



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LAS TOXINAS
CANCERÍGENAS LLAMADAS AFLATOXINAS DE LOS HONGOS
ASPERGILLUS SPP. EN LA ALMENDRA (*Prunus dulcis*).**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGO

PRESENTA

EDUARDO OLMEDO LÓPEZ

**DIRECTOR DE TESIS:
DRA. MAGDA CARVAJAL MORENO**

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX., 2018





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO

PRESIDENTE: Dr. Joaquín Cifuentes Blanco

VOCAL: Dra. María del Carmen Auxilio González Villaseñor

SECRETARIO: Dra. Magda Carvajal Moreno

1er. SUPLENTE: M. en C. Rebeca Martínez Flores

2° SUPLENTE: Biól. Samuel Aguilar Ogarrio

DEDICATORIA

A mis padres

Eduardo Olmedo Espejel y Sofía Beatriz López Carreón

Y a mi hermano

Ricardo Olmedo López

Les agradezco por todo el apoyo, comprensión, confianza y sobre todo la paciencia que me han tenido. Tengan presente que cada objetivo cumplido a lo largo de mi vida, es un trofeo que les dedico a ustedes con todo el corazón.

A mi abuelo

Alfonso López Vázquez

Ejemplo que el valor de la honestidad, perseverancia y humildad son armas muy importantes para triunfar en la vida.

A mi profesor de Bioquímica

Dr. Armando Butanda Ochoa

Por su amistad y confianza pero sobre todo haber sido el único profesor durante la carrera que creyó en mí y en mi talento cuando nadie más lo hizo.

AGRADECIMIENTOS

A las personas

Dra. Magda Carvajal Moreno, por dirigir esta tesis de Licenciatura, por compartir sus conocimientos conmigo, apoyarme para su realización con el equipo y materiales necesarios, revisarla con sumo cuidado, incorporarme a su proyecto de investigación y al laboratorio de Micotoxinas del Instituto de Biología, UNAM.

M. en C. Francisco Rojo Callejas, por asesorarme a lo largo de este proyecto, que sin sus conocimientos sobre química analítica este trabajo no hubiese sido posible.

Dra. Silvia Ruiz-Velasco Acosta del Instituto en Matemáticas Aplicadas y en Sistemas (IIMAS) de la UNAM, por su apoyo en Análisis Estadísticos.

Al Jurado de Licenciatura en Biología por sus observaciones, correcciones y recomendaciones durante la revisión de esta tesis.

A las Instituciones

Instituto de Biología, UNAM por el laboratorio, metodología, equipo y reactivos.

A la Facultad de Ciencias de la UNAM por la carrera de Biología.

INDICE		
Contenido		Página
Título		i
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 almendra	1
I.1.1.	Origen	2
I.1.2.	Descripción Botánica	2
I.1.3.	Características del fruto, cáscara y semilla	4
I.1.4.	Valor Nutricional	5
I.1.5.	Producción de la Almendra en el mundo y en México.	9
I.1.5.1.	Estados Unidos	9
I.1.5.2.	España	9
I.1.5.3.	Australia	10
I.1.5.4.	Irán	10
I.1.5.5.	Marruecos	10
I.1.5.6.	México	10
I.2.	Micotoxinas	14
I.2.1.	Generalidades de las Aflatoxinas	16
I.2.1.1.	Estructura y propiedades fisicoquímicas	17
I.2.1.2.	Efectos a la salud animal y humana	19
I.2.1.3.	Regulación Sanitaria en México	22
I.2.1.4.	Las aflatoxinas en la almendra	23
II.	Hipótesis	26
III.	Objetivos	27
III.1.	General	27
III.2.	Particulares	27
IV.	Materiales y Métodos	28
IV.1.	Muestreo	28
IV.2.	Extracción química de las AFs	29
IV.3.	Derivatización	30
IV.4.	Cuantificación de AFs por cromatografía de líquidos.	31
IV.5.	Validación del método.	31
IV.5.1.	Linealidad	32
IV.5.2.	LOD y LOQ	34
IV.5.3.	Porcentaje de recuperación	34
IV.5.4.	Selectividad	35
IV.6.	Análisis Estadístico	36
V.	Resultados y Discusión	37
V.1.	Validación del método	37
V.1.1.	Linealidad	37
V.1.2.	LOD y LOQ	46
V.1.3.	Porcentaje de recuperación	46
V.1.4.	Selectividad	48
V.2.	AFs en las muestras de almendra	48
V.2.1.	Análisis Estadístico	52
VI.	Conclusiones	59
VII.	Referencias	60

LISTA DE TABLAS

N°	Contenido	Página
1	Composición química y nutricional de la almendra (MAPAMA, 2013; EFSA, 2010).	6
2	Superficie y producción de almendra en México (INEGI, 1998).	12
3	Propiedades físicoquímicas de Aflatoxinas y sus metabolitos (OPS, 1983).	33
4	Rangos de límites de detección para cada AF según las pruebas de linealidad.	37
5	Curva de calibración de AFB ₁	38
6	Curva de calibración de AFB ₂	39
7	Curva de calibración de AFG ₁	40
8	Curva de calibración de AFG ₂	41
9	Curva de calibración de AFM ₁ .	42
10	Curva de calibración de AFM ₂ .	43
11	Curva de Calibración de AFP ₁ .	44
12	Curva de Calibración de AFL.	45
13	LOD y LOQ para cada Aflatoxina.	46
14	Datos del experimento de Porcentaje de Recuperación	46
15	Criterios de aceptación para recuperar residuos y contaminantes en alimentos y agua (SSA, 2011) y Criterios para recuperar aflatoxinas (CE, 2006).	47
16	Aflatoxinas (ng g ⁻¹) en 1 g de las 35 muestras de almendra.	49
17	Aflatoxinas básicas (ng g ⁻¹) en 1 g de las 35 muestras de almendra.	50
18	Hidroxilados de Aflatoxinas (ng g ⁻¹) en 1 g de las 35 muestras de almendra	51
19	Pruebas de Kruskal-Wallis	52
20	Comparación de AFM ₂ entre las demás AFs	52

LISTA DE FIGURAS

N°	Contenido	Página
1	Almendro (<i>Prunus dulcis</i>), flor, fruto y semilla (almendra) (INEGI, 1998).	3
2	Anatomía del fruto del almendro (Bennett, 2014).	4
3	Productos de almendras: forma natural, confitería, cereales, helados, panadería, mazapanes, turrón, leche, aceites y cremas.	8
4	Principales países productores de almendra en el mundo (USDA, 2017).	11
5	Superficie plantada de almendro en ciclo 1990-1991.	13
6	Producción de almendra en 1990-1991 en México.	13
7	Vista macroscópica y microscópica de <i>A.flavus</i> e infección de semillas de almendra y de maíz con hongos.	15
8	Estructura química de las aflatoxinas B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂ , M ₁ y M ₂ (Hussein & Brasel, 2001).	18
9	Estructura química del Aflatoxicol y de la aflatoxina P ₁ (Soriano, 2007).	18
10	Localización de los 3 mercados muestreados.	29
11	Curva de calibración de AFB ₁	38
12	Curva de calibración de AFB ₂	39
13	Curva de calibración de AFG ₁	40
14	Curva de calibración de AFG ₂	41
15	Curva de calibración de AFM ₁	42
16	Curva de calibración de AFM ₂	43
17	Curva de calibración de AFP ₁	44
18	Curva de calibración de AFL ₁	45
19	Cromatogramas que demuestran el porcentaje de recuperación.	47
20	Cromatograma de la comprobación de la selectividad.	48
21	Cromatograma de la muestra 22 de almendra con una concentración de AFt de 702.26 ng g ⁻¹ e identificación de 7 de las 8 AFs reportadas.	53
22	Ruta biosintética de la esterigmatocistina y aflatoxinas	56

RESUMEN

La almendra (*Prunus dulcis*) es la semilla de la planta dicotiledónea perteneciente a la familia Rosaceae y se consume como alimento en forma natural o procesada. Las aflatoxinas (AFs) son metabolitos secundarios producidos por algunas especies de hongos del género *Aspergillus* principalmente *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus* 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 probados para humanos.

La contaminación por aflatoxinas en la almendra no se ha investigado en México a pesar de su importancia, por lo tanto, el propósito de esta investigación fue identificar y cuantificar aflatoxinas en 35 muestras de almendra de tres mercados de la Ciudad de México. Se validó el método analítico por medio de columnas de inmunoafinidad y utilizando un equipo de Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (HPLC).

En las almendras analizadas se encontró la presencia de ocho AFs incluyendo las cuatro básicas: aflatoxina B₁ (AFB₁), aflatoxina B₂ (AFB₂), aflatoxina G₁ (AFG₁) y aflatoxina G₂ (AFG₂) y sus cuatro hidroxilados: aflatoxina M₁ (AFM₁), aflatoxina M₂ (AFM₂), aflatoxina P₁ (AFP₁) y aflatoxicol (AFL). Estos resultados se reportan por primera vez no solamente en México sino también a nivel mundial.

Las 35 muestras analizadas resultaron contaminadas; con un promedio de aflatoxinas totales (AFt) de 273.22 ng g⁻¹ y con al menos una de las ocho AFs: el 80% (28/35) presentó contaminación por AFB₁, el 89 % (31/35) de AFB₂, 74 % (26/35) de AFG₁, 83 % (29/35) con AFG₂, 40 % (14/35) de AFM₁, 91 % (32/35) de AFM₂, 83 % (29/35) de AFP₁ y 86 % (30/35) con AFL. Los análisis estadísticos señalan que no hay diferencias significativas entre las aflatoxinas básicas pero sí entre sus hidroxilados, siendo la AFM₂ significativamente diferente a todas las demás.

La almendra resultó ser uno de los alimentos más contaminados con aflatoxinas por lo que no cumplen con los límites establecidos a nivel mundial para los frutos secos. Las cantidades de aflatoxina en almendra constituyen un riesgo para el consumidor y un aporte importante de cancerígenos a los alimentos de la dieta.

ABSTRACT

The almond (*Prunus dulcis*) is the seed of the dicotyledonous plant from the Rosaceae family and is consumed as a natural or processed food. Aflatoxins (AFs) are secondary metabolites produced by some species of fungi of the genus *Aspergillus* mainly *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* with adverse effects on human and animal health. The International Agency for Research on Cancer classifies aflatoxins in Group 1 of proven carcinogens for humans.

