hepática aguda (Perusia & Rodríguez, 2001).

La AFB₁, es la más tóxica y también la más estudiada respecto a sus efectos cancerígenos y citotóxicos. Por ejemplo, la síntesis de ADN y ARN se inhibe con una dosis de 5 mg Kg⁻¹ de AFB₁ en alimento para ratas por 6 semanas (Butler & Neal, 1977).

I.3.3. Mecanismo de acción de la AFB₁

El hígado es el principal órgano donde se realiza la biotransformación de los xenobióticos por acción de las enzimas de la fase I y II. En términos generales, las enzimas de la fase I, principalmente la superfamilia del Citocromo P450 (CYTP450), convierten los metabolitos en compuestos polares, que reaccionan con las enzimas de la fase II (Ej. Glutación-S-transferasa y epóxido hidrolasa) que catalizan reacciones de conjugación para su excreción biliar y renal. Sin embargo, algunos metabolitos de la fase I pueden reaccionar con diferentes biomoléculas, lo que genera inestabilidad de las mismas (Uribe-Yunda & Navas, 2012).

Esto sucede al formarse el AFB₁-8,9-epóxido, metabolito activo de la AFB₁, con las enzimas microsomales hepáticas CYTP450, se forma un enlace covalente con el nitrógeno 7 (N⁷) de la guanina (Lillehoj, 1991) y se forman aductos de AFB₁-N⁷-guanina (AFB₁-N⁷-Gua) en células blanco (Bailey, 1994). El aducto produce un sitioapurínico en el anillo de imidazol de la guanina, que cuando se abre forma al aducto estable AFB₁-Formamidopirimidina (AFB₁-FAPY), que es el aducto más mutágeno (Smela *et al.*, 2001, 2002). Los resultados de esto

son transversiones de guanina por timina (G → T), reparación y lesiones del ADN, mutaciones, y la subsecuente formación de tumores (Foster *et al.*, 1983). Los carcinomas hepatocelulares en humanos están ligados a la transversión de G → T en el codón 249 del gen p53 supresor de tumores (Wang & Groopman, 1999).

El epóxido reactivo también puede ser hidrolizado a AFB₁-8-9-dihidrodiol que se ioniza para formar una base de Schiff con los grupos amino primarios en las proteínas (Raney *et al.*, 1992). El epóxido AFB₁ es de vida muy corta y se ha asociado también con coagulopatías, por la síntesis reducida de vitamina K y otros factores coagulantes, como resultado de intoxicaciones sub-letales en animales (Bababunmi *et al.*, 1997).

Con respecto a los efectos citotóxicos, la AFB₁ induce a la peroxidación de lípidos en hígado de ratas conduciendo a daño oxidativo de hepatocitos (Shen *et al.*, 1995).

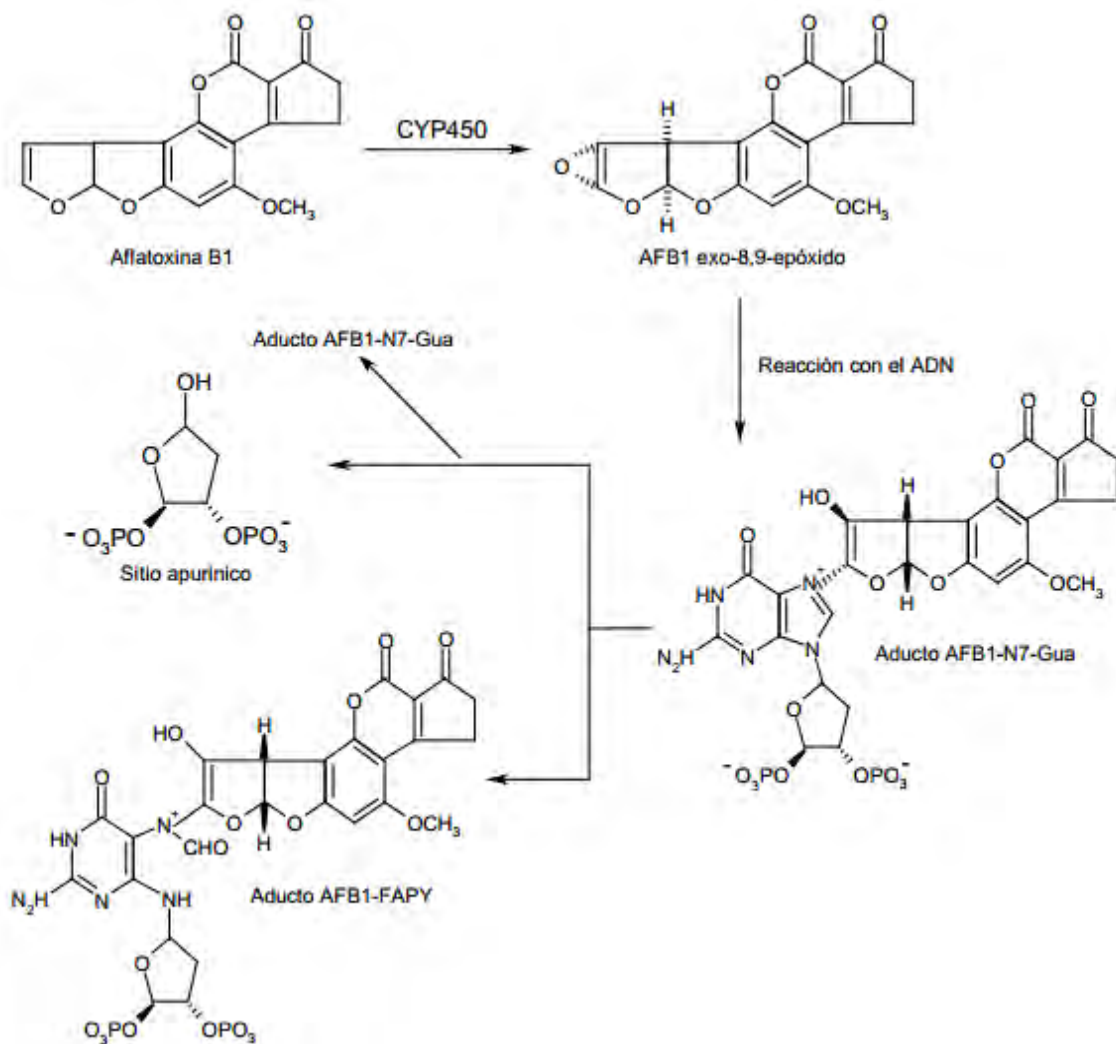


Figura 7. Activación y reacción de AFB₁ con el ADN (Smela *et al.*, 2001)

I.3.4. Aflatoxinas en pimienta.

La contaminación de especias por aflatoxinas es un problema serio a nivel mundial que puede afectar su comercio. La pimienta negra, que es una de las especias más preciadas y valiosas, usualmente presenta contaminación microbiológica y contiene peligrosos microorganismos, esporas y hongos productores de micotoxinas (Jalili & Jinap, 2012). La contaminación de la pimienta, en condiciones no sanitarias y con mohos, se da durante la colecta y el procesamiento, cuando hay periodos largos de secado, especialmente con secado al sol (Banerjee & Sarkar 2003). Por otra parte, la pimienta usualmente se produce en países con clima tropical o subtropical, con temperaturas altas, humedad y precipitaciones abundantes que promueven el crecimiento de mohos y la consecuente producción de micotoxinas (Martins *et al.*, 2001). Las especias, incluyendo a la pimienta contribuyen a producir problemas de salud, ya que frecuentemente se agregan a los alimentos.

Las especias son una matriz que permite el crecimiento de mohos y la subsecuente producción de AFs. En el Reino Unido se encontraron especias contaminadas con AFs por encima de los límites permisibles (MacDonald & Castle, 1996). Martins *et al.* (2001) reportó que el 43% de las 12 diferentes muestras de especias preempacadas en el mercado portugués estaba contaminadas con AFB₁ en distintos niveles. En un estudio realizado en diferentes matrices alimenticias en Qatar se encontró que mezclas de especias y chiles en polvo presentaron contaminación por AFs en intervalos desde los 0.16 a 69.28 µg Kg⁻¹ (Abdulkadar *et al.*, 2004).

Se ha reportado que los aceites esenciales de algunas especias inhiben tanto el crecimiento de los mohos, como la producción de micotoxinas (Karapinar, 1985; Llewellyn *et al.*, 1992; Patkar *et al.*, 1994). Los aceites esenciales de especias, como el clavo, el comino y la pimienta negra, pueden inhibir a los mohos y la formación de las AFs. Hay un efecto inhibitorio de aceites como el eugenol, eugenol acetato, β cariofileno y la piperina (Mabrouk & El-Shayeb, 1980; Madhyastha & Bhat, 1984). Matrices como la pimienta negra y el comino no son sustratos aptos para la biosíntesis de AFs debido a sus aceites esenciales, aunque permiten el crecimiento de los mohos (Bircan, 2005). Esto último concuerda con los estudios de Madhyastha y Bhat (1984), que mostraron que la producción de AFs por *A. parasiticus* en pimienta negra y blanca se veía inhibida por la acción de la piperina y otros aceites esenciales volátiles. Scott & Kennedy (1973), no detectaron AFs en pimientos negra y blanca

molidas, concluyendo que ambas especies no son un sustrato apropiado para la biosíntesis de AFs.

Se ha probado el potencial contra cepas de diversos mohos como *Aspergillus candidus*, *A. versicolor*, *Penicillium citrinum*, *P. aurantiogriseum*, *P. brevicompactum*, y *P. griseofulvum*) de extractos de pimienta dioica *in vitro*, e *in situ* contra los mohos contaminantes de granos de avena post-cosecha (principalmente *Fusarium spp.*, *Alternaria spp.* y *Cladosporium spp.*); donde se encontró que los extractos de pimienta dioica inhibieron *in vitro* el crecimiento fúngico (Scholz *et al.*, 1999).

I.3.5. Métodos de control de AFs

Debido a su alta toxicidad las AFs han recibido especial atención en los últimos años, y se ha tratado de eliminar o reducir estas toxinas en los alimentos. Buenas prácticas agrícolas, como una humedad adecuada, control de la hierba y rotación de los cultivos, suelen ser el mejor método para el control de AFs. El riego de sembradíos, el secado rápido y mecánico, y la cosecha temprana pueden reducir los niveles de contaminación de AFs (Pitt, 2013).

Existen **Métodos Biológicos** de destoxificación de micotoxinas que consisten en aplicar cepas no toxicogénicas de *Aspergillus flavus* u otros mohos (Dorner *et al.*, 2003). Los **Métodos Físicos** son extracción, calentamiento, adsorción con agentes adsorbentes y radiación (Castells *et al.*, 2006; Herzallah *et al.*, 2008). Los **Métodos Químicos** son tratamiento con amoníaco, bisulfito de sodio, hidróxido de calcio, formaldehído, antioxidantes u otros productos químicos (Doyle & Marth, 1978; Méndez-Albores *et al.*, 2007).

La infestación de insectos en productos agrícolas promueve la inoculación de hongos y la subsecuente contaminación de aflatoxinas. Los insectos dañan la superficie de los frutos, creando rutas infecciosas para patógenos fúngicos que pueden ser propagados por acción de los mismos insectos vector (Abbas *et al.*, 2013), así, el control de plagas es de gran importancia para el control de las AFs.

El control de plagas con la toxina Bt producida por *Bacillus thuringiensis* (uno de los primeros agentes de control procarionte) ha sido efectivo y se ha usado comercialmente en Francia desde 1938. La toxina Bt, es segura en alimentos para personas, o en piensos para animales. La investigación en el tema ha llevado al descubrimiento de más de 220 tipos de toxinas Bt de diferentes cepas, actividades y especificidades contra diferentes insectos (Martin & Travers, 1989).

I.3.6. Análisis de las Aflatoxinas

El análisis de AFs en especias no es simple, por la interferencia de materiales altamente coloreados que se extraen conjuntamente con las AFs. Los métodos analíticos usados para la determinación de AFs incluyen a la cromatografía en capa fina, la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) con detectores de fluorescencia (Bacaloni *et al.*, 2008), y los ensayos ligados a enzimas inmovilizadas (ELISA) (Hu *et al.*, 2006).

Las muestras con altos contenidos de lípidos y pigmentos de la matriz hacen el análisis de AFs más difícil debido a las interferencias con estos compuestos. Es necesaria una extracción selectiva y una purificación específica para las AFs, antes de su cuantificación. Las columnas de inmunoafinidad, con anticuerpos específicos contra las AFs, son eficientes en su purificación y concentración, dando una solución rápida y simple a las interferencias (Cho *et al.*, 2008).

Como las AFs tienen diferentes fluorescencias (360-362 nm), para darle más sensibilidad al método de cuantificación, se aplica una reacción de formación de derivados, que consiste en una hidrólisis ácida en las dobles ligaduras del anillo dihidrofurano para la producción de los tipos de AF B_{2a} y G_{2a}, cuya fluorescencia es comparable a la que presentan las AFB₂ y AFG₂ en solución acuosa (Kok, 1994).

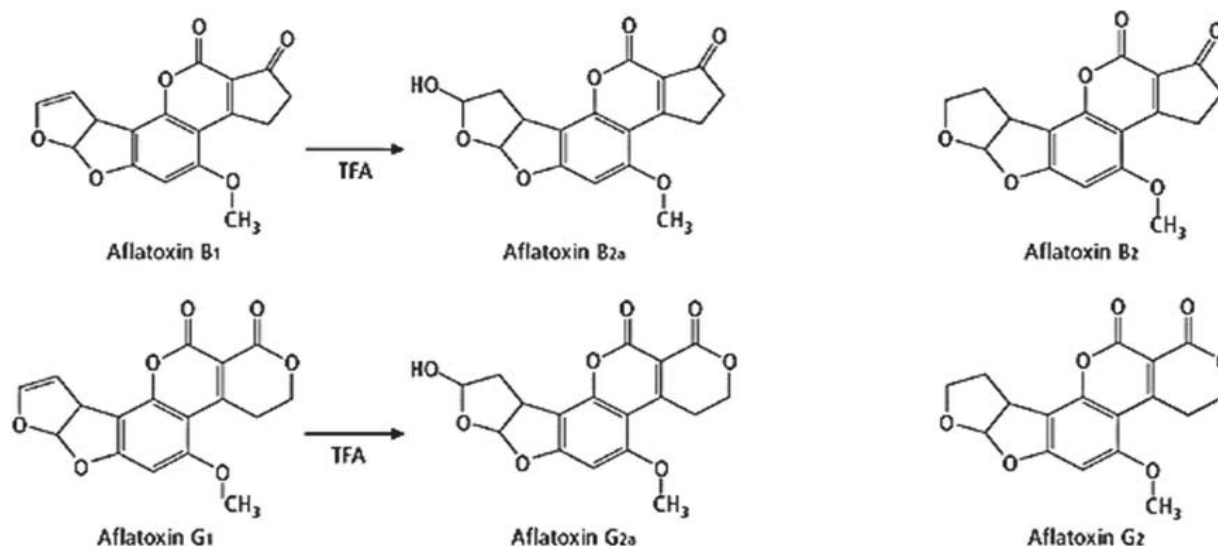


Figura 8. Reacción de formación del derivado de AFB₁ y AFG₁.