Aflatoxin contamination in almonds has not been investigated in Mexico despite its importance, therefore, the purpose of this research was to identify and quantify aflatoxins in 35 almond samples of three markets in Mexico City. The analytical method was validated by means of immunoaffinity columns and using a High Performance Liquid Chromatography (HPLC) equipment.

In the analyzed almonds, eight aflatoxins were found, the four basic ones: aflatoxin B₁ (AFB₁), aflatoxin B₂ (AFB₂), aflatoxin G₁ (AFG₁) and aflatoxin G₂ (AFG₂), as well as their four hydroxylates: aflatoxin M₁ (AFM₁), aflatoxin M₂ (AFM₂), aflatoxin P₁ (AFP₁) and aflatoxicol (AFL). These results are reported for the first time not only in Mexico but also worldwide.

All the 35 samples were AF contaminated; with an average of total aflatoxins (AFt) of 273.22 ng g⁻¹ and with at least one of the eight AF: 80% (28/35) were contaminated with AFB₁, 89 % (31/35) with AFB₂, 74 % (26/35) with AFG₁, 83 % (29/35) with AFG₂, 40 % (14/35) with AFM₁, 91 % (32/35) with AFM₂, 83 % (29/35) with AFP₁ and 86 % (30/35) with AFL. The statistical analysis showed that there are no significant differences between the basic aflatoxins but there were among their hydroxylates, with AFM₂ being significantly different from all the others.

The almond seed turned out to be one of the most contaminated foods with aflatoxins and does not accomplish the tolerable limits established worldwide for nuts. The amounts of aflatoxin in almonds represent a risk to the consumer and also an important contribution of food carcinogens in the diet.

I. INTRODUCCIÓN

I.1. Generalidades del cultivo de la almendra.

La almendra, pertenece a la familia Rosaceae. Se trata de un fruto de cáscara dura y quebradiza de color marrón-pardo, cuya semilla es la parte comestible. Tiene forma de lágrima aplanada, y mide 1-2 cm de largo. Nace del almendro [*Prunus dulcis* (Miller) D.A. Webb (sin. *Prunus amigdalus*, L., Batsch)], un árbol que alcanza hasta 10 m de altura, y cuyas flores pueden ser de color blanco, rosado o blanco rosáceo (MAPAMA, 2013). **Figura 1.**

Para su cultivo requiere una temperatura entre 15 y 18°C, inviernos suaves y veranos calurosos. En cuanto al agua, necesita cuando menos 600 mm de lluvia al año. Es un árbol poco exigente respecto a la calidad de los terrenos en los que se asienta (SIAP, 2012). Gracias a su adaptación a los climas duros, combinada con la capacidad de desarrollar un sistema extenso de raíces ha permitido a la almendra ser cultivada en una gran variedad de nichos ecológicos partiendo desde su origen ancestral en Asia central extendiéndose al desierto de Takla Makan en el oeste de China hasta el Mediterráneo y el resto del mundo, lo anterior debido a que la almendra es auto-estéril y requiere polinización cruzada que actúa además para promover la variabilidad genética y, por lo tanto, la adaptabilidad a nuevos ambientes (Gradziel, 2009).

Sin embargo, su árbol es exigente en nutrientes, como potasio, nitrógeno, magnesio y fósforo. El nitrógeno es fundamental para la formación de tejidos vegetales en hojas, madera y raíces; es la base para la síntesis de proteínas y para la clorofila, indispensable para la asimilación de nutrientes. Por ello, el agricultor debe agregar al suelo algunos elementos para mejorar el cultivo, como son sulfato potásico y azufre, esencial para la nutrición de las plantas. Las almendras se recogen cuando están maduras (SIAP, 2012).

La producción comercial se limita a menudo por la necesidad de polinización cruzada especialmente en zonas donde las tormentas de primavera pueden reducir tanto la duración de la floración como la actividad de los polinizadores de los insectos requeridos. Una alta susceptibilidad a enfermedades fúngicas y bacterianas en las flores, hojas, y ramas también reduce la producción en áreas con lluvia y / o alta

humedad durante la época de crecimiento (Gradziel, 2009). De manera similar, la humedad excesiva en la zona de las raíces puede resultar en la pérdida de árboles debido a asfixia.

I.1.1. Origen

Las primeras investigaciones proponen que la almendra cultivada resultó de la selección dentro de una especie referida originalmente como *Amygdalus communis* L. (sin. *Prunus communis* Archang.) basado en estudios de dos poblaciones naturales originalmente identificados como *A. communis* las cuales contienen un gran número semillas dulces en lugar de las amargas típicamente encontradas en la naturaleza (Das *et al.*, 2011). Una de estas poblaciones está situada en la cordillera Kobet Dag, en el centro de Asia, entre el actual Irán y Turkmenistán, la segunda población se encuentra en las laderas más bajas de las montañas de Tian Shan entre Kirguistán y China occidental. Se propone que el área natural de *A. communis* se extendió por todo Irán, la Transcaucasia, el este de Turquía, y en la actual Siria, coincidiendo con los lugares de la zona actual del Cercano Oriente en los que se tienen registros de los primeros cultivos de Almendra, y a partir de ahí llegó a Grecia y a Roma, y los romanos la difundieron ampliamente por el resto de Europa, desde donde llegó hasta América (Gradziel, 2009).

La etimología del nombre en español pasa por una arabización de *mandarla*, y ésta de la palabra latina *amyndaġla* —que por su parte es una variación de *amygdaġla*— (RAE, 2017).

I.1.2. Descripción Botánica

La almendra es el fruto del almendro (*Prunus dulcis*) de la familia Rosaceae. Existen dos tipos de almendro: los de almendra dulce y los de almendra amarga; los primeros se dividen en 2 grupos: los de cáscara dura (endocarpio) y los de cáscara suave o “de papel”.

El árbol es semejante al durazno en forma y tamaño pero más longevo, de 4 a 5 m de altura aproximadamente, aunque puede llegar hasta los 10 m, de madera dura y corteza dura y agrietada, excepto cuando es joven, las ramas pueden ser erguidas o pendientes. Las hojas brillantes, elípticas y lanceoladas nacen después de la floración,

y tienen bordes finamente dentados, con glándulas en la lámina y en el pecíolo, cuando salen de la yema están plegadas a lo largo de la vena principal. Las flores son blancas o rosadas, regulares, bisexuales, generalmente solitarias, axilares, grandes, con el cáliz corto y ancho, muy abierto, sostenidas por un pedicelo corto, tienen de 15 a 30 estambres.

El fruto es una drupa que al madurar (8 meses aproximadamente) su parte carnosa (mesocarpio), muy delgada, se vuelve correosa y se desprende fácilmente del hueso (endocarpio), éste último, es redondeado en su base y un poco agudo en su extremo, comprimido, con un borde casi recto y el otro arqueado, con hoyuelos y estriado irregularmente, al interior se encuentra una sola semilla (almendra) protegida por una piel de color parduzco rojizo cuando ésta madura (INEGI, 1998). **Figura 1.**



Figura 1: Almendro (*Prunus dulcis*), flor, fruto y semilla (almendra).

I.1.3. Características del fruto, cáscara y semilla

La almendra no es una nuez verdadera, sino una drupa, que consiste en un exocarpo y una cáscara dura (endocarpo) con la semilla (núcleo) en el interior, la cuál está envuelta por un tegumento de color café. **Figura 2.** La semilla de almendra es muy nutritiva, con un contenido de agua extremadamente bajo (4 a 6%) y con altos niveles de proteínas (18%), grasas (54%) y carbohidratos (20%) (Rodriguez *et al.*, 2012).

Los frutos del almendro varían en tamaño, forma, pubescencia, configuración y retención de los remanentes de pistilo y la naturaleza de la línea de sutura dependiendo de la variedad cultivada. Las características de la cáscara también afectan la relativa facilidad con la que se remueven las semillas del árbol durante la cosecha y la capacidad de secarse rápidamente. La dureza de la cáscara está asociada con la cantidad total de lignina depositada durante el desarrollo. La integridad de la cáscara, particularmente en línea de unión, es importante, ya que las cáscaras mal selladas tienen semillas expuestas y son muy susceptibles a las enfermedades y a daños por insectos; la cáscara consta de una capa externa e interna separada por canales a través de los cuales se desarrollan fibras vasculares. La drupa posee una semilla con dos cotiledones grandes; el tamaño, la forma y el peso de la semilla están relacionados por el tipo de variedad y tienden a establecer su tipo de uso y venta. (Gradziel, 2009).

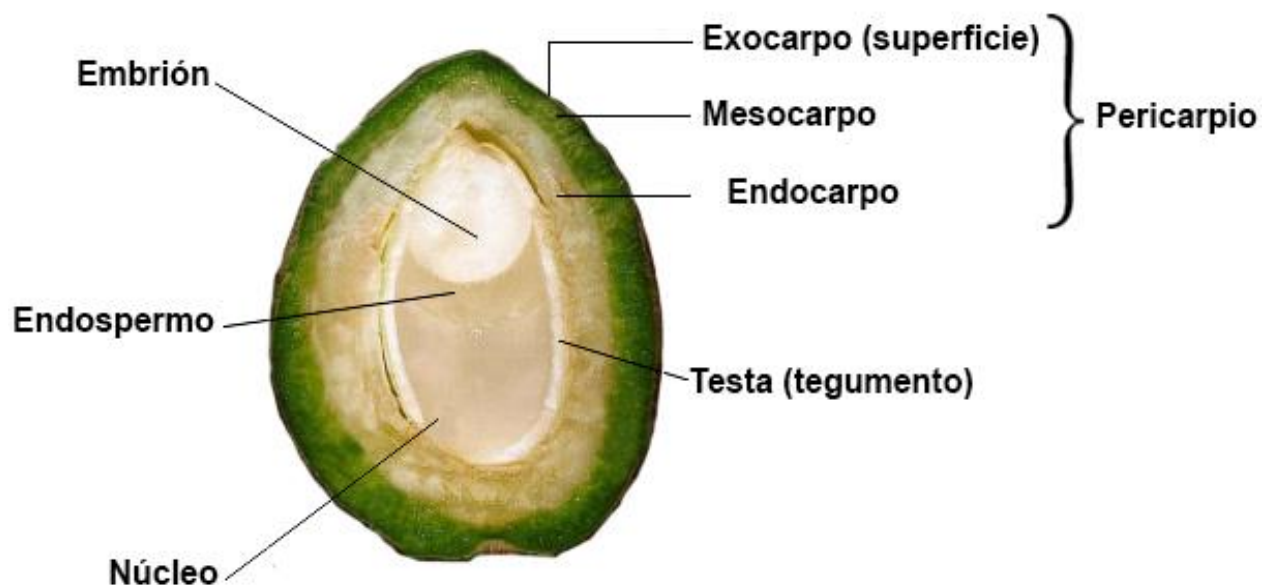


Figura 2: Anatomía del fruto del almendro.