Esta reacción se lleva a cabo comúnmente con la adición de ácido trifluoroacético (TFA), acetonitrilo y hexano. La reacción puede llevarse a temperatura ambiente, aunque si

se eleva la temperatura, la velocidad de la reacción también se ve incrementada. Usualmente esta reacción se lleva a 65°C por 8.5 minutos (Pons *et al.*, 1972; Takahashi, 1977) ó por 10 minutos (Beebe, 1978; Diebold & Zare, 1977; Hurst *et al.*, 1982; Haghighi *et al.*, 1981; Wilson & Romer, 1991).

II. HIPÓTESIS

Como la contaminación de especias por AFs es frecuente y en ocasiones rebasa los límites establecidos por la legislación internacional, es posible que la pimienta comprada y consumida en México, Egipto, Turquía e India también presente alta contaminación por estos microorganismos y aporte cancerígenos a la dieta del hombre.

III. OBJETIVOS

III.1. General

Identificar, cuantificar y comparar la presencia de las AFs (AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂) presentes en 3 tipos de pimienta (verde, negra y blanca) de uso común en la gastronomía de países como México, Egipto, Turquía e India.

III.2. Particulares

- Validación del método químico para extracción, purificación y cuantificación de AFs para las pimientas negra, verde y blanca.
- Realizar las curvas de calibración de AFs (AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂) para medir la concentración de las muestras por Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).
- Extraer y purificar las AFs presentes en las pimientas negra, verde y blanca.
- Cuantificar las AFs (B₁, B₂, G₁ y G₂) por HPLC en los tres tipos de pimienta analizadas.
- Comparar estadísticamente los contenidos de AFs en las pimientas negra, verde y blanca.
- Cotejar el contenido de AFs en los tres tipos de pimienta con el límite de tolerancia máximo permitido para la legislación vigente de cada país.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

IV.1. Diseño experimental. Planteamiento de la metodología

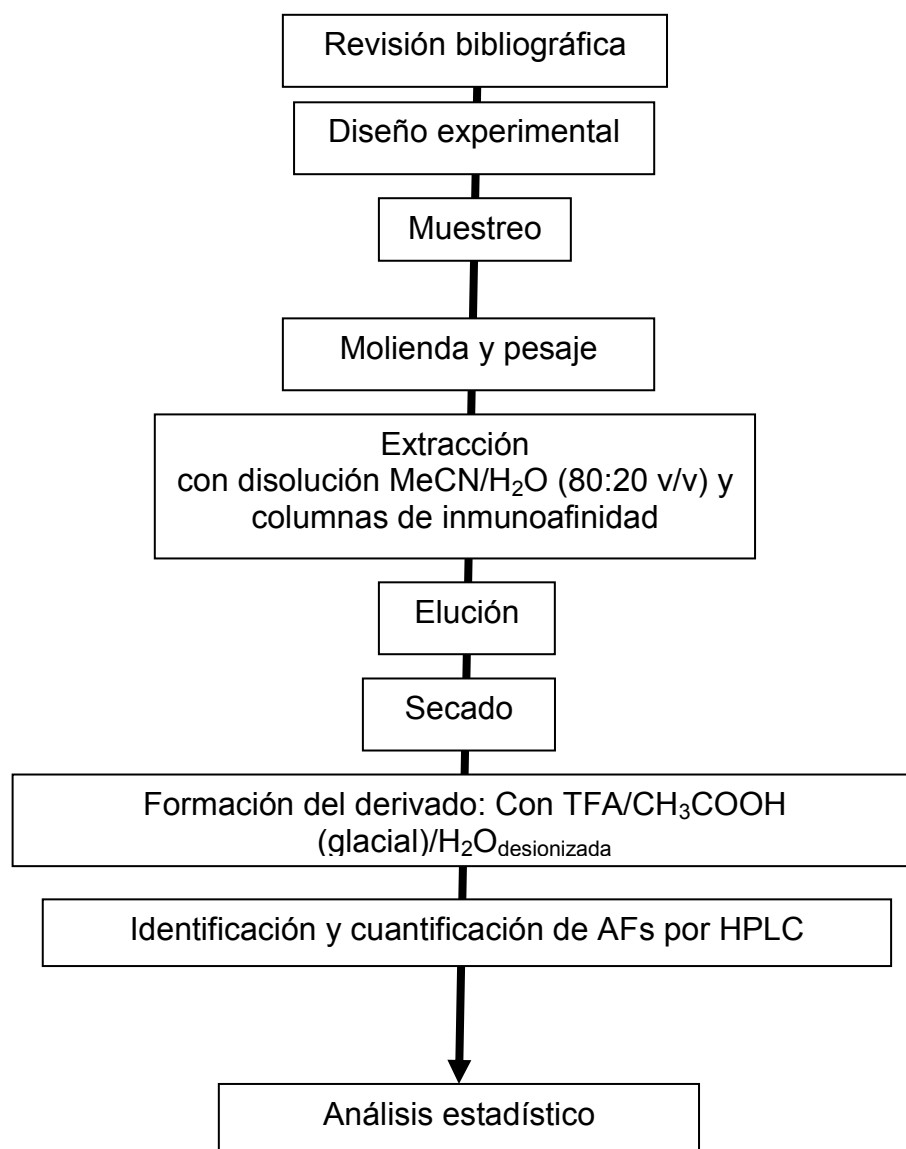


Figura 9. Metodología experimental para el análisis de Aflatoxinas en pimienta.

IV.2. Muestreo, molienda y pesaje.

Se tomaron muestras de las tres pimientas en tres mercados de cada Delegación del D.F., cada muestra consistió de 50 g de pimienta (blanca, negra y verde).

Tabla 10. Muestreo de pimienta en el Distrito Federal.

Delegación	Mercado y Dirección
Álvaro Obregón	Corpus Christi. La Paz esq. con San Luis. Col. Corpus Christi 01530. D.F.
	Olivar del Conde. Agustín Lara y Callejón del Mercado. Col. Olivar del Conde 2a. Sección 01408. D.F.
	Melchor Múzquiz. Av. Revolución y Melchor Múzquiz. Col. San Ángel 01000. D.F.
Azcapotzalco	Azcapotzalco. Esperanza y Av. Azcapotzalco. Col. Barrio San Simón 02009. D.F.
	Pro Hogar. Calle 12 esq. con Calle 19. Col. Pro Hogar 02600. D.F.
	Nueva Santa María. Vid esq. con Av. Clavelinas. Col. Nueva Santa María. 02800. D.F.
Benito Juárez	Portales. Santa Cruz S/N, Col. Portales 03300 México, D.F.
	Mixcoac. Revolución S/N, Col. Mixcoac 03849 México D.F.
	Independencia. Eje 6 Sur e Independencia S/N, Col. Independencia 03630. D.F.
Coyoacán	Coyoacán. Ignacio Allende s/n, Col. Del Carmen 04100 D.F.
	Ajusco Moctezuma. Mixtecas 92 Col. Ajusco 04300 D.F.
	Sto. Domingo, Las Rosas. Papalotl s/n Col. Pedregal de Sto. Domingo, 04369. D.F.
Cuajimalpa	Rosas Torres. San José de los Cedros y Sauce. Col. San José de los Cedros. CP. 05200. DF.
	Cuajimalpa. Av. Veracruz y Ocampo. Col. Manzanito 05040. D.F.
	Contadero. 16 de septiembre y Mariano Escobedo. Col. Loma de la papa. 05088. D.F.
Cuauhtémoc	Arcos de Belén. Arcos de Belén y Dr. Valenzuela. Col. Centro. 06010 D.F.
	San Juan. Calle Ernesto Pugibet 71. Col. Centro. 06010. D.F.
	Hidalgo. Av. Dr. Balmis y Dr. Barragán. Col. Obrera. 06800. D.F.
Gustavo A. Madero	Mercado Río Blanco. Oriente 95 y H. Congreso de la Unión. Mártires de Río Blanco 07880. D.F.
	La Estrella. Obsidiana y Escuela. Col. Estrella 07810. D.F.
	Martín Carrera. José J. Herrera y Gral. V. Guerrero. Col. Martín Carrera. 07070 D.F.
Iztacalco	San Miguel Iztacalco. Eje 3 Ote. Francisco del Paso y Troncoso esq. Julio García. Col. Barrio de San Miguel 08650 D.F.
	Santa Anita. Eje 1 Ote y Av. Andrés Molina Enríquez. Col. Viaducto Piedad 08200 D.F.
	Mercado Tlacotal. Calle Ote 100 y Sur 123. Col. Gabriel Ramos Millán. 08730 D.F.
Iztapalapa	Central de Abasto. Eje 6 Sur y Río Churubusco. Col. Central de Abasto. 09040. D.F.
	Santa Cruz Meyehualco. Calle 55 y Calle 4. Col. Santa Cruz Meyehualco 09290, D.F.
	Jacarandas. Calle Manlio Fabio Altamirano. Col. Jacarandas 09280, D.F.
La Magdalena Contreras	Cerro del Judío. Av. San Bernabé e Independencia. Col. Barros Sierra 10380, D.F.
	La Loma. José Moreno Salido y Fresno. Col. Pueblo Nuevo Bajo 10640, D.F.
	Turístico La Magdalena. Magdalena y Emilio Carranza. Col. Rancho Totolapan. 56580, D.F.

Tabla 10. Continuación.

Delegación	Mercado y Dirección
Miguel Hidalgo	Tacubaya. Arq. Carlos Lazo y Arq. Luis Ruiz. Col. Observatorio 11860, D.F.
	Plutarco Elías Calles, “El Chorrillo”. Melchor Múzquiz y Parque Lira. Col. San Miguel Chapultepec 11850, D.F.
	Argentina. Lago Atitlán y Lago Viedma. Col. México Nuevo 11260, D.F.
Milpa Alta	San Antonio Tecómitl. Calle 5 mayo Col. San Antonio Tecómitl 12100, D.F.
	Benito Juárez. Yucatán Sur. Col. Villa Milpa Alta. 12000, D.F.
	San Pedro Actopan. Francisco I. Madero. Col. San Pedro Atocpan 12200, D.F.
Tláhuac	Colonia del Mar. Calle Camarón. Col. del Mar 13270, D.F.
	La Nopalera. Calle Falsta. Col. La Nopalera. 13220, D.F.
	Tláhuac. General Severino Cisneros. Col. La Magdalena 13070, D.F.
Tlalpan	Tlalcoligia. Cristóbal Colón S/N, Colonia Tlalcoligia, 14430, D.F.
	Torres de Padierna. Calle Tixpehual, Colonia. Torres de Padierna 14209, D.F.
	De la Luz. Calle Francisco I. Madero Colonia. Tlalpan Centro. 14000, D.F.
Venustiano Carranza	La Merced. Eje 1 Ote. Anillo de Circunvalación y Av. Adolfo Gurrión. Col. Merced Balbuena. 15810, D.F.
	San Ciprián. Av. Gral. Anaya y San Ciprian. Col. El Parque 15960, D.F.
	Jamaica. Av. H. Congreso de la Unión esq. con Av. Morelos. Col. Jamaica 15800, D.F.
Xochimilco	Xochimilco. Av. José Ma. Morelos y Vicente Guerrero. Col. Barrio El Rosario 16070, D.F.
	San Gregorio Atlapulco. Calle Belisario Domínguez. Col. San Gregorio Atlapulco. 1660, D.F.
	Tulyehualco. Av. División del Norte. Col. Santiago Tulyehualco. 16700, D.F.

En tanto que las muestras del extranjero se obtuvieron de mercados locales: mercado de Luxor en Egipto; mercado de Bophal en la India; mercado de Estambul en Turquía. **Tabla 11.**

Tabla 11. Muestreo de pimientas extranjeras

País	Pimienta	Mercado
Egipto	Negra	Mercado de Luxor
	Blanca	
India	Negra	Mercado de Bophal
	Blanca	
Turquía	Blanca	Mercado de Estambul
	Negra	

Para las muestras de pimienta verde sólo se obtuvieron muestras de 25 g en el DF debido a la escasez del producto y a su elevado precio, en tanto que no se contó con pimienta verde para las muestras extranjeras.

La molienda se realizó con las muestras enteras de cada pimienta en picadora (Moulinex® Modelo AR6838C6). Posteriormente se pesaron por separado 17 g de cada pimienta molida por mercado de cada Delegación, y se mezclaron para obtener una muestra compuesta de 51 g. Para las muestras extranjeras se realizó lo mismo sólo que se pesaron directamente los 51 g de muestra.

IV.3. Validación del método en pimientos.

La validación es el proceso que establece, mediante estudios de laboratorio, que el método químico satisface los requisitos para aplicarlo al análisis de las muestras (SSA, 2011). La validación del método se basó en el Reglamento 401/2006 (Comisión Europea, 2006) y en los Criterios para la validación de métodos fisicoquímicos (SSA, 2011) con los siguientes criterios:

a. Selectividad.

Es la habilidad de un procedimiento químico para diferenciar a las 4 AFs de otros componentes de una matriz compleja. Se marcaron las 3 matrices de la pimienta (verde, negra y blanca) por separado, con una mezcla de los cuatro estándares de AFs (100 ng/ de cada uno) se analizó el cromatograma con las muestras enriquecidas para ver si existía sobre posición de los picos cromatogramas y checar los tiempos de retención.

b. Linealidad.

Es la habilidad del método analítico de obtener en las curvas de calibración proporcionalidad entre la respuesta y la concentración de las AFs. Para esto se partió de una solución madre de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ (1000 ng mL^{-1}) de cada patrón de AF (Sigma-Aldrich, St. Louis MO, USA). Para su preparación se diluyeron por separado los estándares, de concentración desconocida, con una mezcla de benceno/acetonitrilo (98:2 %v/v) (Trucksess, 2006), se homogeneizó y se midió la absorbancia empleando un espectrofotómetro UV-Visible (Genesys 10uv, Termo Electron Corporation. Madison Wisconsin, EEUU), el cual se ajustó al cero de absorbancia usando como blanco una solución de metanol en una celda de cuarzo de un mL. Con la absorbancia del estándar de AF en el espectrofotómetro, se aplicó la siguiente ecuación para obtener 1 mL de AF a concentración de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Trucksess, 2006):

$$1 \frac{\mu g AF}{mL} = \frac{A * PM * 1000}{\epsilon}$$

Donde: **A**, es la absorbancia a 360-362 nm; **PM**, el peso molecular de cada aflatoxina; y **ε**, el coeficiente de absorción molar

Tabla 12. Pesos moleculares y coeficientes de absorción molar para aflatoxinas en metanol (Trucksess, 2006).

Aflatoxina	Peso Molecular (g mol ⁻¹)	Coefficiente de extinción molar (Abs. UV a 360-362 nm)
B ₁	312	21,800
B ₂	314	24,000
G ₁	328	17,700
G ₂	330	17,100

Ya con las disoluciones de 1000 ng mL⁻¹ se hicieron 16 diferentes concentraciones (0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 200, 600, 800, y 1000 ng mL⁻¹) de cada una de las cuatro AF y con ellas se obtuvieron las curvas de calibración usando el programa Excel.

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

El LOD corresponde a la concentración más baja que se registra o da señal en el cromatógrafo de líquidos. El LOQ es la concentración más baja a la cual el analito puede cuantificarse con precisión y veracidad bajo las condiciones experimentales establecidas y corresponde a 5 veces el LOD (MSCR, 2002). Ambos límites se obtienen de las curvas de calibración.

d. Porcentaje de recuperación.

Es la cantidad de AF recuperada de una muestra adicionada y sometida al método analítico completo, nos permite evaluar la eficiencia del método entero y se expresa como porcentaje. Para su realización se fortificó 1 g de cada matriz con 100 ng de AF (AFB₁, AFB₂, AFG₁, y AFG₂) por separado, y se les aplicó el método completo. Este criterio es de suma importancia ya que nos permite realizar el ajuste de concentración de AFs en las muestras y así obtener los resultados reales de las mismas.

IV.4. Análisis químico

IV.4.1. Extracción, elución y secado de las muestras.

Cada muestra representativa de 51 g de pimienta se licuó por 1 minuto (licuadora Black & Decker “Crush Master”) con 100 mL de una solución de acetonitrilo (MeCN) grado HPLC (J.T. Baker, Xalostoc, México) / agua destilada (60:40 v/v) y 2 g de cloruro de sodio (J.T. Baker, Xalostoc, México).

Los extractos se filtraron utilizando papel filtro de poro fino, a 2 mL del filtrado se les adicionó 48 mL de solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS) a pH 7.4, se agitó manualmente y se pasó la mezcla a través de una columna de inmunoafinidad (Easi-Extract Aflatoxin Cat N° RP71/RP70N, Biopharm Rhône Ltd. Glasgow, Scotland) previamente equilibrada con 20 mL de PBS, con jeringa de 50 mL en un soporte. Se lavó la columna con 20 mL de agua destilada y se eluyó.

Tabla 13: Reactivos para preparar 5L de 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	NaCl	400.0 g
Azida Sódica	N° Cat. V01	NaN ₃	2.5 g
Agua destilada		H ₂ O	Aforar a 5L

Para eluir se pasó aire por la columna para secarla, después se pasaron lentamente 1.5 mL de metanol (MeOH) grado HPLC (J.T. Baker, Xalostoc, México) para separar las AFs adheridas a los anticuerpos anti-aflatoxina del gel de agarosa de la columna. Finalmente, se pasaron 1.5 mL de agua destilada para recuperar los residuos haciendo un movimiento de reflujo para romper el gel de agarosa, dejar libres a las AF y asegurar una completa recuperación. Estos eluidos se colectaron en viales ámbar etiquetados y se secaron a 40°C en un horno (Novatech BTC-9100).

IV.4.2. Formación de los derivados.

Los estándares de cada AF se evaporaron a sequedad y se resuspendieron con 200 µL de MeCN; con el fin de aumentar su fluorescencia se adicionaron 800 µL de la disolución formadora de derivados. Esta disolución contiene: 5 mL de ácido trifluoroacético (Sigma-

Aldrich, St. Louis MO, USA) + 2.5 mL de ácido acético glacial (Merck, Naucalpan, Edo. Mex., México) + 17.5 mL de agua desionizada, se agitó la mezcla en un agitador orbital (Vortex G-560, Bohemia, N.Y., EEUU) por 30 segundos. Los viales se mantuvieron en baño María (Aparatos de Laboratorio BG, Mod. BM 40T) a 60 °C por 10 minutos (Akiyama *et al.*, 2001; Kok, 1994). Posteriormente se dejaron a temperatura ambiente y 20 µL del derivado formado se analizaron por HPLC. Para las muestras se siguió el mismo procedimiento

IV.4.3. Cuantificación por Cromatografía de líquidos.

El análisis de los estándares de AF y de los extractos obtenidos de cada muestra se realizaron en un equipo HPLC Agilent Series 1200, con bomba isocrática (G1310A Serie DE62957044), detector de fluorescencia (G1321A Serie DE60456380) y automuestreador (G1329A Serie DE64761666); una columna cromatográfica Agilent Eclipse XDS-C18, 4.6 x 250 mm y 5 µm de diámetro de partícula. Se utilizó el programa para HPLC ChemStation 32, con las siguientes condiciones de análisis:

- Fase móvil: H₂O/MeCN/MeOH (65:15:20 v/v/v).
- Volumen de inyección: 20 µL.
- Flujo: 1 mL min⁻¹.
- Tiempo de análisis: 25 minutos.
- Longitud de onda de excitación: 362 nm.
- Longitud de onda de emisión 425 nm para AFB₁ y AFB₂, y 450 nm para AFG₁ y AFG₂.

IV.5. Análisis estadístico.

Se compararon los resultados con el porcentaje de recobro de las muestras de las tres pimientos por Delegación del Distrito Federal, así como las muestras de Egipto, India y Turquía. Con el fin de encontrar las diferencias entre el lugar de origen de la muestra y los tres estados de maduración de la pimienta, se realizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y la prueba de Intervalos de Wilcoxon para encontrar las diferencias para cada grupo.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

V.1. Validación del método

V.1.1. Selectividad

Después del análisis realizado a los tres tipos de pimienta fortificada con 100 ng g^{-1} de las 4 AFs y el blanco, los cromatogramas obtenidos son los siguientes:

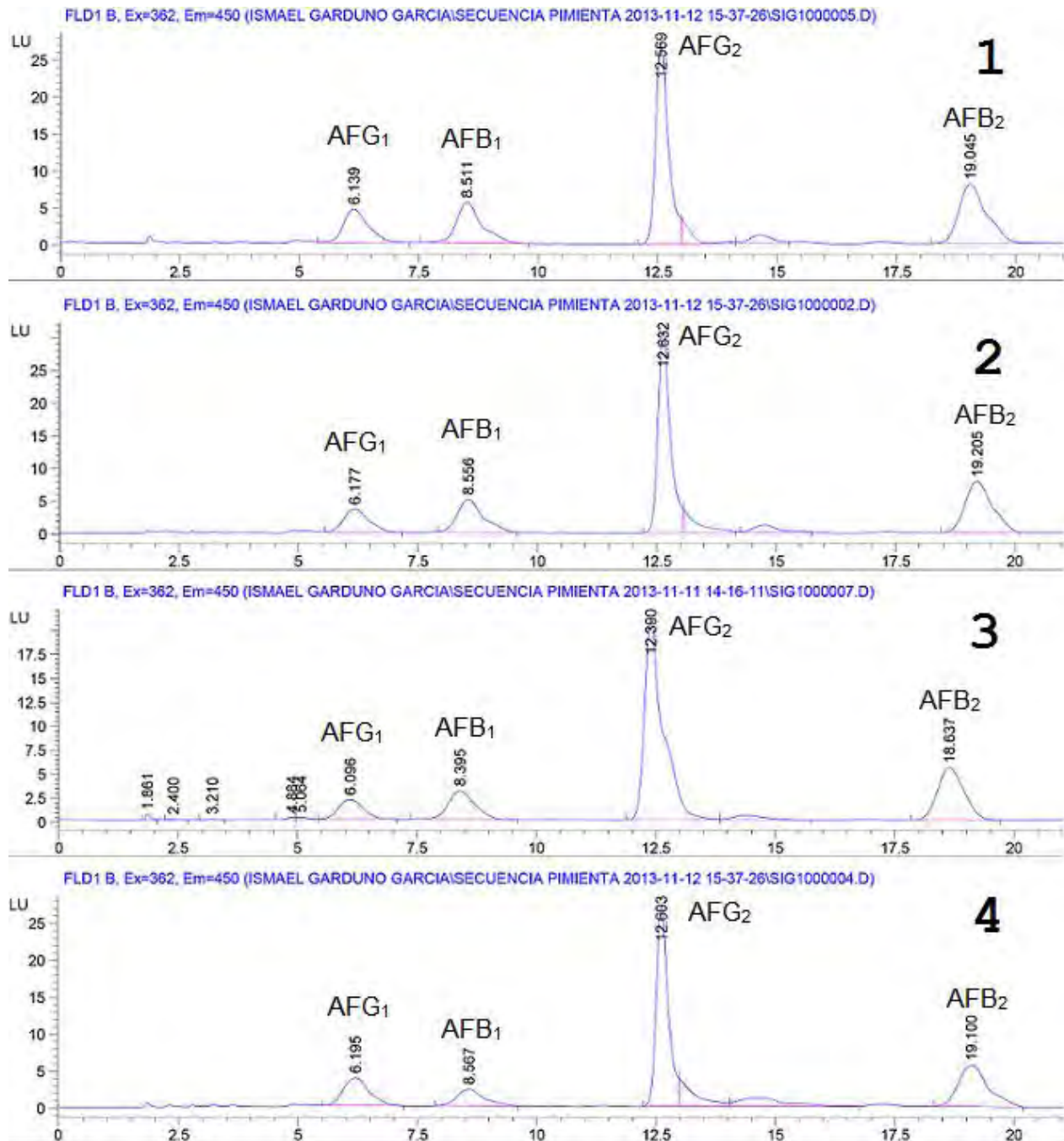


Figura 10. Cromatogramas del experimento de selectividad. 1) Blanco; 2) Pimienta negra; 3) Pimienta blanca; 4) Pimienta verde.

La **Figura 10** muestra claramente las señales de las 4 AFs, el primer pico cromatográfico (~ 6 min) corresponde a AFG₁, el segundo a AFB₁ (~ 8.5 min), el tercero a AFG₂ (~ 12.5 min) y el cuarto a AFB₂ (~ 19 min). El orden de elución de los analitos no cambia por efecto de las diferentes matrices, la resolución entre los picos cromatográficos de las AFs es mayor a 1.5, además de que no existe interferencia con algún otro compuesto de la matriz.

V.1.2. Linealidad

Se realizaron las curvas de calibración con las diferentes concentraciones (**Tabla 14**) para las 4 AFs. Las diluciones que presentaron resultados positivos se muestran en las **tablas (14 a 18)** y **Figuras (11 a 14)** para cada curva patrón de AF.

Tabla 14. Concentraciones de Aflatoxinas (ng mL⁻¹) para las curvas de calibración.

Aflatoxina	Concentraciones de la curva de calibración (ng mL⁻¹)
B ₁	0.1, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128
B ₂	0.01, 0.05, 1, 5, 10, 20, 40, 70, 100, 200
G ₁	0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 4, 16, 100, 128
G ₂	0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 600, 800, 1000

V.1.2.1. Curva de AFB₁

Las concentraciones de las 10 diluciones del estándar de AFB₁ se presentan en la **Tabla 15**, y la curva de calibración obtenida con R^2 de 0.9973 en la **Figura 11**.

Tabla 15. Datos para la curva de calibración de AFB₁. (n=28)

Concentración (ng mL ⁻¹)	1ª Repetición		2ª Repetición		3ª Repetición	
	Área	Tr (min)	Área	TR (min)	Área	TR (min)
0.1	1.3	8.263	1.3	8.510	1.3	8.448
0.5	4.5	8.158	1.9	7.977	1.7	8.117
1.0	3.4	9.478	3.7	7.985	4.5	7.886
2.0	10.6	7.894	8.6	7.827	9.7	7.804
4.0	16.7	7.781	14.4	7.769	15.7	7.709
8.0	34.0	7.774	31.4	7.758	25.1	7.808
16.0	48.7	7.759	55.6	7.759	49.9	7.747
32.0	91.3	7.740	97.5	7.741	93.1	7.746
64.0	182.6	7.750	186.2	7.750	s/d	s/d
128.0	353.9	7.739	360.2	7.745	s/d	s/d

s/d = sin datos; Tr = Tiempo de retención.