I.1.4. Valor nutrimental

La almendra dulce presenta un elevado contenido en grasas, sobre todo insaturadas; aquellas que benefician la salud cardiovascular, gran cantidad de proteínas vegetales, y en menor medida, carbohidratos. Las proteínas que contienen son de buena calidad; completas en su contenido en aminoácidos esenciales. Su valor calórico es bastante elevado por su alto contenido de grasas y su escasa cantidad de agua. El contenido en fibra de la almendra destaca sobre el resto de los frutos secos, por lo que tiene un efecto laxante mayor.

Entre los minerales destacan el fósforo y magnesio. Una ración de 20 g de almendras sin cáscara aporta el 15% de las ingestas diarias recomendadas para estos minerales, y alrededor del 6% de las señaladas para el hierro, potasio y calcio. **Tabla 1.**

Es una de las fuentes vegetales más rica en calcio y fósforo, de ahí que la leche de almendras se emplee como sustituto de la leche de vaca cuando ésta no se tolera, y se recomienda su consumo para fortalecer los huesos y prevenir la osteoporosis. Por tanto, las almendras se recomiendan a niños en crecimiento y a deportistas.

En cuanto a las vitaminas, la almendra tiene cantidades moderadas de vitaminas del grupo B, además de ser una buena fuente de vitamina E, de acción antioxidante. La cantidad de zinc, y de fitoesteroles, se suman a esta acción antioxidante, que previene la formación de células cancerígenas y las enfermedades degenerativas de los diferentes órganos (MAPAMA, 2013).

Tabla 1: Composición química y nutricional de la Almendra (MAPAMA, 2013; EFSA, 2010).

Valor nutrimental	Porción comestible 100 g.	Por ración (20 g)	Recomendaciones día-hombre	Recomendaciones día-mujer
Energía (Kcal)	604	121	3.000	2.300
Proteínas (g)	20	4.0	54	51
Lípidos totales (g)	53.5	10.7	100-117	77-89
AG saturados (g)	4.24	0.85	23-27	18-20
AG monoinsaturados (g)	36.66	7.33	67	51
AG poli-insaturados (g)	10.03	2.01	17	13
ω -3 (g)*	0.256	0.051	3.3-6.6	2.6-5.1
C18:2 Linoleico (ω -6) (g)	9.77	1.954	10	8
Colesterol (mg/1000 kcal)	0	0	<300	<230
Carbohidratos (g)	3.5	0.7	375-413	288-316
Fibra (g)	14.3	2.9	>35	>25
Agua (g)	8.7	1.7	2.500	2.000
Calcio (mg)	254	50.8	1.000	1.000
Hierro (mg)	4.2	0.8	10	18
Yodo (μ g)	2	0.4	140	110
Magnesio (mg)	258	51.6	350	330
Zinc (mg)	1.7	0.3	15	15
Sodio (mg)	6	1.2	<2.000	<2.000
Potasio (mg)	860	172	3.500	3.500
Fósforo (mg)	510	102	700	700
Selenio (μ g)	4	0.8	70	55
Tiamina (mg)	0.24	0.05	1.2	0.9
Riboflavina (mg)	0.67	0.13	1.8	1.4
Equivalentes niacina (mg)	5.3	1.1	20	15
Vitaminas:				
B6 (mg)	0.1	0.02	1.8	1.6
Folatos (μ g)	96	19.2	400	400
B12 (μ g)	0	0	2	2
C (mg)	Tr	Tr	60	60
A: Eq. Retinol (μ g)	0	0	1.000	800
D (μ g)	0	0	15	15
E (mg)	20	4.0	12	12

Nota: Tabla de Composición para almendra sin cáscara. Recomendaciones: Ingestas recomendadas al día para hombres y mujeres de 20 a 39 años con una actividad física moderada. Tr: Trazas. 0: Virtualmente ausente en el alimento. *Datos incompletos. AG = Ácidos grasos. ω -3 = Omega 3. Eq. = equivalente

La almendra se puede cortar en rodajas o en trozos para utilizarse en pasteles, helados, cereales para el desayuno y mezclas vegetales. También se trituran y se usan en panadería y en la producción de mazapán (Gradziel, 2009).

Las almendras se pueden transformar en un sustituto de la leche llamado leche de almendras; su textura, su sabor suave, y su coloración ligera (cuando está pelada) lo hacen un buen sustituto al producto lácteo al igual que la soya para los veganos y personas intolerantes a la lactosa.

También son una rica fuente de aceite, con un 50% de peso seco como grasa. El aceite es bueno para la aplicación en la piel como emoliente, y ha sido tradicionalmente utilizado por los terapeutas de masaje para lubricar la piel durante una sesión (Shipman *et al.*, 1997). También se emplea en forma de crema y ungüentos para todo tipo de piel.

La almendra se consume en su forma natural o procesada. Debido a su buen sabor, textura crujiente y buen atractivo visual, tiene muchos usos importantes en alimentos. **Figura 3.** Los granos pueden ser tostados en seco o en aceite, como ingrediente en muchos productos alimenticios manufacturados, y se salan con varios condimentos. La almendra puede ser blanqueada o no, el blanqueo elimina la "piel" usando agua caliente o vapor. Grandes cantidades de granos se combinan con el chocolate en la confitería.



Figura 3. Productos de almendras: forma natural, confitería, cereales, helados, panadería, mazapanes, turrón, leche, aceites y cremas.

I.1.5. Producción de la Almendra en el Mundo y en México.

La producción mundial de almendras fue de 2.9 millones de toneladas en 2013, con Estados Unidos como el mayor productor con 1.8 millones de toneladas (FAOSTAT, 2014). El 70% de todas las almendras del mundo provienen de California. Esto incluye el 98.5% de todas las almendras en los EE.UU (USDA, 2010). Las almendras fueron plantadas en California alrededor de 1853 (Wickson, 2007) y desde 1987, Estados Unidos ha sido el mayor productor mundial de almendras (USDA, 2010) seguida por España, Australia, Irán y Marruecos (FAOSTAT, 2014). **Figura 4.**

I.1.5.1. Estados Unidos

Produjo 1,545,500 ton en el 2014. California es su principal región productora. Alrededor del 70% de las almendras se exportan con cáscara y el resto se procesa o se vende sin cáscara. El cultivo de almendras en California es de clima templado con suelos fértiles y sol abundante, combinado con equipo y técnicas durante el crecimiento, cosecha, procesamiento y envasado. Cuando la producción se reduce en California, afecta al mercado global y el precio de las almendras aumenta. Este caso ocurrió en 2015, resultando en un aumento de la demanda de almendras en todo el mundo. Estados Unidos cultiva la variedad dulce de las almendras con fines alimenticios tanto local como internacionalmente (FAOSTAT, 2014).

I.1.5.2. España

Se produjeron 195,704 ton en 2014 y tiene una amplia gama de cultivadores comerciales. El cultivo se lleva a cabo en la región de Valencia, Cataluña, Andalucía, Murcia y Aragón. Las principales variedades cultivadas son Marcona y Desmayo Langueta y representan casi el 40% de la producción nacional. Los huertos modernos cultivan las variedades Ferragnes Ferraduel y Cristomorto. La almendra se consume principalmente cruda, tostada para elaborar un aperitivo salado, como elemento de sabor en la sopa de nombre "ajo blanco", y el turrón (FAOSTAT, 2014).

I.1.5.3. Australia

Es el mayor productor de almendras en el hemisferio sur, y produjo 160,000 ton en 2014. La producción de éstas se encuentra en la región alrededor del río Murray como Victoria, News South Wales y el sur de Australia. Las variedades cultivadas incluyen Nonpareil, Chellaston, Mission y Firtz. En el país, se utilizan principalmente en su forma natural, para hacer esencias de almendra, y para sazonar en la comida (FAOSTAT, 2014).

I.1.5.4. Irán

La producción de almendras en Irán, en el 2014, fue de 111,936 ton. El cultivo tiene lugar en el noroeste de Irán y en la región de Tabriz, y la variedad *Amygdalus communis* es nativa del país. El país cultiva tanto la variedad dulce como las variedades agridulces. Los almendros nacen de semillas, con la India como el principal mercado de exportación. Las almendras que se producen se sumergen en sal marina y se venden como aperitivos en las calles. Las almendras dulces se utilizan para preparar, "harire badan", un alimento para bebé, y como sazonador en alimentos y postres. Las almendras son una delicadeza en los eventos de Año Nuevo en Irán (FAOSTAT, 2014).

I.1.5.5. Marruecos

Produjo 101,026 ton de almendras dulces en el 2014. El 65% de la producción de almendra crece en condiciones mediterráneas ideales, en agricultura a pequeña escala. La almendra se utiliza para preparar una pasta, siendo el ingrediente principal en rellenos de pastelería y muchos otros postres. Otros usos incluyen la preparación de "sellou", un bocado dulce, y el conocido como "amlou" que es una pasta de almendra y las bebidas de ella (FAOSTAT, 2014).

I.1.5.6. México

Se sembraron 254 Ha de almedro en el ciclo 1990-1991, en 31 entidades. El consumo de la almendra *per cápita* es de 19 g anuales y es cultivado en escasas extensiones (INEGI, 1998), **Tabla 2**. Resaltan Chiapas con 48 ha, Oaxaca con 43 ha, Guerrero con 24 ha, Chihuahua con 21 ha y Veracruz con 20 ha que representan 61% de la superficie plantada. Las 26 entidades restantes tuvieron una superficie de 98 ha plantadas, **Figura 5**.