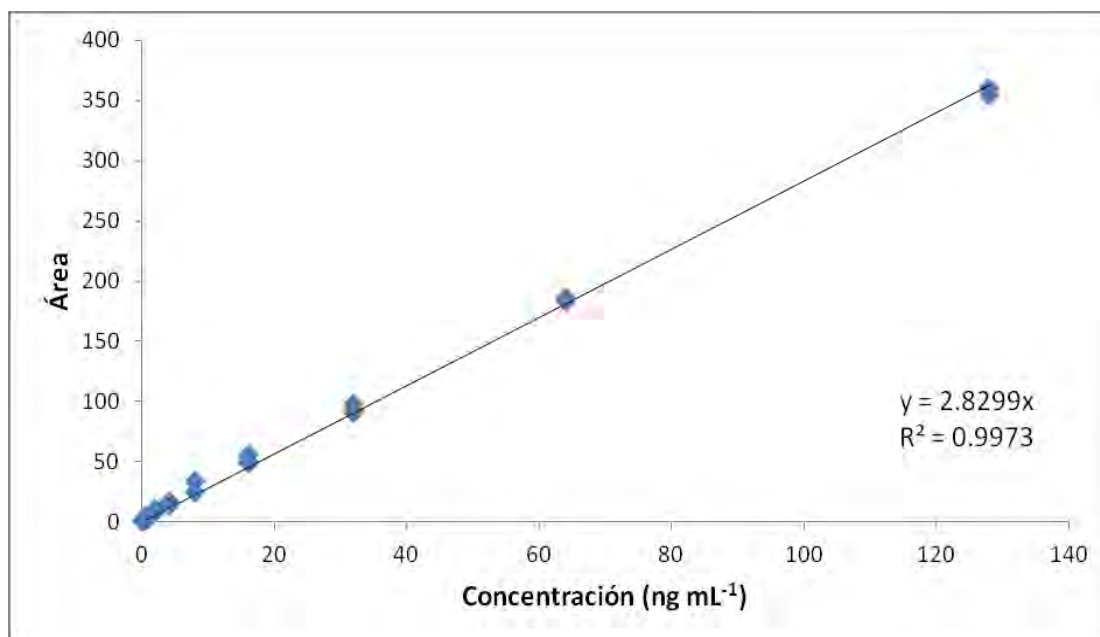


Figura 11. Curva de calibración de AFB₁. Pendiente (m) = 2.8299 y coeficiente de correlación (R^2) = 0.9973

V.1.2.2. Curva de AFB₂

Las concentraciones de las 10 diluciones del estándar de AFB₂ se presentan en la **Tabla 16**, y la curva de calibración obtenida con R² de 0.9908 en la **Figura 12**.

Tabla 16. Datos para la curva de calibración de AFB₂. (n=19)

Concentración (ng mL ⁻¹)	1ª Repetición		2ª Repetición	
	Área	Tr (min)	Área	Tr (min)
0.01	0.027	17.59	0.021	17.61
0.05	0.12	18.20	0.076	17.84
1.0	2.0	18.10	1.8	18.00
5.0	6.6	18.10	6.7	18.06
10.0	23.0	18.09	23.1	18.06
20.0	38.4	18.10	38.7	18.08
40.0	93.0	18.19	s/d	s/d
70.0	149.7	18.25	150.5	18.24
100.0	173.9	18.26	173.9	18.24
200.0	345.4	18.22	346.7	18.20

s/d = sin datos; Tr = Tiempo de retención.

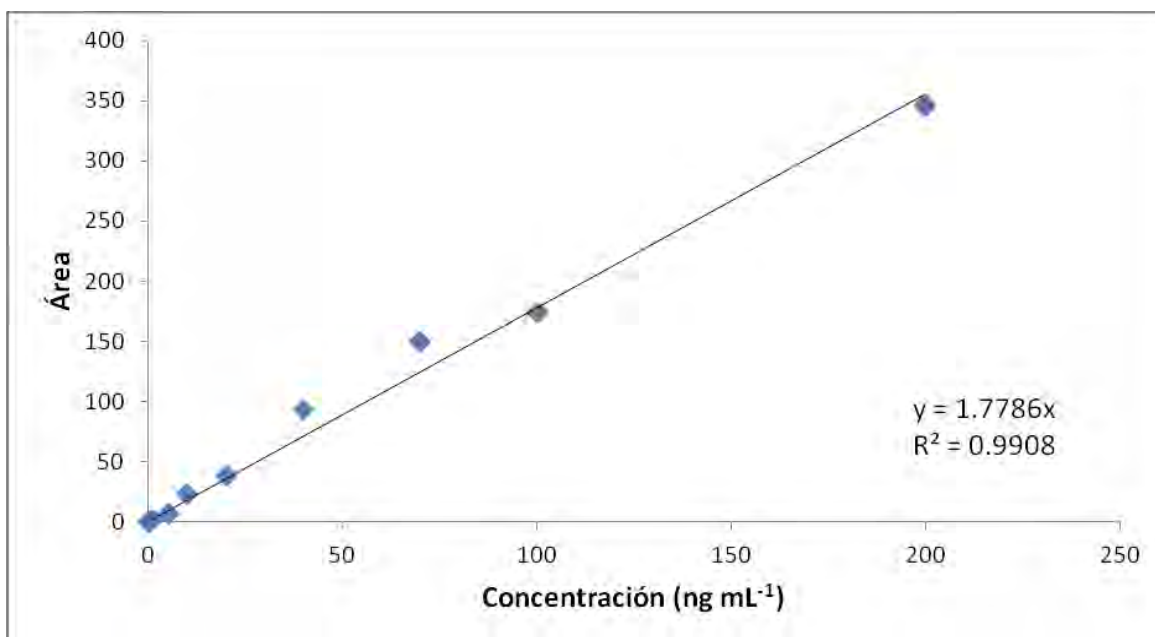


Figura 12. Curva de calibración de AFB₂. Pendiente (m) = 1.7786 y coeficiente de correlación (R²) = 0.9908

V.1.2.3. Curva de AFG₁

Las concentraciones de las 10 diluciones del estándar de AFG₁ se presentan en la **Tabla 17**, y la curva de calibración obtenida con R^2 de 0.9969 en la **Figura 13**.

Tabla 17. Datos para la curva de calibración de AFG₁. (n=26)

Concentración (ng mL ⁻¹)	1ª Repetición		2ª Repetición		3ª Repetición	
	Área	Tr (min)	Área	Tr (min)	Área	Tr (min)
0.01	0.07	5.930	0.03	5.870	0.05	5.795
0.05	0.16	5.868	0.13	5.883	s/d	s/d
0.1	0.2	5.833	0.22	5.863	0.27	5.794
0.5	0.89	5.753	1.0	5.642	0.98	5.772
1.0	3.1	5.784	3.3	5.690	3.3	5.732
4.0	11.6	5.797	12.9	5.720	12.9	5.710
16.0	22.2	5.778	21.3	5.795	22.3	5.818
100.0	172.7	5.865	185.7	5.852	186.2	5.830
128.0	213.4	5.864	225.1	5.835	226.6	5.831

s/d = sin datos; Tr = Tiempo de retención.

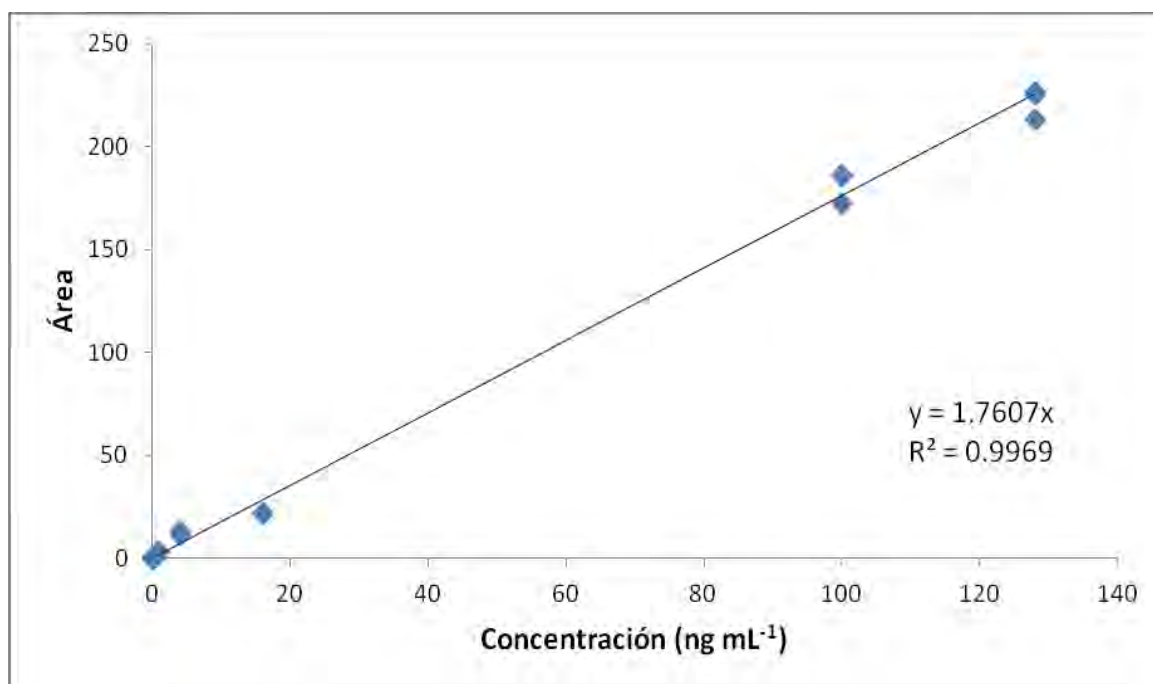


Figura 13. Curva de calibración de AFG₁. Pendiente (m) = 1.7607 y coeficiente de correlación (R^2) = 0.9969.

V.1.2.4. Curva de AFG₂

Las concentraciones de las 10 diluciones del estándar de AFG₂ se presentan en la **Tabla 18**, y la curva de calibración obtenida con R² de 0.9988 en la **Figura 14**.

Tabla 18. Datos para la curva de calibración de AFG₂. (n=38)

Concentración (ng mL ⁻¹)	1ª Repetición		2ª Repetición		3ª Repetición	
	Área	Tr (min)	Área	Tr (min)	Área	Tr (min)
0.5	2.7	11.353	2.9	11.371	2.9	11.391
1.0	1.8	11.407	1.8	11.390	1.8	11.401
2.0	3.3	11.404	3.4	11.432	3.5	11.431
4.0	6.0	11.478	6.0	11.473	6.0	11.475
8.0	10.5	11.472	10.4	11.477	10.4	11.486
16.0	17.7	11.513	17.3	11.523	16.5	11.534
32.0	42.1	11.525	43.1	11.519	43.5	11.520
64.0	74.5	11.511	74.5	11.532	75.1	11.527
100.0	109.1	11.568	104.3	11.557	108.7	11.533
200.0	220.0	11.554	219.5	11.526	211.4	11.551
600.0	716.4	11.494	714.16	11.473	-	-
800.0	1017.8	11.416	1015.6	11.384	1022.8	11.480
1000.0	1253.0	11.355	1251.0	11.319	1251.3	11.352

s/d = sin datos; Tr = Tiempo de retención.

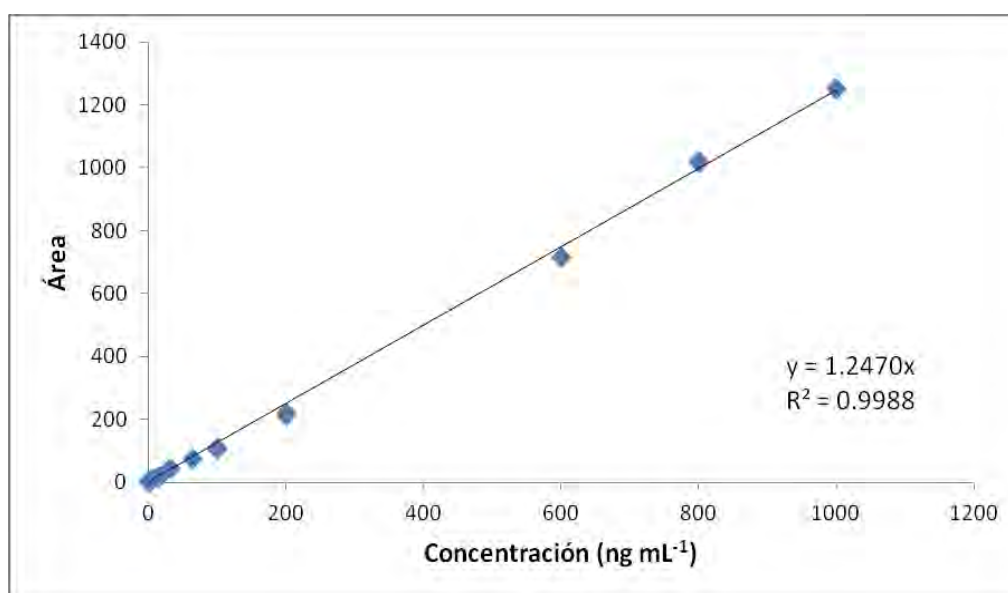


Figura 14. Curva de calibración de AFG₂. Pendiente (m) = 1.2470 y coeficiente de correlación (R²) = 0.9988.

V.1.3. Límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ).

Con las curvas de calibración de cada AF se obtuvieron los siguientes LOD y LOQ, teniendo en cuenta que el LOQ es equivalente a cinco veces el LOD (MSCR, 2002), se obtuvieron los siguientes resultados: **AFB₁** (LOD= 0.1; LOQ= 0.5), **AFB₂** (LOD= 0.01; LOQ= 0.05), **AFG₁** (LOD= 0.01; LOQ= 0.05) y **AFG₂** (LOD=0.5; LOQ= 2.5) ng mL⁻¹.

V.1.4. Porcentaje de recuperación

Los resultados de este experimento se cotejaron con los criterios de aceptación según la Comunidad Europea (CE)(Comisión Europea, 2006) y a los Criterios para la Validación de Métodos Físicoquímicos de la SSA (SSA, 2011) que son:

Tabla 19. Criterios de aceptación para recuperar residuos y contaminantes en alimentos y agua (SSA, 2011) y Criterios para recuperar aflatoxinas (CE,2006).

Concentración de Aflatoxina	Intervalo de aceptación	Fuente
< 1 µg Kg ⁻¹ ó µg L ⁻¹	50 – 120%	SSA
1 a 10 µg Kg ⁻¹ ó µg L ⁻¹	60 – 120%	
10 a 100 µg Kg ⁻¹ ó µg L ⁻¹	70 – 120%	
0.1 a 100 mg Kg ⁻¹ ó mg L ⁻¹	70 – 110%	
100 a 1000 mg Kg ⁻¹ ó mg L ⁻¹	85 – 110%	
< 1 µg Kg ⁻¹	50 – 120%	CE
1 a 10 µg Kg ⁻¹	70 – 110%	
> 10 µg Kg ⁻¹	80 – 110%	

Según ambos criterios se tomó el intervalo de 50 – 120% ya que 1g de las 3 pimientas se fortificaron con 100 ng de cada AF. Los resultados se muestran en la **Tabla 20**:

Tabla 20. Porcentaje de recuperación de las Aflatoxinas por tipo de pimienta.

Pimienta	Aflatoxina	Rango de Tr (min)	% de Recuperación
Negra	B ₁	(8.028 - 8.373)	87.15
	B ₂	(17.136 - 17.533)	105.94
	G ₁	(4.722 - 4.964)	72.15
	G ₂	(12.722 - 12.995)	96.36
Blanca	B ₁	(7.931 - 8.235)	80.83
	B ₂	(17.176 - 17.465)	107.28
	G ₁	(4.904 - 4.724)	81.99
	G ₂	(12.675 - 12.861)	74.47
Verde	B ₁	(7.904 - 8.090)	82.02
	B ₂	(18.052 - 18.089)	98.95
	G ₁	(4.721 - 4.863)	81.48
	G ₂	(12.551 - 12.742)	82.82

s/d = sin datos; Tr = Tiempo de retención.

V.2. Concentración de AFs en muestras.

Para poder identificar las AFs en las muestras se definieron los intervalos con base en los tiempos de retención (Tr) obtenidos en los experimentos realizados durante la validación del método. La **Tabla 21** muestra los tiempos de retención por cada experimento y el intervalo tomado en cuenta para la identificación en las muestras.

Tabla 21. Intervalos de tiempos de retención de cada AF obtenidos en los experimentos de linealidad, selectividad y porcentaje de recuperación.

Aflatoxina	Tiempos de retención (min)			Intervalo de Tr considerado (min)
	Linealidad	Selectividad	% de Recuperación	
AFB ₁	7.709 – 9.478	8.395 – 8.556	7.904 – 8.373	7.709 – 9.478
AFB ₂	17.590 – 18.260	18.637 – 19.205	17.136 – 18.089	17.136 – 19.205
AFG ₁	5.642 – 5.930	6.096 – 6.195	4.721 – 4.964	4.721 – 6.195
AFG ₂	11.319 – 11.568	12.390 – 12.639	12.551 – 12.995	11.319 – 12.995

Las **Tablas 22 a y b** muestran las concentraciones obtenidas en las muestras de pimientas analizadas, ajustadas con el porcentaje de recuperación.

Tabla 22 a. Concentración ajustada ($\mu\text{g Kg}^{-1}$) en un gramo de muestra de pimientas del DF.

Delegación	Muestra de pimienta	AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂	AFT
Alvaro Obregón	Negra	107.47	17.01	13.61	19.15	157.24
	Blanca	21.45	0.39	2.46	30.33	54.63
	Verde	30.15	<LOD	10.33	<LOD	40.48
Azcapotzalco	Negra	6.72	8.67	<LOD	1.37	16.75
	Blanca	8.64	17.90	<LOD	<LOD	26.54
	Verde	6.66	65.01	20.81	30.79	123.27
Benito Juárez	Negra	3.12	4.74	253.48	1.66	262.99
	Blanca	<LOD	9.56	<LOD	93.16	102.72
	Verde	33.95	32.33	<LOD	18.77	85.04
Coyoacán	Negra	1.96	4.22	<LOD	25.90	32.08
	Blanca	16.52	<LOD	<LOD	<LOD	16.52
	Verde	2.18	94.54	<LOD	6.95	103.67
Cuajimalpa	Negra	31.29	13.59	<LOD	15.55	60.43
	Blanca	24.14	16.72	4.54	35.25	80.65
	Verde	11.97	27.64	<LOD	63.74	103.36
Cuauhtémoc	Negra	217.50	101.75	<LOD	124.59	443.84
	Blanca	7.77	8.54	0.40	6.99	23.70
	Verde	169.59	175.57	101.48	151.31	597.95
Gustavo A. Madero	Negra	107.80	57.73	8.48	193.46	367.47
	Blanca	17.06	<LOD	2.28	38.34	57.68
	Verde	16.42	83.20	17.96	23.45	141.03
Iztacalco	Negra	<LOD	<LOD	<LOD	2.56	2.56
	Blanca	24.04	<LOD	<LOD	36.31	60.35
	Verde	136.15	9.86	611.88	33.23	791.13
Iztapalapa	Negra	20.22	<LOD	12.19	112.53	144.94
	Blanca	48.78	83.02	18.19	51.07	201.05
	Verde	18.79	10.04	10.64	8.89	48.36
Magdalena Contreras	Negra	13.73	21.50	<LOD	19.27	54.51
	Blanca	13.10	103.93	25.00	79.87	221.91
	Verde	11.05	60.22	144.57	494.44	710.29
Miguel Hidalgo	Negra	<LOD	<LOD	97.07	64.31	161.38
	Blanca	4.19	<LOD	<LOD	21.34	25.53
	Verde	118.22	79.24	93.74	197.35	488.55
Milpa Alta	Negra	0.11	16.71	<LOD	52.83	69.65
	Blanca	8.16	42.36	64.30	157.26	272.08
	Verde	59.35	243.05	92.71	149.23	544.34
Tláhuac	Negra	25.34	28.55	72.48	2.15	128.52
	Blanca	1.50	0.69	<LOD	5.04	7.23
	Verde	40.14	67.48	52.77	237.17	397.56
Tlalpan	Negra	29.12	175.86	4.45	25.34	234.78
	Blanca	23.05	52.45	<LOD	171.77	247.27
	Verde	27.53	20.17	17.40	44.89	110.00
Venustiano Carranza	Negra	8.33	75.47	<LOD	166.00	249.81
	Blanca	31.17	108.13	20.52	68.47	228.29
	Verde	32.51	44.22	56.71	474.56	608.01
Xochimilco	Negra	40.26	28.52	42.83	57.11	168.72
	Blanca	13.40	<LOD	<LOD	<LOD	13.40
	Verde	19.52	14.05	57.70	17.49	108.76

Tabla 22 b. Concentración ajustada ($\mu\text{g Kg}^{-1}$) en un gramo de muestra de pimientas de Egipto, India y Turquía.

Delegación	Muestra de pimienta	AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂	AFT
Egipto	Negra	23.92	381.87	36.51	104.42	546.73
	Blanca	12.52	21.15	53.13	205.19	291.98
India	Negra	8.40	27.12	35.30	118.01	188.83
	Blanca	13.72	<LOD	9.51	14.37	37.60
Turquía	Negra	7.87	30.63	1.11	185.92	225.53
	Blanca	27.10	<LOD	18.57	35.15	80.81

<LOD: Menor al límite de detección.

De un total de 54 muestras analizadas (19 de pimienta negra, 19 de blanca y 16 de verde) el 100% de ellas, resultaron contaminadas con al menos alguna de las 4 AFs; del total de muestras, el 94.45% (51/54) presentó contaminación por AFB₁, el 79.63% (43/54) de AFB₂, 66.67% de las muestras (36/54) resultaron contaminadas con AFG₁ y 92.59% con AFG₂ (50/54).

Las **Figuras 15, 16, 17, 18, y 19** muestran la incidencia de contaminación por cada AF, según el lugar de origen de las muestras para las 3 pimientas.

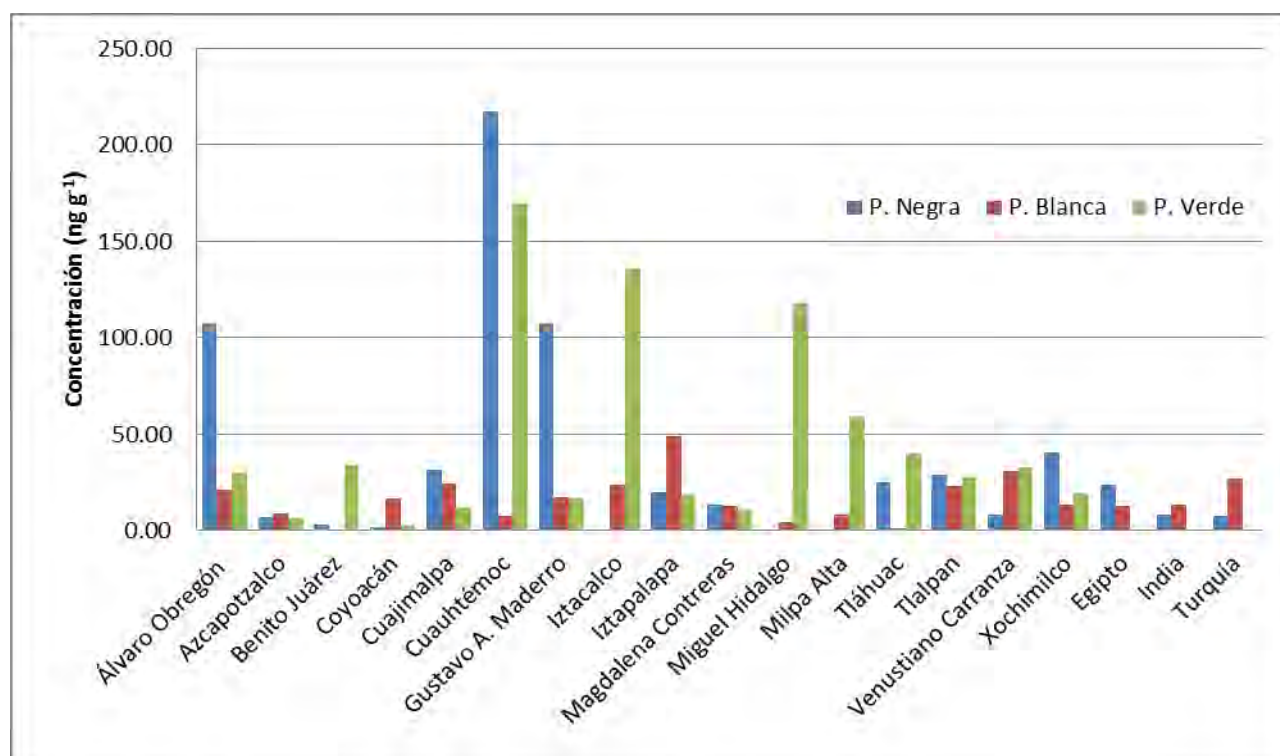


Figura 15. Concentración de AFB₁ en muestras de pimienta según su lugar de origen.

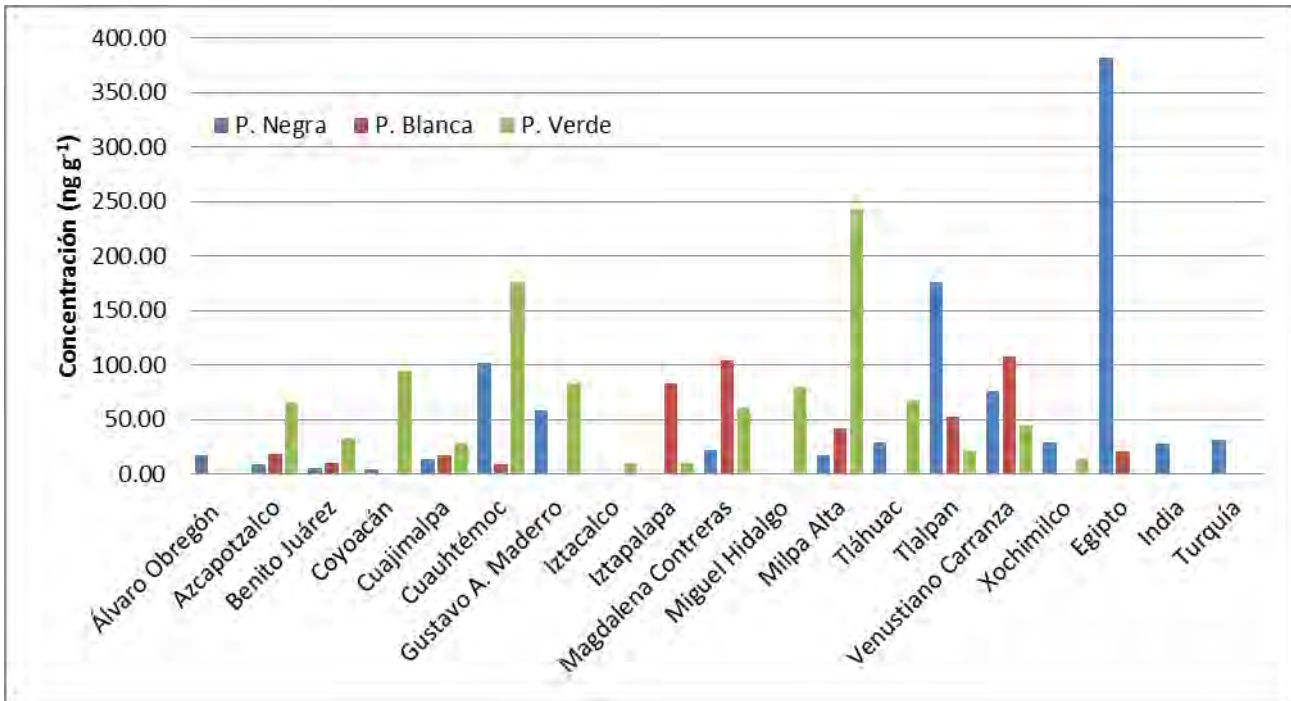


Figura 16. Concentración de AFB₂ en muestras de pimienta según su lugar de origen.