En cuanto a la producción nacional 25 entidades registraron producción de almendra con un total de 99 ton, de las que destacaron tres entidades como las principales: Baja California con 31%, Nayarit con 27% y Oaxaca con 21% (INEGI, 1998). En contraste, trece entidades sólo aportaron 2% de la almendra producida en el país, **Figura 5.**

No se tienen datos oficiales desde 1991, en cuanto a la producción de almendra en este país, sin embargo, de acuerdo a la USDA durante el 2016 México importó 10, 000 ton de almendras con cáscara provenientes de Estados Unidos el cual ocupa el primer lugar en exportación de este fruto seco (USDA, 2017).



Figura 4: Principales países productores de almendra en el mundo.

Tabla 2: Superficie y producción de almendra en México (INEGI, 1998).

Almendro	Unidades de Producción	Superficie			Producción Obtenida (ton)
		Total (ha)	Con Plantaciones		
			En desarrollo (ha)	En producción (ha)	
Estados Unidos Mexicanos	2391	253.646	122.198	131.446	99.440
Aguascalientes	5	1.039	0.007	1.032	0.002
Baja California	60	14.153	2.487	11.666	30.442
Baja California Sur	13	1.857	0.067	1.790	0.100
Campeche	19	4.353	0.632	3.721	2.152
Coahuila	3	2.004	2.004	-	-
Colima	27	0.339	0.098	0.241	0.194
Chiapas	108	48.451	18.387	30.064	2.256
Chihuahua	4	21.018	21.016	0.002	0.010
Distrito Federal	3	0.000	0.000	-	-
Durango	12	18.133	2.794	15.339	0.012
Guanajuato	5	2.903	2.903	-	1.340
Guerrero	370	23.725	15.326	8.399	2.196
Hidalgo	6	14.725	14.056	0.669	3.901
Jalisco	14	0.068	0.052	0.016	0.044
México	5	1.319	1.010	0.309	2.182
Michoacán	109	2.054	0.934	1.120	1.227
Morelos	38	0.412	0.318	0.093	0.199
Nayarit	530	7.122	0.318	6.804	26.964
Nuevo León	*	0.004	0.004	-	-
Oaxaca	564	42.654	22.334	20.320	21.101
Puebla	*	0.118	-	0.118	0.001
Querétaro	-	-	-	-	-
Quintana Roo	26	1.648	0.700	0.948	0.535
San Luis Potosí	11	6.085	3.500	2.585	0.092
Sinaloa	157	2.292	0.097	2.194	0.631
Sonora	8	13.252	6.001	7.251	1.051
Tabasco	*	0.155	0.005	0.150	-
Tamaulipas	7	0.080	0.080	-	-
Tlaxcala	4	2.000	1.000	1.000	0.023
Veracruz	266	19.865	4.275	15.590	2.513
Yucatán	5	1.216	1.192	0.024	-
Zacatecas	8	0.602	0.601	0.001	0.002

**SUPERFICIE PLANTADA CON ALMENDRO EN EL AÑO AGRÍCOLA 1990-1991
POR ENTIDAD FEDERATIVA**

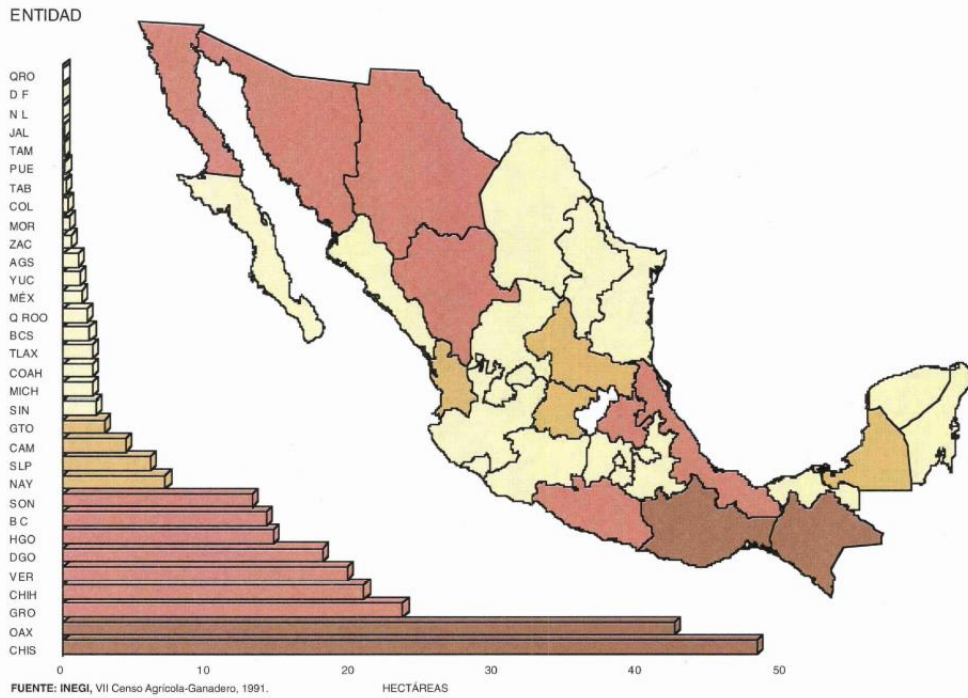


Figura 5: Superficie plantada de almendro en ciclo 1990-1991.

**PRODUCCIÓN DE ALMENDRA EN EL AÑO AGRÍCOLA 1990-1991
POR ENTIDAD FEDERATIVA**

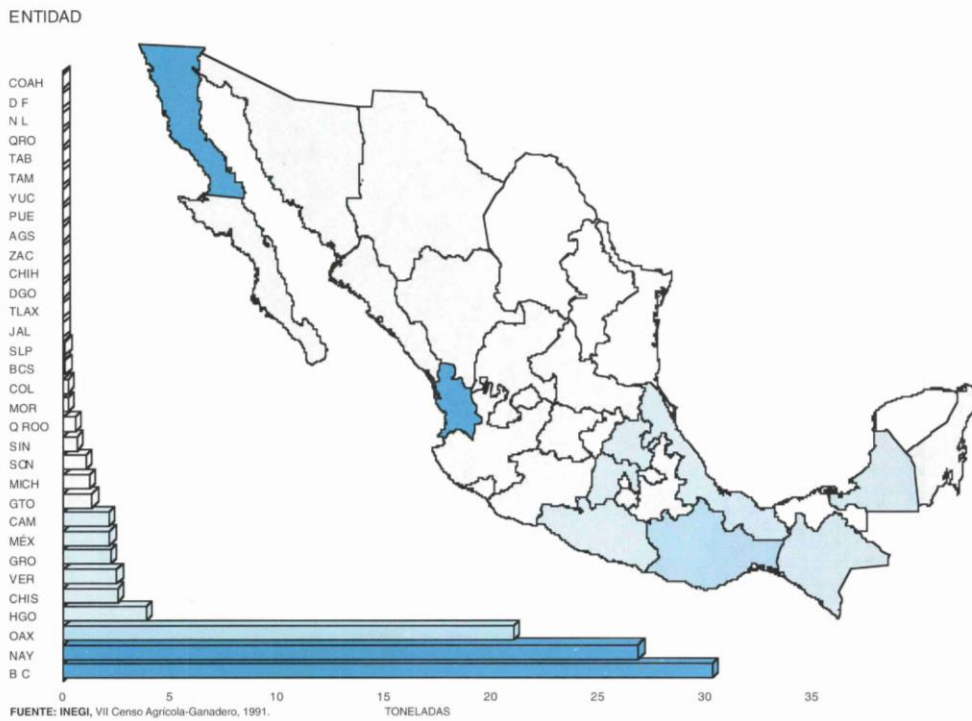


Figura 6: Producción de almendra en 1990-1991 en México.

I.2. Micotoxinas

La palabra micotoxina deriva de las palabras griegas *mikes* y *toxina* que significan hongo y veneno respectivamente, son metabolitos secundarios tóxicos producidos por diferentes hongos filamentosos que pueden causar enfermedades en animales vertebrados cuando son introducidos por medio de alguna vía natural: ingeridos, absorbidos a través de la piel o inhalados y son moléculas relativamente pequeñas ($P_m < 700$) (Frisvad *et al.*, 2007; Soriano, 2007).

Las micotoxinas pueden contaminar los alimentos o las materias primas utilizadas para su elaboración, originando un grupo de enfermedades y trastornos denominados *micotoxicosis*, y que resultan tóxicos para el hombre o los animales (Gilbert, 2002; Binder, 2007), además las micotoxinas causan pérdidas económicas en las cosechas de granos (García & Heredia, 2006). Hay que tener en cuenta que la presencia de éstas en los alimentos puede ser individual o simultánea con otras, lo que puede provocar efectos sinérgicos sobre el organismo aumentando así su toxicidad (Soriano, 2007).

El crecimiento del hongo y la producción de micotoxinas, son consecuencia de la interacción entre el hongo, su huésped y el ambiente. La combinación de estos factores determina la cantidad de colonización del sustrato así como el tipo y concentración de micotoxina producida (Pitt *et al.*, 2000).

Los hongos micotoxigénicos, asociados a los alimentos de los seres humanos, pertenecen principalmente a 3 géneros: *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*. Mientras que las especies de *Fusarium* son patógenos destructivos de las plantas que producen micotoxinas antes o inmediatamente después de la cosecha, las especies de *Penicillium* y *Aspergillus* se encuentran comúnmente como contaminantes de productos básicos y alimentos durante el secado y su posterior almacenamiento, **Figura 7**.

Estos hongos utilizan metabolitos primarios para su crecimiento que son una serie de compuestos químicos como los ácidos nucleicos, proteínas, carbohidratos y lípidos, y su uso se asocia con la fase exponencial de rápido crecimiento. Los metabolitos secundarios son una serie de compuestos que no son esenciales para el crecimiento y fisiología del organismo productor pero son formados a partir de unos

pocos intermediarios del metabolismo primario, bajo condiciones sub-óptimas y de estrés (Carrillo, 2003) y dentro de este grupo, se encuentran los antibióticos y las micotoxinas. Las micotoxinas suelen formarse cuando la fase de crecimiento llega a su etapa final y al principio de la fase estacionaria (Soriano, 2007).

El nivel de producción de las micotoxinas está influenciado por los nutrientes disponibles en el sustrato. Factores ambientales como la temperatura, agua y atmósferas de gas también afectan su producción (Sweeney & Dobson, 1998).