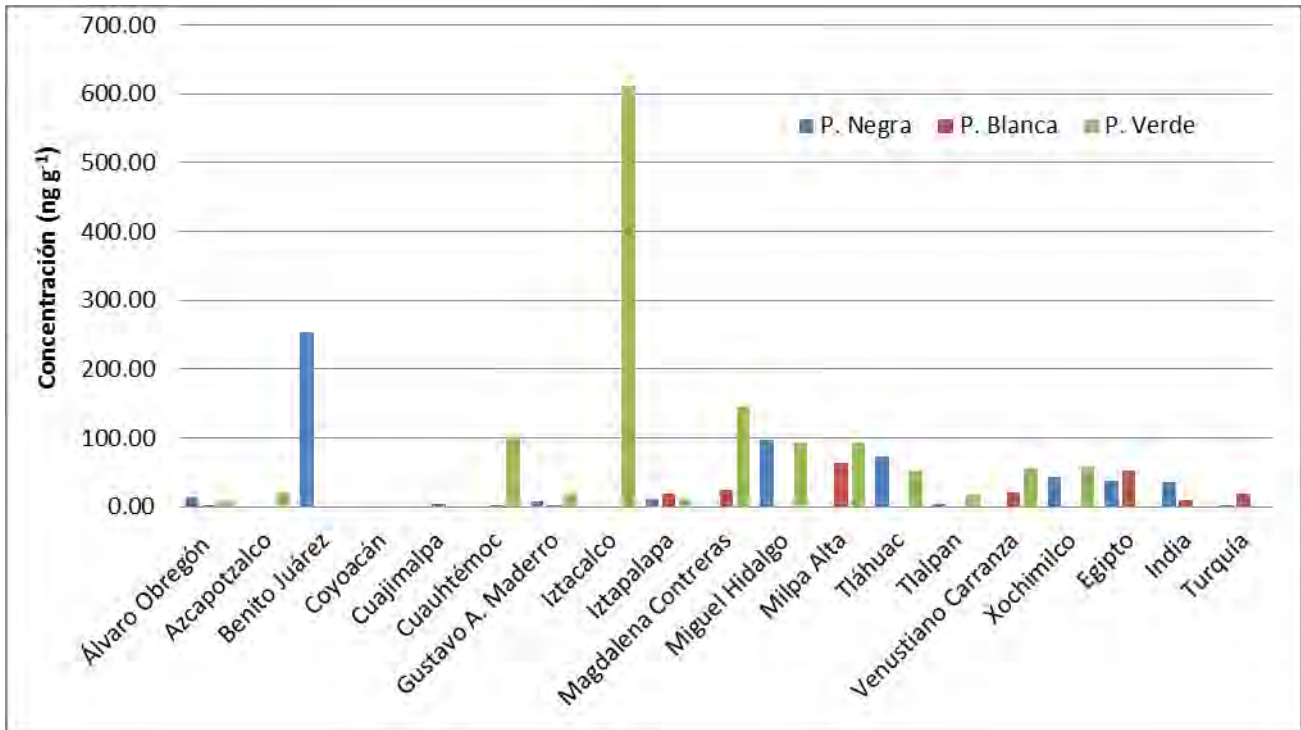


Figura 17. Concentración de AFG₁ en muestras de pimienta según su lugar de origen.

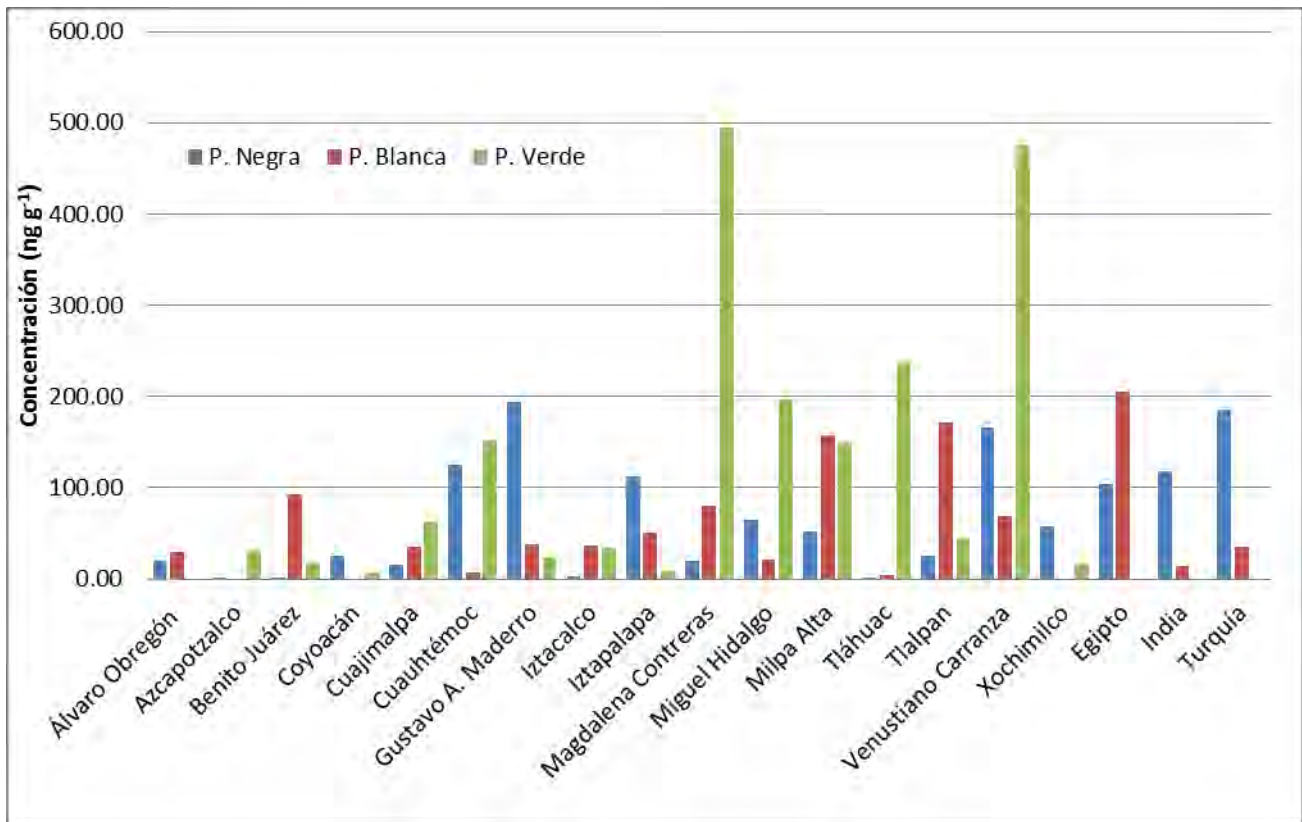


Figura 18. Concentración de AFG₂ en muestras de pimienta según su lugar de origen.

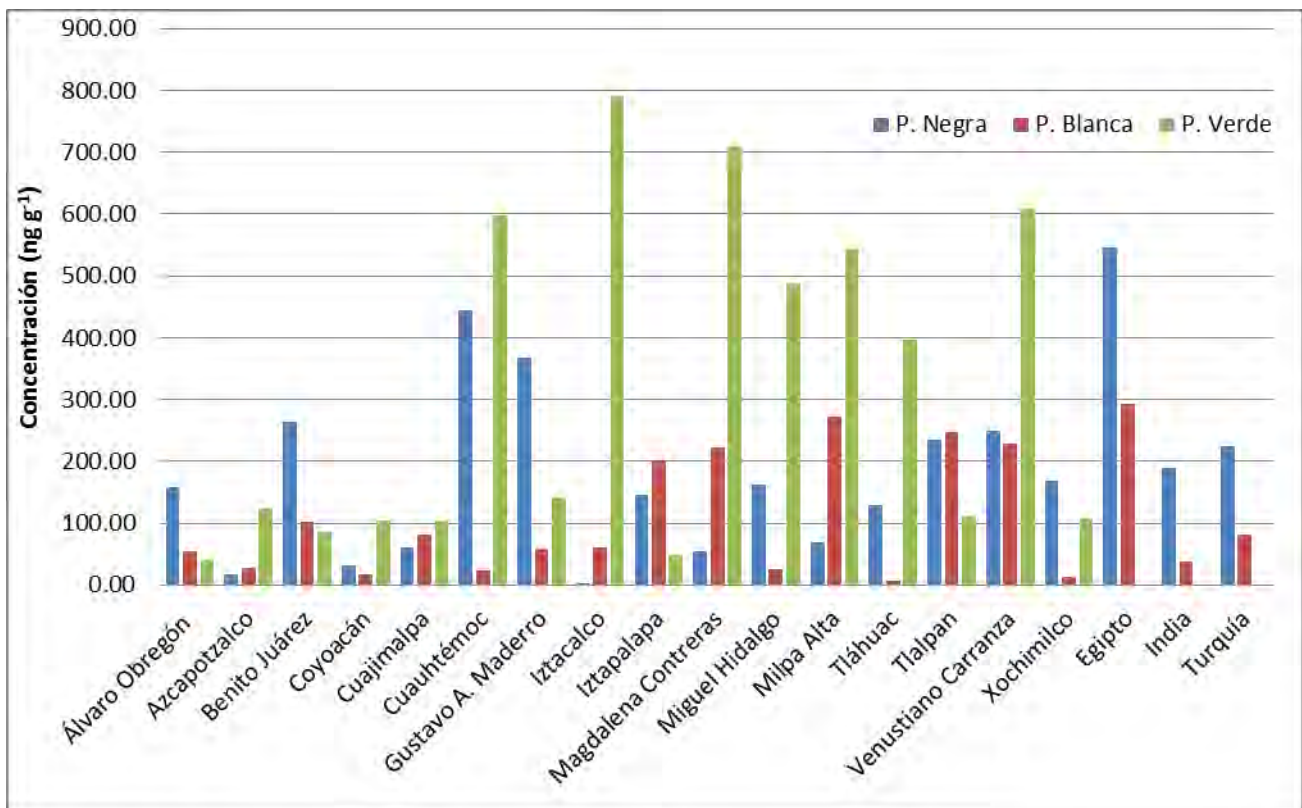


Figura 19. Aflatoxinas totales en muestras de pimienta según su lugar de origen.

Las **Figuras (15 a 19)** muestran a la pimienta verde con mayor susceptibilidad a la contaminación por AFs respecto a los otros 2 tipos. Esto puede deberse no únicamente al grado de maduración del fruto, sino a que al ser menos comercial la pimienta verde, suele estar en almacén por más tiempo que los otros tipos de pimienta, esto hace que sea un blanco de crecimiento de hongos aflatoxicógenos y por ende a presentar mayores niveles de contaminación. La que presentó menos contaminación fue la pimienta blanca quizá debido al proceso de pulido de la cáscara al que se somete.

Cabe señalar que tan solo el 9.26 % de las muestras analizadas (5/54) cumplen con el límite establecido por la NOM-188-SSA1-2002 que es de $20 \mu\text{g Kg}^{-1}$, para AFt; y las muestras que estuvieron en norma fueron las muestras de pimienta negra de las Delegaciones Azcapotzalco ($16.75 \mu\text{g Kg}^{-1}$) e Iztacalco ($2.56 \mu\text{g Kg}^{-1}$), y las muestras de pimienta blanca de Coyoacán, Tláhuac y Xochimilco (15.52 , 7.23 , $13.4 \mu\text{g Kg}^{-1}$ respectivamente).

Para las muestras extranjeras, todas sobrepasaron el límite que establecen las legislaciones correspondientes de cada país (India $30 \mu\text{g Kg}^{-1}$, Egipto y Turquía $10 \mu\text{g Kg}^{-1}$) para AFt. Sólo Egipto y Turquía establecen un límite de $5 \mu\text{g Kg}^{-1}$ para AFB₁ (la más tóxica) y en ambos casos las muestras estudiadas sobrepasan dicho límite.

La normatividad de México respecto a AF tanto de AFB₁ como de AFt ya no están vigentes, con la finalidad de que los tratados comerciales no tengan contratiempos, además nunca se contempló la contaminación de AF en especias. Estos hechos afectan la salud del mexicano, pues ya no hay control de los cancerígenos que ingiere en los alimentos contaminados.

Las concentraciones presentadas por cada AF fueron muy variadas y comprenden los intervalos de 0.11 a $217.50 \mu\text{g Kg}^{-1}$ para AFB₁, 0.39 a $381.87 \mu\text{g Kg}^{-1}$ para AFB₂, 0.4 a $611.88 \mu\text{g Kg}^{-1}$ para AFG₁ y 1.37 a $494.44 \mu\text{g Kg}^{-1}$ para AFG₂. Los datos de las muestras más contaminadas para cada AF se muestran en la **Tabla 23**.

Tabla 23. Muestras de pimientas más contaminadas por Aflatoxinas y lugar de origen.

Aflatoxina	Tipo de Pimienta	Lugar de Origen	Concentración de AF ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)
B ₁	Negra	Cuauhtémoc	217.50
	Blanca	Iztapalapa	48.78
	Verde	Cuauhtémoc	169.59
B ₂	Negra	Egipto	381.87
	Blanca	Venustiano Carranza	108.13
	Verde	Milpa Alta	243.05
G ₁	Negra	Benito Juárez	253.48
	Blanca	Milpa Alta	64.30
	Verde	Iztacalco	611.88
G ₂	Negra	Gustavo A. Madero	193.46
	Blanca	Egipto	205.19
	Verde	Magdalena Contreras	494.44
AFt	Negra	Egipto	546.73
	Blanca	Egipto	291.98
	Verde	Iztacalco	791.13

V.3. Análisis estadístico.

Con el fin de encontrar si existen diferencias entre la contaminación por AFs de los tres tipos de pimienta, se realizó el análisis estadístico mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis en el Programa Estadístico R, los resultados se muestran en la **Tabla 24**.

Tabla 24. Prueba estadística de Kruskal-Wallis para Aflatoxinas en pimientas

Aflatoxina	Prueba de Kruskal-Wallis	Significancia	Diferencia significativa
AFB ₁	4.41	0.11	No
AFB ₂	7.11	<0,05	Si
AFG ₁	7.05	<0,05	Si
AFG ₂	0.93	0.63	No
AFt	7.49	<0,05	Si

Los resultados obtenidos tras aplicar éste método estadístico muestran que sólo en la contaminación por las AFB₁ y AFG₂ no existieron diferencias significativas entre los 3 tipos de pimienta estudiados; en tanto que, en la contaminación por AFB₂, AFG₁ y AFT, sí existieron diferencias significativas en las pimientas.

Otra prueba que se aplicó para encontrar si existían diferencias significativas entre grupos, y poder compararlos, fue la prueba de Wilcoxon que se muestra en la **Figura 20**.

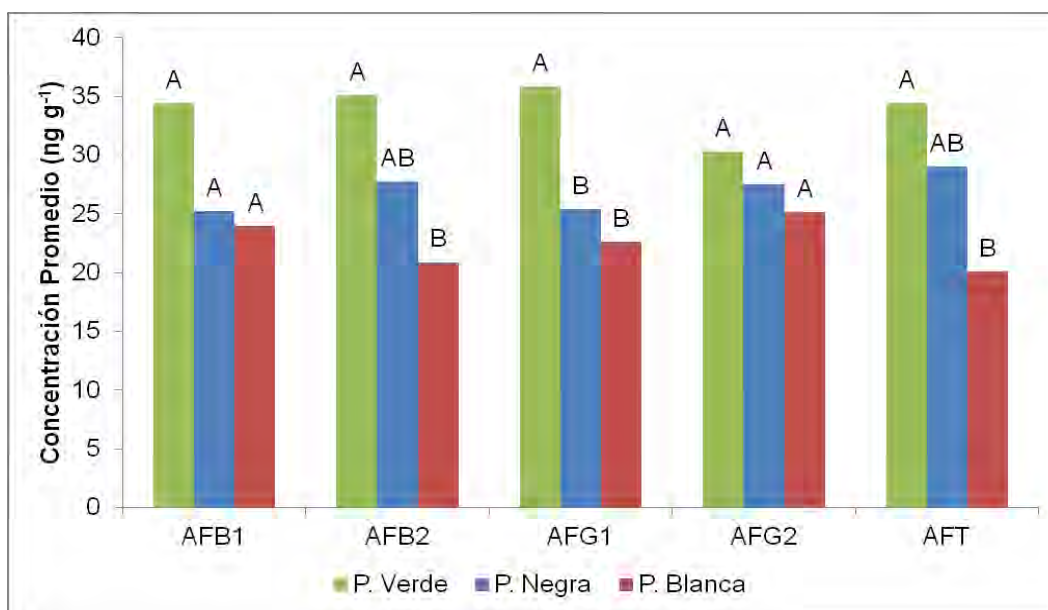


Figura 20. Concentración promedio de Aflatoxinas en pimienta negra, blanca y verde. Grupos con una letra (A, B) en común sin diferencias significativas, y grupos con letra diferente sí presentan diferencias significativas ($p < 0.05$).

La **Figura 20**, muestra que para la contaminación por AFs en la pimienta verde no hubo diferencias significativas, además de resultar ser la pimienta más susceptible a la contaminación de todas las AFs. La contaminación por AFG₁ fue la más importante, y alcanzó un valor promedio de 35.88 $\mu\text{g Kg}^{-1}$.

La pimienta blanca resultó ser la menos contaminada de las 3 y fue más susceptible a la contaminación por AFG₂, alcanzando los 25.13 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ en promedio. En tanto que con una incidencia de contaminación intermedia se encuentra la pimienta negra que alcanzó como valor promedio máximo 27.53 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ para AFG₂. Todos estos niveles de AF estuvieron fuera de norma (NOM-188-SSA1-2002).

Esto muestra que en efecto, la pimienta, resulta ser un sustrato óptimo para el crecimiento de hongos aflatoxicogénicos (del género *Aspergillus spp.*) y por ende, a la contaminación de los subproductos de su metabolismo, o sea, AFs. Los niveles excesivamente altos hablan de un mal manejo de la pimienta en algunos pasos de la cadena de producción y abastecimiento, como pueden ser malas prácticas durante la cosecha, almacenamiento inapropiado y la falta de condiciones óptimas durante el transporte, mercadeo y procesamiento (Wagacha & Muthomi, 2008).

Por otro lado, la ausencia de contaminación por hongos aflatoxigénicos en pimientos podría deberse a la presencia de aceites esenciales con sustancias como la piperina (Mabrouk & El-Shayeb, 1980; Madhyastha & Bhat, 1984) sustancia importante en la composición de la pimienta.

Si bien son altas las concentraciones de AF en las pimientos estudiadas, es preciso indicar que el consumo de las mismas en diversos platillos es mínimo, ya que es utilizada en muy bajas cantidades, sobre todo como un sazonador. Es por esto que la aportación de AFs al organismo por ingesta de pimienta podría considerarse relativamente bajo en comparación con otros productos agrícolas como pudieran ser maíz, pistache o nueces.

Este trabajo presenta un panorama general de la contaminación por AFs que puede afectar a la pimienta y que puede hacerse equiparable a otros productos alimenticios. La falta de una normatividad seria en el país sobre el tema es una necesidad que revertiría las altas concentraciones encontradas, y esta tesis podría ser una guía para la prevención y el manejo con la finalidad de evitar la presencia y reducir la ingesta de AFs en la dieta diaria de las personas.

VI. CONCLUSIONES

- Se validó el método y se obtuvieron las curvas de calibración de AF y los valores de R^2 ($AFB_1 = 0.9973$; $AFB_2 = 0.9908$; $AFG_1 = 0.9969$; $AFG_2 = 0.9988$) y se determinaron los valores de LOD ($AFB_1 = 0.1$; $AFB_2 = 0.01$; $AFG_1 = 0.01$; $AFG_2 = 0.5$) y LOQ ($AFB_1 = 0.5$; $AFB_2 = 0.05$; $AFG_1 = 0.05$; $AFG_2 = 2.5$) $ng mL^{-1}$.
- La prueba de selectividad mostró la inexistencia de solapamiento entre las AFs, y la pimienta no presenta otras sustancias que pudiesen dar falsos positivos.
- Valores de recobro $> 70\%$ muestran una buena recuperación para las 4 AFs.
- Se detectaron y cuantificaron las 4 AFs presentes en los 3 tipos de pimientos analizadas.
- Las 54 muestras analizadas, el 100% presentaron contaminación con al menos una AF; el 94.45% tuvo AFB_1 , el 79.63% con AFB_2 , 66.67% con AFG_1 y 92.59% con AFG_2 .
- Los intervalos de contaminación encontrados para cada AF fueron: AFB_1 (0.11 a 217.50 $\mu g Kg^{-1}$); AFB_2 (0.39 a 381.87 $\mu g Kg^{-1}$); AFG_1 (0.4 a 611.88 $\mu g Kg^{-1}$) y para AFG_2 (1.37 a 494.44 $\mu g Kg^{-1}$). Estos altos contenidos de AF pueden deberse a condiciones inadecuadas de manejo y almacenamiento del producto.
- Sólo el 9.26% de las muestras del Distrito Federal cumplen con el límite de 20 $\mu g Kg^{-1}$ establecido por la NOM-188-SSA1-2002 para AF_t ; todas las muestras extranjeras sobrepasaron los límites establecidos para cada país: India 30 $\mu g Kg^{-1}$, Egipto y Turquía 10 $\mu g Kg^{-1}$, para AF_t . Egipto y Turquía con un límite de 5 $\mu g Kg^{-1}$ de AFB_1 también rebasado.
- Hubo diferencias estadísticamente significativas en la contaminación de las pimientos 3 por AFB_2 , AFG_1 y AF_t . Las AFB_1 y AFG_2 no tuvieron diferencias significativas.
- La pimienta verde fue la más contaminada con las 4 AFs, la pimienta blanca fue la menos, y la pimienta negra presentó una susceptibilidad intermedia. El secado al sol al que se suele someter la pimienta, no resulta eficaz en la degradación de las AFs y el grado de maduración podría ser más definitorio pues la contaminación de la pimienta verde -la menos madura-, es significativamente mayor.
- La evidencia obtenida tras el análisis de muestras de pimientos comercializadas en el Distrito Federal y en mercados de Egipto, India y Turquía, indica que ésta especia aporta sustancias con potencial cancerígeno (las AFs) a la dieta del hombre.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, H.K.; Zablotowicz, R.M.; Weaver, M.A.; Shier, W.T.; Bruns, H.A.; Bellaloui, N.; Accinelli, C.; Abel, C.A. Implications of Bt traits on mycotoxin contamination in maize: Overview and recent experimental results in Southern United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2013**, 61, 11759–11770.
- Abdulkadar, W.H.A.; Al-Ali, A.A.; Al-Kildi, M.A.; Al-Jedah, H.J. Mycotoxin in food products available in Qatar. *Food Control*. **2004**, 15, 543–548.
- Akiyama, H.; Goda, Y.; Tanaka, T.; Toyoda, M. Determination of aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ in spices using a multifunctional column clean-up. *Journal of Chromatography*. **2001**, 932, 153-157.
- Bababunmi, E.A.; Thabrew, I.; Bassir, O. Aflatoxin induced coagulopathy in different nutritionally classified animal species. *World Review of Nutrition and Dietetics*. **1997**, 34, 161–181.
- Bacaloni, A.; Cavaliere, C.; Cucci, F.; Foglia, P.; Samperi, R.; Lagan, A. Determination of aflatoxins in hazelnuts by various simple preparation methods and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography*. **2008**, 1179, 182-189.
- Bai, Y. F.; Xu, H. Protective action of piperine against experimental gastric ulcer. *Acta Pharmacologica Sinica*. **2000**, 21, 357–359.
- Bailey, G.S. Role of aflatoxin-DNA adducts in the cancer process. *In*: Eaton, D.L.; Groopman, J.D. (Eds.); *The Toxicology of Aflatoxins: Human Health, Veterinary, and Agricultural Significance*. Academic Press, San Diego, CA,USA. 1994; pp 137–148.
- Banerjee, M.; Sarkar, P.K. Microbiological quality of some retail spices in India. *Food Research International*, **2003**, 36, 469-474.
- Becroft, D.M.O.; Webster, D.R. Aflatoxins and Reye's disease. *British Medicinal Journal*. **1972**, 4, 117-123.

- Beebe, R.M. Reverse phase high pressure liquid chromatographic determination of aflatoxins in foods. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*. **1978**, 61, 1347-1352.
- Bennett, R.A.; Essigmann, J.M.; Wogan, G.N.. Excretion of an aflatoxin-guanine adduct in the urine of aflatoxin B₁-treated rats. *Cancer Research*. **1981**, 41, 650-654.
- Bhat, R.V.; Krishnamachari, K.A.V.R. Follow-up study of aflatoxic hepatitis in parts of Western India. *Indian Journal of Medical Research*. **1977**, 66, 55-58.
- Bircan C. The determination of aflatoxins in spices by immunoaffinity column extraction using HPLC. *International Journal of Food Science and Technology*. **2005**, 40, 929-934.
- Butler, W.H.; Neal, G.E. Mode of action and human health aspects of aflatoxin carcinogenesis. *Pure and Applied Chemistry*. **1977**, 49, 1747-1751.
- Campbell, T.C.; Stoloff, L. Implication of mycotoxins for human health. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **1974**, 22, 1006-1015.
- Castells, M.; Sanchis, V.; Ramos, A.J. Reduction of aflatoxins by extrusion-cooking of rice meal. *Journal of Food Science*. **2006**, 71, 369-377.
- Cho, S.H.; Lee, C.H.; Jang, M.R.; Son, Y.W.; Lee, S.M.; Choi, I.S.; Kim, S.H.; Kim, D.B. Aflatoxins contamination in spices and processed spice products commercialized in Korea. *Food Chemistry*. **2008**, 10, 1283-1288.
- Chu, F.S. Mode of action of mycotoxins and related compounds. *Advances in Applied Microbiology*. **1997**, 40, 352-357.
- Codex Alimentarius. *Codex General Standard for contaminants and toxins in food and feed*. JECFA. *Codex Stan 193-1995*, 2008. Disponible en línea: http://www.codexalimentarius.net/download/standards/17/CXS_193e.pdf (Consultada el 13 de febrero de 2014).

- Comision Europea. *Reglamento N° 401/2006 por el que se establecen los métodos de muestreo y de análisis para el control oficial del contenido de micotoxinas en los productos alimenticios*. 2006. Disponible en línea:
<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:070:0012:0034:ES:PDF>
(Consultada el 23 de febrero de 2013).
- Croy, R.G.; Essigmann, J.M.; Reinhold, V.N.; Wogan, G.N. Identification of the principal aflatoxin B1-DNA adduct formed in vivo in rat liver. *Proceedings of the National Academy of Science*. **1978**, 75, 1745–1749.
- Darshan, S.; Doreswamy, R. Patented anti-inflammatory plant drug development from traditional medicine. *Phytotherapy Research*. **2004**, 18, 343–357.
- Diebold, G.J.; Zare, R.N. Laser fluorimetry: Subpicogram detection of Aflatoxins using high-pressure liquid chromatography. *Science*. **1977**, 196, 1439-1441.
- Dorner, J.W.; Cole, R.J.; Connik, W.J.; Daigle, D.J.; Mc Guire, M.R.; Shasha, B.S. Evaluation of biological control formulations to reduce aflatoxin contamination in peanuts. *Biological Control*. **2003**, 26, 318-324.
- Doyle, M.P.; Marth, E.H. Bisulfite degrades aflatoxin: effect of citric acid and methanol and possible mechanism of degradation. *Journal of Food Protection*. **1978**, 41, 774-781.
- Eaton, D.L.; Gallagher, E.P. Mechanisms of aflatoxin carcinogenesis. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. **1994**, 34, 135-172.
- Egyptian Standard UDC 615.91. *Maximum Limits for Mycotoxin*. In: Foods Part I: Aflatoxin. 2014. Disponible en línea: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/007/y5499e/y5499e00.pdf>
(Consultado el 15 de enero de 2014).
- Erdogan, A. The aflatoxin contamination of some pepper types sold in Turkey. *Chemosphere*. **2004**, 56, 321–325

- Erkmen, O.; Bozoglu, T.F., Eds. *Food Microbiology 1: Microorganisms in Foods, Microbial Growth, Foodborne Diseases and Detection of Microorganisms and their Toxins*. Ilke Publishing Company, Ankara., 2008
- FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAOSTAT. 2010. Disponible en: <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor> (Consultado el 10 de septiembre de 2013).
- Fernández, A.; Hernández, M.; Verde, M.T.; Sanz, M. Effect of aflatoxin on performance, hematology, and clinical immunology in lambs. *Canadian Journal of Veterinary Research*. **2000**, 64, 53–58.
- Financiera Rural. Dirección General Adjunta de Planeación Estratégica y Análisis Sectorial. *Monografía de la Pimienta*. 2011. Disponible en: [http://www.financierarural.gob.mx/informacionsectorrural/Documents/Monografias/MonografiaPimienta\(mzo11\).pdf](http://www.financierarural.gob.mx/informacionsectorrural/Documents/Monografias/MonografiaPimienta(mzo11).pdf) (Consultada el 28 de octubre de 2013).
- Food Safety and Standards Authority of India. *Food Safety and Standards (Contaminants, Toxins and Residues) Regulations*. 2011. Disponible en línea: [http://www.fssai.gov.in/Portals/0/Pdf/Food%20safety%20and%20standards%20\(contaminants,%20toxins%20and%20residues\)%20regulation,%202011.pdf](http://www.fssai.gov.in/Portals/0/Pdf/Food%20safety%20and%20standards%20(contaminants,%20toxins%20and%20residues)%20regulation,%202011.pdf) (Consultado el 22 de enero de 2014).
- Foster, P.L.; Einsenstadt, E.; Miller, J.H. Base substitution mutations induced by metabolically activated aflatoxin B₁. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **1983**, 80, 2695-2698.
- Gong, Y.Y.; Egal, S.; Hounsa, S.; Hall, A.J.; Cardwell, K.F.; Wild, C.P. Determinants of aflatoxin exposure in young children from Benin and Togo, West Africa: the critical role of weaning. *International Journal of Epidemiology*. **2003**, 32, 556–662.
- Gong, Y.; Hounsa, A.; Egal, S.; Sutcliffe, A.E.; Hall, A.J.; Cardwell, K.F.; Wild, C.P. Postweaning exposure to aflatoxin results in impaired child growth: a longitudinal study in Benin, West Africa. *Environmental Health Perspectives*. **2004**, 112, 1334–1338.