La formación de las micotoxinas refleja que el hongo ha alcanzado cierto grado de diferenciación bioquímica, fisiológica y morfológica. Actualmente se conocen unas 300 toxinas fúngicas y la mayoría son específicas. Cuanto más compleja es la ruta biosintética de estos metabolitos secundarios, más restringido es el número de especies de hongos productores (Carrillo, 2003).

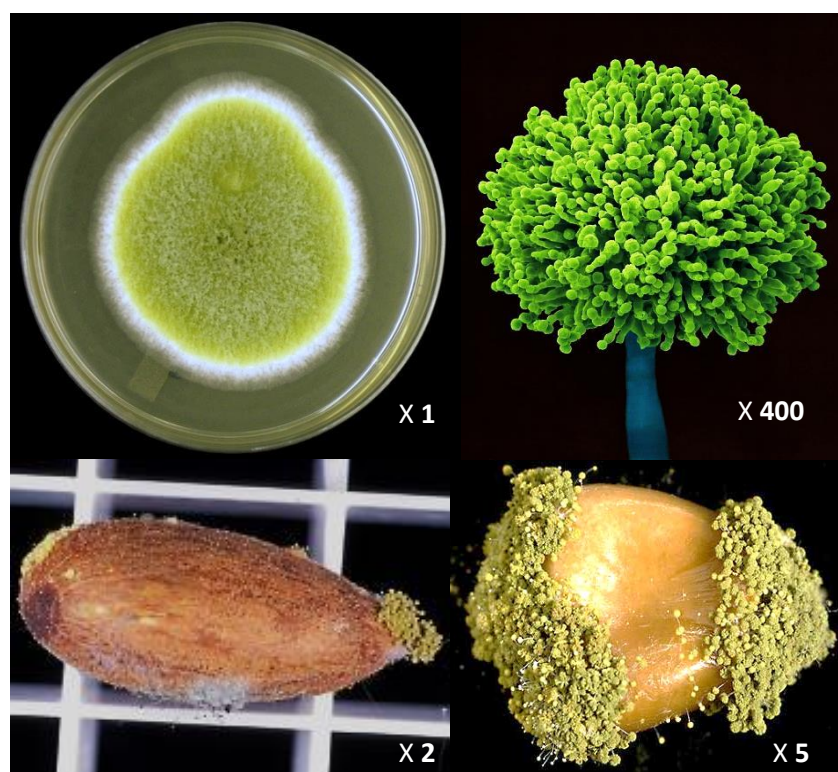


Figura 7: Vista macroscópica y microscópica de *A.flavus* así como la infección sobre una semilla de almendra y de maíz en las que se observan los conidióforos y conidios.

I.2.1. Generalidades de las Aflatoxinas

Las aflatoxinas (AFs) son un grupo de metabolitos secundarios tóxicos y cancerígenos producidos por las especies *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius*, *A. pseudotamarii* (Cheraghali *et al.*, 2007; Feizy *et al.*, 2010) y *A. bombycis* (Cabañes *et al.*, 2007). Las AF se forman al final de la fase exponencial o al principio de la fase estacionaria del crecimiento del hongo (Soriano, 2007).

Las AFs fueron aisladas e identificadas en 1960, cuando Inglaterra importó harina de cacahuate de Brasil, y su ingestión causó la muerte a 100,000 pavos, patos y otros animales domésticos, a causa de una enfermedad conocida como “Enfermedad X de los Pavos” (necrosis hepática), por toxinas de *Aspergillus flavus* (Hussein & Brasel, 2001; D’Mello & MacDonald, 1997; Jaimez *et al.*, 2000; Soriano, 2007).

Estas toxinas, se denominaron “Aflatoxinas” (A= *Aspergillus*, fla = *flavus* y toxina = veneno) con poder cancerígeno. Las cuatro AFs principales se denominaron B₁ (AFB₁), B₂ (AFB₂), G₁ (AFG₁) y G₂ (AFG₂). Las letras B y G se refieren al color de la fluorescencia (azul/blue y verde/green) observada bajo luz UV de onda larga, mientras que los subíndices 1 y 2 indican la velocidad de corrimiento en un cromatograma de capa fina. De éstas, la B₁ y la G₁ se presentan con mayor frecuencia y en mayores cantidades (Carrillo, 2003). **Figura 8.**

Las Aflatoxinas M₁ (AFM₁) y la M₂ (AFM₂) son productos metabólicos oxidativos de las AFB₁ y AFB₂ producidos por los animales después de la ingestión, aparecen en la leche (tanto animal como humana), orina y excrementos. El aflatoxicol (AFL) es un metabolito reductor de la aflatoxina B₁. La aflatoxina P₁ (AFP₁) es el derivado fenólico resultado de la O-desmetilación de la AFB₁. **Figura 9.** Las AFs son compuestos altamente tóxicos, inmunosupresores, mutagénicos, teratogénicos y cancerígenos. La AFG₂ es la menos tóxica de las 4 principales AFs naturales. El órgano blanco principal de toxicidad y carcinogenicidad es el hígado. La AFB₁ se clasificó como Grupo 1 (cancerígeno probado para humanos), mientras que AFM₁ se clasifica como Grupo 2B (posible cancerígeno para los seres humanos) por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) (Peraica *et al.*, 1999; Canestrari *et al.*, 2016).

El rango de temperatura para la producción de aflatoxinas va de 7.5-12 a 40-41°C según los hongos y las condiciones experimentales (Carrillo, 2003) y en el intervalo 0.95-0.99 de actividad de agua (a_w), aunque se ha detallado un mínimo de 0.82 para *A. flavus* a una humedad relativa de 80-85% y un sustrato con humedad de 17%. El nivel más alto de AFs producidas por *A. flavus* en caldo de cultivo se ha observado entre 25 y 30° C tras dos semanas de incubación (Sanchis *et al.*, 2007).

Los cultivos susceptibles de contaminación por hongos productores de AFs son oleaginosas como las nueces, semillas de algodón, pistache y almendras (Cheraghali *et al.*, 2007), cereales como maíz y arroz, especias entre otros. La exposición a las aflatoxinas es difícil de evitar porque no es sencillo prevenir el crecimiento fúngico en los granos y otros productos. Los límites a la concentración de AFs establecidos, para proteger la salud humana y animal, son variables en los distintos países e instituciones (Carrillo, 2003).

I.2.1.1. Estructura y propiedades fisicoquímicas

Químicamente las AFs son bis-dihidrofurano-cumarinas producidas por *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus* a través de una vía policétido (Turner *et al.*, 2009). Su unidad de cumarina varía y puede tener configuración tipo pentanona en las AFB₁ y AFB₂, o bien tipo lactona en las AFG₁ y AFG₂. Las AFB₁ y AFG₁ presentan un doble enlace 8,9 en el anillo terminal de furano (Asao *et al.*, 1965; Büchi *et al.*, 1966), y AFB₂ y AFG₂ tienen un anillo bisfuranil saturado. Las AFs B₂ y G₂ son derivados dihidroxi de AFB₁ y AFG₁ respectivamente, y son biológicamente inactivas hasta que son oxidadas a AFB₁ y AFG₁ *in vivo* (Baltaci *et al.*, 2012). **Figura 8.**

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 en color azul, en tanto que AFG₁ y AFG₂ lo hacen en color amarillo/verde bajo luz ultravioleta de onda larga (Asao *et al.*, 1965; Büchi *et al.*, 1966). Sus pesos moleculares oscilan entre 312 y 350 g/mol y son solubles en disolventes no polares o medianamente polares como el cloroformo, acetonitrilo y metanol, especialmente en dimetil sulfóxido y son insolubles en agua (OPS, 1983; WHO, 1979).

Las AFs son termo-resistentes y estables a temperaturas elevadas, hasta 260°C en AFB₁ y llegando a 320°C en AFM₁. Sin embargo, son inestables cuando se les expone a la luz, particularmente a la radiación UV. Las AFs en cloroformo y en benceno son estables por muchos años si se mantienen en un lugar oscuro y frío (OPS, 1983). Las AFs resisten la cocción, fermentación, pasteurización, ultrapasteurización y la nixtamalización. Sin embargo, pueden ser destruidas con un tratamiento drástico, como el calentamiento en autoclave en presencia de amoníaco o hipoclorito (WHO, 1979).

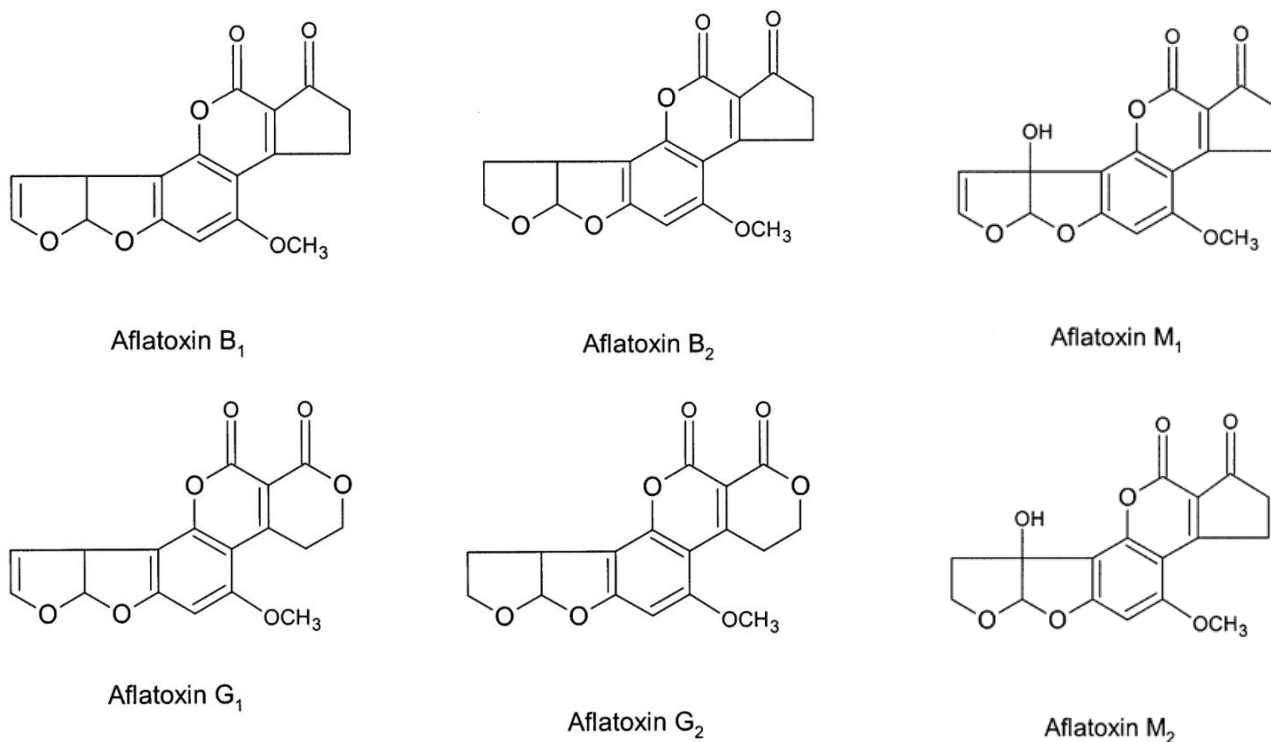


Figura 8. Estructura química de las aflatoxinas B₁, B₂, G₁, G₂, M₁ y M₂ (Hussein & Brasel, 2001).