- Groopman, J.D.; Zhu, J.Q.; Donahue, P.R.; Pikul, A.; Zhang, L.S.; Chen, J.S.; Wogan, G.N. Molecular dosimetry of urinary aflatoxin-DNA adducts in people living in Guangxi autonomous region, People's Republic of China. *Cancer Research*. **1992**, 52, 45–52.
- Haghighi, B.; Thorpe, C.; Pohland, A.E.; Barnett, R. Development of a sensitive high-performance liquid chromatographic method for detection of aflatoxins in pistachio nuts. *Journal of Chromatography*. **1981**, 206, 98-101.
- Helferich, W.G.; Garrett, W.N.; Hsieh, D.P.H.; Baldwin, R.L. Feed lot performance and tissue residues of cattle consuming diets containing aflatoxins. *Journal of Animal Science*. **1986**, 62, 691–696.
- Herzallah, S.; Alshawabkeh, K.; AL Fataftah, A. Aflatoxin decontamination of artificially contaminated feeds by sunlight, gamma radiation and microwave heating. *Journal of Applied Poultry Research*. **2008**, 17, 515-521.
- Hu, Y.Y.; Zheng, P.; Zhang, Z.X.; He, Y.Z. Determination of aflatoxins in high-pigment contents samples by matrix solid-phase dispersion and high-performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2006**, 54, 4126–4130.
- Hussein, H.S.; Brasel, J.M. Toxicity; metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology*. **2001**, 167, 101-134.
- Hurst, W.J.; Lenovich, L.M.; Martin, R.A. Liquid chromatographic determination of aflatoxins in artificially contaminated cocoa beans. *Journal of the Association of Official Analytical Chemist*. **1982**, 65, 888-891.
- IARC, International Agency for the Research of Cancer. *Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*, Lyon, France 2002, 82. 171 pp.
- IICA, Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. *Compendio de Agronomía Tropical, Vol. 2. Ministerio de Asuntos Extranjeros*. Francia, 1989. 697 pp.

- IPC, International Pepper Community. *Pepper Statistics 2001-2010*. 2010. Disponible en: <http://www.ipcnet.org/n/statpdf/index.php?p=swps> (Consultada el 18 de mayo de 2014).
- Jalili, M.; Jinap, S. Reduction of mycotoxins in white pepper. *Food additives and contaminants*. **2012**, 29, 1947-1958.
- Karapinar, M. The effects of citrus oils and some spices on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999. *International Journal of Food Microbiology*. **1985**, 2, 239–245.
- Kiessling, K.H.; Pettersson, H.; Sandholm, K.; Olsen, M. Metabolism of aflatoxin, ochratoxin, zearalenone, and three tricothecenes by intact rumen fluid, rumen protozoa, and rumen bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. **1984**, 47, 1070–1073.
- Kok, W.T. Derivatization reactions for the determination of aflatoxins by liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography*. **1994**, 659, 127-137.
- Lillehoj, E.B. *Aflatoxin: an ecologically elicited activation signal*. In: *Mycotoxins and Animal Foods*. Smith, J.E., Anderson, R. A., Eds. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 1991. pp. 119–139.
- Llewellyn, G.C.; Mooney, R.L.; Cheatle, T.F.; Flannigan, B. Mycotoxin contamination of spices – an update. *International Biodeterioration & Biodegradation*. **1992**, 29, 111–121.
- Mabrouk, S.S.; El-Shayeb, N.M. Inhibition of aflatoxin formation by some spices. *Zeitschrift Für Lebensmittel-Untersuchung und –Forschung*. **1980**, 171, 344–347.
- MacDonald, S.; Castle, L. A UK retail survey of aflatoxins in herbs and spices and their fate during cooking. *Food Additives and Contaminants*. **1996**, 13, 121–128.
- Madhyastha, S.M.; Bhat, V.R. *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxin production on black and white pepper and the inhibitory action of their chemical constituents. *Applied and Environmental Microbiology*. **1984**, 48, 376–379.
- Martin, P.; Travers, R. Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. *Applied and Environmental Microbiology*. **1989**, 55, 2437–2442.

- Martins, L.M.; Martins, M.H.; Bernardo, F. Aflatoxins in spices marketed in Portugal. *Food Additives and Contaminants*. **2001**, 18, 315–319.
- Méndez-Albores, A.; Del Río-García, J.C.; Moreno-Martínez, E. Decontamination of aflatoxin duckling feed with aqueous citric acid treatment. *Animal Feed Science and Technology*. **2007**, 135, 249-262.
- Midio, A.F.; Campos, R.R.; Sabino, M. Occurrence of aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ in cooked food components of whole meals marketed in fast food outlets of the city of São Paulo, SP, Brazil. *Food Additives and Contaminants*. **2001**, 18, 445-448.
- MSCR, Ministerio de Salud de Costa Rica. *Guía de validación de métodos analíticos*, 2002. Disponible en: <http://www.ministeriodesalud.go.cr/empresas/protocolos/guiavalidacionmetodosanaliticos.pdf> (Consultada el 11 de marzo de 2014).
- Muench, K.F.; Misra, R.P.; Humayun, M.Z. Sequence specificity in aflatoxin B₁-DNA interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **1983**, 80, 6–10.
- Ned Spice. *Pepper Crop Report* 2013. Disponible en: http://www.nedspice.com/company_downloads Consultada en mayo de 2013.
- Nelson, S.C.; Eger, K.T. *Farm and forestry production and marketing profile for black pepper (Piper nigrum)*. En Specialty crops for Pacific Island agroforestry. Permanent Agriculture Resources (PAR). Elevitch, C.R. Ed. Holualoa, Hawaii, 2011. Disponible en: http://www.agroforestry.net/scps/Black_pepper_specialty_crop.pdf (Consultada el 20 de septiembre de 2013).
- Norma Oficial Mexicana NOM-188-SSA1-2002, Productos y Servicios. 2002. *Control de Aflatoxinas en cereales para consumo humano y animal. Especificaciones sanitarias*. 2002, 1, pp. 15.
- Pang, V.F.; Pan, C.Y. The cytotoxic effects of aflatoxin B₁ on swine lymphocytes *in vitro*. *Journal of the Chinese Society of Veterinary Science*. **1994**, 20, 289–301.

- Pariza, W.M. *Toxic substances*. In: Food Chemistry, 3rd edn. Fennema, O.R.,: Marcel Dekker, New York. 1996. pp. 825–841
- Patkar, L.K.; Usha, M.C.; Shetty, S.H.; Paster, N.; Lacey, J. Effects of spice oil treatment of rice on moulding and mycotoxin contamination. *Crop Protection*. **1994**, 13, 519–524.
- Paul, P.S.; Johnson, D.W.; Mirocha, C.J.; Soper, F.F.; Thoen, C.C.; Muscoplat, C.C.; Weber, A.F. *In vitro* stimulation of bovine peripheral blood lymphocytes: suppression of phytomitogen and specific antigen lymphocyte responses by aflatoxin. *American Journal of Veterinary Research*. **1977**, 38, 2033–2035.
- Peraica, M.; Radic, B.; Lucic, A.; Pavlovic, M. Toxic effects of mycotoxins in humans. *Bulletin of the World Health Organization*. **1999**, 77, 754–763.
- Perusia, O.R.; Rodríguez, R. Micotoxicosis. *Revista de Investigación Veterinaria de Perú*. **2001**, 12, 87–116.
- Pitt, J.I. *Mycotoxins. Food-borne infections and intoxications*. Elsevier Academic Press. Amsterdam, 2013. pp. 409-412.
- Pons, W.A.; Cucullu, A.F.; Lee, L.S.; Janssen, H.J. Kinetic study of acid-catalyzed conversion of aflatoxins B₁ and G₁ to B_{2a} and G_{2a}. *Journal of American Oil Chemical Society*. **1972**, 49, 124-128.
- Raney, K.D.; Meyer, D.J.; Ketterer, B.; Harris, T.M.; Guengerich, F.P. Glutathione conjugation of aflatoxin B₁ exo- and endo-epoxides by rat and human glutathione-S-transferases. *Chemical Research in Toxicology*. **1992**, 5, 470–478.
- Ribelin, W.E.; Fukushima, K.; Still, P.E. The toxicity of ochratoxins to ruminants. *Canadian Journal of Comparative Medicine*. **1978**, 42, 172–177.
- Romagnoli, B.; Menna, V.; Gruppioni, N.; Bergamini, C. Aflatoxins in spices, aromatic herbs, herb-teas and medicinal plants marketed in Italy. *Food Control*. **2007**, 18, 697–701.

- Sargeant, K.C.R.B.A.A.R. *Chemistry and origin of aflatoxins*. Society of Chemical Industry. London, UK, 1963. pp. 53–55.
- Scholz, K.; Vogt, M.; Kunz, B.; Lyr, H.; Russell, P.E.; Dehne, H.W.; Sisler, H.D. *Application of plant extracts for controlling fungal infestation of grains and seeds during storage*. Modern fungicides and antifungal compounds II. 12th International Reinhardshbrunn Symposium, Friedrichroda, Thuringia, Germany, 1999. 1-366.
- Scott, P.M.; Kennedy, B.P.C. Analysis and survey of ground black, white and *Capsicum* peppers for aflatoxins. *Journal Association of Official Analytical Chemists*. **1973**, 56, 1452–1457.
- Shen, H.M.; Ong, C.N.; Shi, C.Y. Involvement of reactive oxygen species in aflatoxin B₁-induced cell injury in cultured rat hepatocytes. *Toxicology*. **1995**, 99, 115–123.
- Smela, M.E.; Currier S.S.; Bailey, E.A.; Essigmann, J.M. The chemistry and biology of aflatoxin B₁: from mutational spectrometry to carcinogenesis. *Carcinogenesis*. **2001**, 22, 535-545.
- Smela, M.E.; Hamm, M.L.; Henderson, P.T.; Harris, C.M.; Harris, T.M.; Essigmann, J.M. 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*. **2002**, 99, 6655-6660.
- Soriano, J.M. *Micotoxinas en alimentos*. Ediciones Díaz de Santos. Salamanca, España, 2007. 396 pp.
- SSA, Secretaría de Salud. Comisión de control analítico y ampliación de cobertura, *Criterios para la validación de métodos fisicoquímicos*. 2011. Disponible en: [www.cofepris.gob.mx TyS ... cvfq032011.pdf](http://www.cofepris.gob.mx/TyS...cvfq032011.pdf) (Consultado el 20 agosto de 2013).
- Swanson, S.P.; Nicoletti, J.; Rood, H.D.; Buck, W.; Cote, L.M. 1987 Metabolism of three trichothecene mycotoxins, T-2 toxin, diacetoxyscirpenol, and deoxynivalenol. In: *Activities Staff Booklet*. US Food and Drug Administration Industry, 2000.

- Takahashi, D.M. Reverse-phase high-performance liquid chromatographic analytical system for aflatoxins in wines with fluorescence detection. *Journal of Chromatography*. **1977**, 131, 147-156.
- Trucksess, M. W. Natural Toxins. In *Official Methods of Analysis of the AOAC International*. Chapter 49, 18th ed.; Horwitz, W.; Latimer, G. W., eds.; AOAC International, 2006. pp 1-5.
- Turkish Food Codex Regulation on Contaminants. *Official Gazette, No. 28157, 29*. Turkey, December, 2011. Disponible en:
http://faolex.fao.org/cgi-bin/faolex.exe?rec_id=110178&database=faolex&search_type=link&table=result&lang=eng&format_name=@ERALL (Consultado el 26 de enero 2014).
- Uribe-Yunda, D.F.; Navas, M.C. Mecanismos moleculares involucrados en la mutagenicidad inducida por aflatoxina B₁. *Revista Ciencias de la Salud*. **2012**, 10, 403-419.
- Waard, P.W.F.; Anunciado I.S. 1999. *Piper nigrum* L. In: PROSEA (Plant Resources of South-East Asia) Foundation. Internet Record Proseabase. De Guzman, C.C.; Siemonsma, J.S., eds., Bogor, Indonesia, 1999. Disponible en: <http://www.proseanet.org> (Consultado 18 de agosto de 2013).
- Wagacha, J.M.; Muthomi, J.W. Mycotoxin problem in Africa: Current status, implications to food safety and health and possible management strategies. *International Journal of Food Microbiology*. **2008**, 124, 1-12.
- Wang, J.S.; Groopman, J.D. DNA damage by mycotoxins. *Mutation Research*. **1999**, 424, 167-181.
- Willis, R.M.; Mulvihill, J.J.; Hoofnagle, J.H. Attempted suicide with purified aflatoxin. *Lancet*. **1980**, 1, 1198-1199.

Wilson, J.; Romer, R. Use of the Mycosep multifunctional cleanup column for liquid chromatographic determination of aflatoxins in agricultural products. *Journal Association of Official Analytical Chemists*. **1991**, 74, 951-956.

Wogan, G.N. Chemical nature and biological effects of the aflatoxins. *Bacteriological Reviews*. **1966**, 2, 460–470.

Yang, Y.C.; Lee, S.G.; Lee, H.K. A piperidine amide extracted from *P. longum* L. fruit shows activity against *Aede aegypti* mosquito larvae. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2002**, 50, 3765–3767.