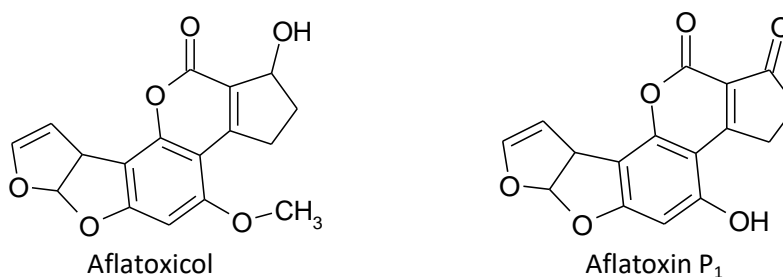


Figura 9. Estructura química del Aflatoxicol y de la aflatoxina P₁ (Soriano, 2007).

I.2.1.2. Efectos a la salud animal y humana

Las micotoxinas en las que se incluyen a las aflatoxinas están implicadas en síndromes tóxicos tanto en animales como en humanos (Charoenpornsook & Kavisarasai, 2006). Las micotoxinas presentes en alimentos y piensos son consideradas como riesgo para el consumidor debido a la diversidad de sus efectos tóxicos y a sus propiedades sinérgicas (Omede, 2008).

Diversos factores contribuyen a la contaminación de alimentos y piensos por AFs como son: ambientales, socioeconómicos y durante la cadena de producción de alimentos. Las condiciones ambientales de alta humedad y temperatura, favorecen el crecimiento fúngico 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 (Wagacha & Muthomi, 2008).

Las AFs son potentes mutágenos, cancerígenos y teratógenos que causan una enfermedad llamada aflatoxicosis con efectos agudos, cuando se consumen en mg, y cuyos síntomas son hemorragias, diarreas, daños en hígado, edema, alteración en la digestión y en el metabolismo de los alimentos, y en ocasiones la muerte (Carrillo, 2003).

El grado de toxicidad es $AFB_1 > AFG_1 > AFB_2 > AFG_2$, esto indica que la fracción terminal furano de AFB_1 es el punto clave para determinar el grado de actividad biológica de este grupo de micotoxinas (Chiavaro *et al.*, 2001). La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC), clasificó a las AFs, en el Grupo 1 como cancerígenos probado para humanos (Liu & Wu, 2010).

La intoxicación crónica es la forma más frecuente y se debe al consumo de alimentos contaminados con niveles bajos (en μg ó ng) 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, síndrome de Reye que ocasiona encefalopatía y degeneración grasa del hígado, hepatitis, cirrosis, presencia de varios tipos de cáncer y la muerte, dependiendo

del tiempo de consumo y cantidades ingeridas (Chiavaro *et al.*, 2001; Hussein & Brasel, 2001; Carrillo, 2003; Omede, 2008). Además se ha sugerido un efecto sinérgico entre la exposición a aflatoxinas y algunas enfermedades tales como la malaria y Kwashiorkor o desnutrición proteica (Gong *et al.*, 2004). Existen estudios epidemiológicos, donde se muestra que la exposición a las AFs contribuye a la formación de cáncer de hígado (Chuang *et al.*, 2009; Liu & Wu, 2010).

La AFB₁ se considera la más tóxica y también la más estudiada debido a sus efectos cancerígenos y citotóxicos y es absorbida en el intestino delgado y transportada por los glóbulos rojos y las proteínas plasmáticas hasta el hígado, mayormente por vía portal sanguíneo. La toxina entra en la célula y es metabolizada para ser hidroxilada y transformarse en varios compuestos tales como la AFP₁, AFM₁ y AFQ₁ (Fernandes-Oliveira *et al.* 2000; Wild & Turner, 2002). También puede dar lugar a la formación de un producto oxidado y electrofílico llamado AFB₁-8,9-epóxido que es sumamente inestable y que presenta afinidad por diversas macromoléculas tales como ácido nucleicos y proteínas a las que se une covalentemente y puede dar lugar a disrupciones en la transcripción y en la traducción, respectivamente. La molécula AFB₁-8,9 epóxido es la responsable de la actividad cancerígena y mutagénica de la aflatoxina B₁. El AFB₁-8,9-epóxido se une al nitrógeno 7 (N⁷) de los residuos de guanina del ADN para formar el 8,9-dihidro-8-(N⁷-guanil)-9-hidroxi aflatoxina B₁ (AFB₁-N⁷-Gua), con lo que se interrumpe la transcripción y disminuye la síntesis del ácido ribonucleico, lo que puede producir una mutación o iniciación al cáncer (Wild & Turner, 2002; Gimeno, 2004; Guzmán, 2007; Scheidegger & Payne, 2003; Creppy, 2002; Sotomayor *et al.*, 2003).

Las AFs, también afectan al organismo de varios animales y sus efectos “*in vivo*” varían de acuerdo a la dosis, tipo de AF, exposición y la edad del animal, su dieta y estado nutricional (Soriano, 2007).

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. Se sabe que las AFs se unen al ADN y producen mutaciones y cáncer en ratas (Bennett *et al.*, 1981; Muench *et al.*, 1983; Croy *et al.*, 1978). Depresión del timo, decremento de la función de

células T e inmunidad celular son los efectos en bovinos (Paul *et al.*, 1977), ovinos y porcinos (Fernández *et al.*, 2000).

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; estudios *in vitro* han demostrado la capacidad de la microbiota del rumen para degradarlas haciéndoles perder gran parte de su toxicidad (Wogan, 1966; Kiessling *et al.*, 1984; Perusia & Rodríguez, 2001).

Las AFs son reguladas en más de 75 países (con límites expresados en $\mu\text{g kg}^{-1}$ o ng g^{-1}) y el número de países ha aumentado con los años significativamente. Los reglamentos para las AFs son con frecuencia detallados y específicos para los alimentos, para los productos lácteos y para las raciones animales. En la reglamentación mundial el rango de límites de tolerancia para AFB₁ es 1 a 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$, y para AF totales (AFt) de 0 a 35 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (FAO, 2004). La Organización Mundial de la Salud (OMS), estableció el límite máximo permisible de 5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para la AFB₁ y de 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para AFt (B₁+B₂+G₁+G₂), en varios géneros de alimentos. El reglamento de la Comisión Europea (CE) establece límites de AFB₁ y AFt de 2 y 4 $\mu\text{g kg}^{-1}$ respectivamente en nueces, frutos secos como la almendra y cereales desde 1998 (CD, 1998; CE, 2010).

Los niveles máximos tolerados para la AFB₁ en los alimentos no han cambiado de 1995 a 2003, aunque se ha reducido el rango de los límites (1-20 $\mu\text{g kg}^{-1}$), con 2 $\mu\text{g kg}^{-1}$ como el límite vigente actualmente en por lo menos 29 países. La mayoría de estos países pertenecen a la Unión Europea (UE), con límites armonizados desde 1988, para la AFB₁ y para la suma de las aflatoxinas totales (AFt). En 2003, muchos de los países candidatos a la UE ya habían armonizado sus reglamentaciones nacionales con las de la UE anticipando su acceso el 1 de mayo de 2004. Otro valor límite importante es el de 5 $\mu\text{g kg}^{-1}$, seguido por 21 países de África, de Asia/Oceanía, de América Latina y de Europa. Los Estados Unidos y Canadá no tienen un valor límite único para la AFB₁; sin embargo, fueron de los primeros países en fijar un límite de tolerancia para las AFt (20 $\mu\text{g kg}^{-1}$). 76 países en el 2003 aplicaron este nivel (FAO, 2004).

I.2.1.3. Regulación Sanitaria en México

En México, la investigación de las implicaciones y efectos de las aflatoxinas cobró mayor importancia a partir de la década de 1990, debido a que el consumo de alimentos contaminados con AFM₁ por animales productores de leche representa un riesgo potencial a la salud pública, particularmente a la población infantil. En 40 hatos lecheros del estado de Jalisco se detectaron 92 % de raciones alimenticias contaminadas con aflatoxinas totales (entre 4.82 y 24.89 µg/kg) y el 80 % de leche cruda producida por los mismos estaban contaminados con aflatoxina M₁ (de 0.006 a 0.065 µg L⁻¹ de leche). En 35 muestras de alimento para perros y gatos de 12 marcas diferentes en México se detectaron siete aflatoxinas (B₁, B₂, G₁, G₂, M₁, M₂ y P₁) con concentraciones altas en dos muestras (72.4 y 597 µg kg⁻¹ de alimento). La aflatoxina B₁ se encontró en 100 % de las muestras de alimento para gatos y 79 % para perros. Las muestras con mayor cantidad de AFB₁ y AFM₁ utilizaban maíz como principal ingrediente en la formulación (Padrón *et al.*, 2013)

En México se han desarrollado normatividades para regular la incidencia de aflatoxinas en cereales. En 2008 se emitió la Norma Oficial Mexicana NOM-247-SSA1-2008 que indica que el límite máximo permisible de aflatoxinas en cereales es de 20 µg kg⁻¹ tanto para el consumo humano como de animales; además, aporta información relativa a las especificaciones sanitarias de transporte y almacenamiento de cereales e indica que el límite máximo de aflatoxinas en harina de maíz nixtamalizado y masa para tortillas es de 12 µg kg⁻¹ (NOM-247-SSA1-2008). Sin embargo, es notable observar que no existe una regulación similar a la de las aflatoxinas para otras micotoxinas comúnmente presentes en productos agrícolas tales como las fumonisinas y las ocratoxinas (Padrón *et al.*, 2013); así como para aflatoxinas específicas como la B₁, la más tóxica, o la M₁ en productos lácteos.

A partir del 2013 dejó de aplicarse toda la legislación que protegía a los mexicanos contra las aflatoxinas en favor de un comercio internacional más fluido y con todos los riesgos que esto implica para la salud de los mexicanos.

I.2.1.4. Las aflatoxinas en la almendra

La contaminación por aflatoxinas en la almendra se debe principalmente al hongo filamentoso *Aspergillus flavus* y en menor extensión por *Aspergillus parasiticus*, independientemente del estado de producción de la almendra (campo o almacenado). Se ha identificado resistencia genética a estas especies aflatoxigénicas en cultivos en donde la incidencia de contaminación por estas es amplia como es el caso del maíz, algodón y el cacahuate (Schade *et al.*, 1975; Gradziel & Wang, 1994). La mayoría de los estudios sobre mecanismos de contaminación por aflatoxinas en frutos secos han sido dedicados al pistache y poco se sabe en otros frutos secos, particularmente en almendras (Rodrigues *et al.*, 2012).

El crecimiento de hongos aflatoxigénicos y la biosíntesis de AFs es altamente dependiente de las condiciones de crecimiento como son la composición del sustrato, pH, actividad de agua (a_w) y la temperatura. La producción de AFs ha sido determinada en temperaturas que van entre los 20 y los 37°C y con actividad de agua (a_w) >0.85, pero se han encontrado que se producen de manera óptima a los 28-30°C y a_w >0.95. Dependiendo de la combinación particular de condiciones de crecimiento externos, la biosíntesis de AFs puede ser completamente inhibida, aunque aún es posible un crecimiento normal o que la vía de biosíntesis pueda ser completamente activada. El conocimiento de estas relaciones permite evaluar qué combinaciones de condiciones pueden controlar el crecimiento de los hongos y la biosíntesis de AFs o cuáles conducen a la producción de las mismas (Rodrigues *et al.*, 2012).

Las aflatoxinas son asociadas generalmente con alimentos altos en carbohidratos y grasas como las almendras. Algunas especies de *Aspergillus* obtienen principalmente sus recursos para el crecimiento en una forma saprófita y por lo tanto, mantienen la habilidad de secretar una gran diversidad de hidrolasas que las ayuda a acceder a los nutrientes. Los azúcares simples como la glucosa, la sacarosa, la maltosa y la galactosa inducen la producción de AFs, mientras que nutrientes más complejos como la peptona, la lactosa, el ácido oleico y el almidón no. Estos hallazgos apoyan el hecho de que las nueces ricas en grasa como las almendras, los pistachos y los cacahuates están más frecuentemente implicados en la contaminación por AFs que las nueces ricas en almidón (Gradziel *et al.*, 1994, 2009).

Las almendras se producen principalmente en California, Estados Unidos, y estos frutos secos juegan un papel importante en los mercados de ese país. Por esta razón, las almendras californianas han sido más estudiadas y representan la mayoría de los estudios sobre contaminación por hongos y micotoxinas (Schade *et al.*, 1975; Gradziel & Wang, 1994; Palumbo *et al.*, 2014; Whitaker *et al.*, 2010; Schatzki & Ong, 2001).

Aflatoxinas B₁ y B₂ se han detectado en muestras de almendra de California a frecuencias muy bajas así como Aflatoxinas G₁ y G₂ con valores aún más bajos (Schatzki & Ong, 2001) sin embargo, semillas individuales contaminadas pueden contener altos niveles de toxina. Aunque la concentración total de aflatoxina en la almendra parece ser bastante baja, la aflatoxina no es de ninguna manera un contaminante poco común (Schade *et al.*, 1975; Gradziel & Wang, 1994).

En California, después de la cosecha, las almendras se secan durante algunas semanas o meses hasta alcanzar un contenido de agua inferior al 6%, lo cual corresponde a una a_w inferior a 0.7. De esta manera, las almendras se consideran los frutos que soportan los periodos de almacenamiento más largos sin depreciación visible, si se mantienen condiciones ambientales adecuadas (principalmente humedad), por lo que la infección por hongos aflatoxigénicos en la almendra es causado principalmente por insectos en especial por larvas de polilla de naranja navel [*Amyelois transitella* (Walk.)] ya que dañan la cutícula la cual actúa como una barrera física y bioquímica y permite el ingreso de las esporas y su consecuente colonización por parte del hongo (Gradziel & Wang, 1994; Schade *et al.*, 1975; Palumbo *et al.*, 2014; Rodrigues *et al.*, 2012). La contaminación por aflatoxinas en otras nueces y frutos secos es usualmente mayor que en almendras sin embargo, pocos estudios han reportado contaminación por aflatoxina en almendra (Rodrigues *et al.*, 2012).

En Estados Unidos se analizaron 74 muestras de almendra californiana con cáscara sin clasificar y encontraron que 10 (14%) estaban contaminadas con AFs totales (suma de B₁, B₂, G₁ y G₂) de 14.8 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (peso total, semilla más cáscara), que oscilaban entre 1 y 107 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (Schade *et al.*, 1975). En otro estudio se reportó que el

80% de 1547 almendras con diferentes tipos de procesamiento estaban contaminadas, pero a niveles muy bajos, promediando $0.67 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Schatzki, 1996).

Se analizaron diversas nueces y semillas comercializadas en Arabia Saudita (5 muestras por semilla/nuez) y Qatar (81 muestras en general aunque no se reportó el origen de estas) y no se encontró contaminación por aflatoxinas en ninguna de las muestras de almendra con y sin cáscara (Abdel-Gawad & Zohri, 1993; Abdulkadar *et al.*, 2000).

En España sólo una muestra de almendra se encontró AFB₁ (95 ng kg^{-1}) y AFB₂ (15 ng kg^{-1}) (Jiménez y Mateo, 2001). En Marruecos sólo trazas de AFs fueron encontradas en las almendras analizadas (Bottalico & Logrieco, 2001). En Pakistán reportaron que 3 de las 10 muestras de almendra con cáscara recolectadas en mercados locales fueron contaminadas con un valor medio de $2.13 \mu\text{g kg}^{-1}$ de AFt (Luttfullah & Hussain, 2011).

Y últimamente en Portugal un total de $4.97 \mu\text{g kg}^{-1}$ correspondiente principalmente a AFB₁ fue detectada en sólo 1 (5%) de las 21 muestras analizadas. No fueron detectadas AFGs en ninguna de las muestras (Rodrigues *et al.*, 2012).

El *Codex Alimentarius* ha establecido límites de tolerancia máximos para AFB₁ y AFs totales (suma de B₁, B₂, G₁ y G₂) de $12 \mu\text{g kg}^{-1}$ y $15 \mu\text{g kg}^{-1}$ respectivamente para frutos secos (almendras, cacahuates, avellanas, pistaches y nueces de Brasil) destinadas a ser procesadas, en comparación con los $8 \mu\text{g kg}^{-1}$ y $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ respectivamente, permitidos en los mismos frutos listos para su consumo; esto con base en la información proporcionada por la FAO (*Codex Alimentarius*, 2008; Rodrigues *et al.*, 2012).

La contaminación por aflatoxinas en la almendra no se ha investigado en México a pesar de su importancia.

II. HIPÓTESIS

Las oleaginosas tienen aflatoxinas, y como la almendra pertenece a este grupo de semillas es altamente probable que esté contaminada con ellas.

III. OBJETIVOS

III.1. General

Identificar y cuantificar las AFs (AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂), y sus hidroxilados (AFM₁, AFM₂, AFP₁ y AFL) de 35 muestras de almendras naturales compradas en la Ciudad de México.

III.2. Particulares

Muestrear 100 g cada una de 35 muestras de almendra natural de los tres mercados más representativos e importantes de la CdMx.

Validar la técnica de extracción y cuantificación por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC), por los parámetros de linealidad, porcentaje de recuperación, selectividad, límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ).

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

Se han desarrollado diversos métodos para determinar AFs en alimentos: técnicas de inmunoensayos, electroforesis capilar (Peña *et al.*, 2002), técnicas analíticas como la cromatografía de capa fina (TLC) (Braicu *et al.*, 2008), cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Manetta *et al.*, 2005), cromatografía en capa fina de dos dimensiones (Van Egmond *et al.*, 1991), y por último, el ensayo inmunoenzimático (ELISA) (Reddy *et al.*, 2001; Sarimehmetoglu *et al.*, 2004).

Actualmente, los métodos analíticos basados en la limpieza con columnas de inmunoafinidad y HPLC con derivatización y detección de fluorescencia, han obtenido gran atención en la determinación de AFs en alimentos (Daradimos *et al.*, 2000), dicho método fue empleado para los objetivos de este estudio y fue validado en términos de selectividad, linealidad, límites de detección y de cuantificación, y porcentaje de recuperación (Muscarella *et al.*, 2007; Tavcar-Kalcher *et al.*, 2007).

IV.1. Muestreo

Con objeto de obtener 35 muestras representativas, 100 g de almendra natural fueron comprados por muestra, en tres de los mercados más representativos de la CdMx.

- 1) Central de Abastos (Eje 6 Sur esquina con Río Churubusco, Col. Central de Abasto, Delegación Iztapalapa, 09040 CdMx).
- 2) San Juan (Calle Ernesto Pugibet 71 Col. Centro. Delegación Cuauhtémoc, 06010 CdMx).
- 3) Jamaica (Avenida H. Congreso de la Unión esquina con Av. Morelos Col. Jamaica. Delegación Venustiano Carranza, 15800 CdMx).

Estos mercados son los tres que reciben almendra de más fuentes de origen, es decir con más diversidad, **Figura 10**. La almendra se produce poco en México, y se importa y consume mucho. Como se puede ver en la **Tabla 2**, la Ciudad de México recibe toda su almendra del exterior.

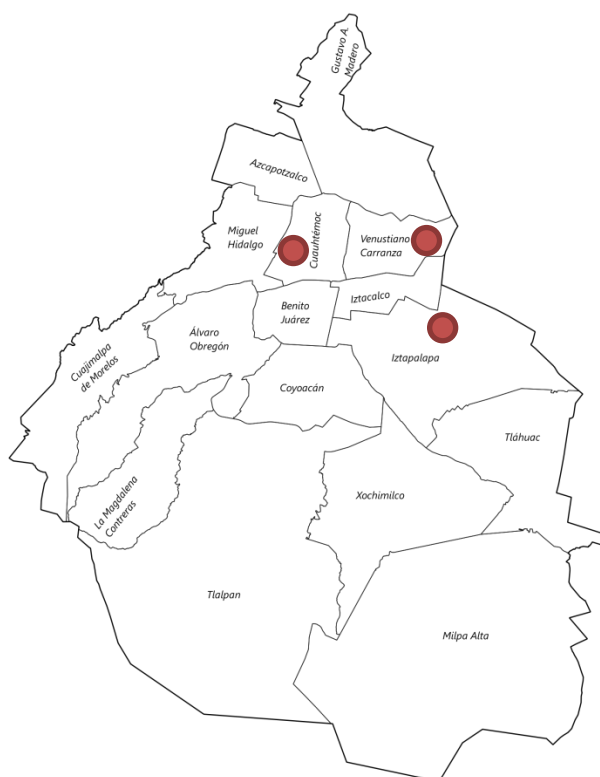


Figura 10: Localización de los 3 mercados muestreados.

IV.2. Extracción química de las AFs.

Se pesaron 50 g de muestra en una balanza granataria y 5 g de cloruro de sodio (J.T. Baker NaCl N° Cat. 7647-14-5) en una balanza analítica y se vaciaron en una licuadora de 1 litro de capacidad (Waring Commercial Blender, Mod. 7010S), se añadieron 100 mL de agua destilada y 150 mL de Metanol grado HPLC (J.T. Baker MeOH N° Cat. 67-56-1) y se molieron a alta velocidad por 2 minutos y medio para obtener una mezcla homogénea.

La mezcla fue repartida entre 5 tubos Falcon de 50 mL c/u y se centrifugaron (ALC 4235 Cool Working System, Milán, Italia) a 4000 rpm por 10 min. Se recuperaron los sobrenadantes en un frasco de vidrio, se etiquetó y se refrigeró para conservar.

Para la extracción se utilizaron 20 mL de solución amortiguadora de fosfatos (PBS) ajustada a un pH de 7.4 previamente preparada, para acondicionar las columnas de inmunoafinidad (Easi-Extract Aflatoxin R-Biopharm Rhône Ltd, UK). Se tomaron 5 mL de sobrenadante, equivalente a un gramo de muestras, se vació a un tubo Falcon

de 50 mL, se añadieron 20 mL de PBS y se agitó en un agitador orbital (Vortex G-560, Bohemia, N.Y., EEUU) por 10 segundos.

Los 25 mL se pasaron por la columna de inmunoafinidad lentamente para que las AFs pudieran quedar atrapadas en el gel de agarosa. Posteriormente, se realizó un lavado con 20 mL de agua destilada para eliminar cualquier rastro de colorantes o impurezas en la columna. Se secó al pasar aire por el gel de agarosa de la columna.

Finalmente, se eluyó con 1.5 mL de metanol grado HPLC (J.T. Baker MeOH N° Cat. 67-56-1), el cual ayuda a separar las AFs de los anticuerpos donde están unidas, y se añadieron 1.5 mL de agua destilada con reflujo, es decir, se jala el émbolo de la jeringa tres veces para romper y desnaturalizar todo el gel de agarosa con los anticuerpos contra AFs, y que pasen al eluído todas las AFs unidas a él. Se recibió el eluído en un vial ámbar para proteger a las AFs de la luz ya que son fotosensibles y se obtuvo un volumen total de 3 mL el cual se secó a 40 °C en un horno (Novatech BTC 9100, Guadalajara, Jal. México) durante dos días.

Las columnas de inmunoafinidad contienen un gel de agarosa con anticuerpos anti-aflatoxinas totales (α -AFB₁, α -AFB₂, α -AFG₁, α -AFG₂) que purifican y concentran a estas toxinas por una reacción antígeno-anticuerpo, cuando el extracto diluido de la muestra pasa por ellas dan la seguridad de que el compuesto eluido son aflatoxinas puras, pues colorantes, proteínas, lípidos y otros compuestos salen en el lavado de las columnas. El método por columnas de inmunoafinidad tiene un porcentaje de recuperación del 97 al 100% y esto hace que sea muy superior a otros.

IV.3. Derivatización.

Para derivatizar los eluidos secos de las muestras se resuspendieron con 200 μ L de acetonitrilo (J.T. Baker N° 75-05-8, Xalostoc, Estado de México) y para aumentar su fluorescencia se adicionaron 800 μ L de solución derivatizante. La solución derivatizante consistió en 5 mL de ácido trifluoroacético (ATF) (Sigma-Aldrich, St. Louis MO, USA) + 2.5 mL ácido acético glacial (Merck, Naucalpan, Edo. Mex., México) + 17.5 mL de agua desionizada, se agitó la mezcla en un agitador orbital (Vortex G-560, Bohemia, N.Y., USA) por 30 segundos. Los viales se mantuvieron en un baño María a 65 °C por 10

minutos según describen Akiyama *et al.* (2001) y Kok (1994). Posteriormente se llevaron a temperatura ambiente y se inyectaron 200 μL en un inserto dentro del vial, de donde la aguja inyectora, del cromatógrafo de líquidos con loop de 100 μL , tomó 60 μL por triplicado para su análisis.

IV.4. Cuantificación de AFs por cromatografía de líquidos.

El análisis de los extractos obtenidos de las muestras se llevó a cabo en un equipo de HPLC (Series 1200) con bomba isocrática (G1310A Serie DE62957044), detector de fluorescencia (G1321A Serie DE60456380) y automuestreador (G1329A Serie DE64761666), todos de Agilent Technologies; con una columna cromatográfica Agilent Ecilpse XDS - C18, 4.6x250 mm de 5 μm de grosor de partícula. El programa utilizado para HPLC fue ChemStation 32.

Las condiciones de análisis fueron:

- Fase móvil $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}/\text{MeOH}$ (65:15:20 v/v/v).
- Inyección de 60 μL
- Flujo 1 mL min^{-1}
- Tiempo de análisis 30 min
- Longitud de onda de excitación 360-362 nm
- Longitud de onda de emisión 425 nm para AFB_1 , AFB_2 , AFM_1 y AFL , y 450 nm para AFG_1 y AFG_2 (OPS, 1983).

IV.5. Validación del método

Validación es la confirmación mediante el suministro de evidencia objetiva de que se han cumplido los requisitos para el uso o aplicación de un método analítico (NOM IRAM 32, 1997). El procedimiento de validación se realizó de acuerdo con la AOAC (AOAC, 2005). Para validar se consideraron los criterios de Linealidad (curvas de calibración), Límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ), y Porcentaje de Recuperación.

IV.5.1. Linealidad

Es la capacidad para poder obtener resultados que son correspondientes a la concentración del analito (componente de una muestra que se desea analizar) dentro de un rango dado (Cruz-Rueda, 2016). Para esto, se partió de una solución estándar de cada una de las AFs a estudiar (AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂, AFM₁, AFM₂, AFP₁ y AFL), se obtuvo la absorbancia que da la concentración de los estándares con el uso el espectrofotómetro (Genesys 10 UV Thermo Electro Corporation UV/Vis).

Los estándares de AF en su vial original, se disolvieron en una solución de 1 mL de benceno (Merck, Naucalpan, Edo. Mex., México): acetonitrilo (98:2 v/v), de acuerdo a las indicaciones sugeridas por los Métodos Oficiales AOAC 970.43 para micotoxinas (AOAC, 2005) y se homogeneizó en un agitador orbital (Vortex G-560, Bohemia, NY, USA).

Para ajustar el equipo se colocó metanol puro en una celda de cuarzo, el cual se utilizó como blanco, el principal objetivo que tiene el blanco es evitar que la absorbancia dada por el solvente interfiera en la señal generada por la absorbancia de la solución estándar. Luego se vertió la solución de AF dentro de una 2^a celda, se añadió metanol y se midió la absorbancia a 360-362 nm en el espectrofotómetro correspondiente a cada una de las AFs. El propósito de obtener la absorbancia de cada estándar es para hacer una concentración de 1 µg mL⁻¹ de cada AF, la cual se calcula de la siguiente manera:

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

Luego se obtuvo el inverso de x ($1/x$), el resultado es la cantidad de AF en microlitros (µL) necesarios para preparar una solución de 1 µg mL⁻¹ de cada AF. Las curvas de calibración son la referencia para la medición en el HPLC. Cada solución patrón se calculó con los pesos moleculares y coeficientes de extinción correspondientes a cada AF.

$$\frac{1}{x} = \mu\text{L de AF en solución estándar}$$

$$1000 \mu\text{L de MeOH} - \mu\text{L de solución estándar} = \mu\text{L de MeOH a completar para 1 mL}$$

Una curva de calibración es la aptitud para obtener resultados proporcionales a la concentración de analito. Para hacer cada curva de calibración se hicieron doce concentraciones a partir de las soluciones patrón o stock de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ de los estándares de AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂, AFM₁, AFM₂, AFP₁ y AFL por separado y se escogieron un mínimo de 4 puntos para hacer la línea de tendencia. Los viales con las diferentes diluciones de cada AF se pusieron a evaporar a sequedad en un horno a 40°C (Novatech BTC-9100), se derivatizaron resuspendiendo en 200 μL de acetonitrilo, a este volumen se le adicionaron 800 μL de solución derivatizante, se agitó la mezcla en un agitador orbital (Vortex G-560, Bohemia, N.Y., EEUU) por 30 segundos. Los viales se mantuvieron en un baño María a 65 °C por 10 minutos según describen Kok (1994) y Akiyama *et al.* (2001). Finalmente, se inyectaron 60 μL por triplicado en el HPLC, para cuantificar. Con base en las áreas obtenidas y las concentraciones de las diferentes diluciones, se obtuvieron las ecuaciones de cada curva de calibración y los coeficientes de correlación con el programa Excel.

Tabla 3: Propiedades físicas y químicas de algunas Aflatoxinas y sus metabolitos (OPS, 1983).

Aflatoxina	Fórmula molecular	Masa molecular relativa	Temperatura de fusión (°C)	Absorción UV		Emisión de fluorescencia (nm)
				265 nm	360-362 nm	
AFB₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	312	269	12400	21800	425
AFB₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	314	286-289	12100	24000	425
AFG₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328	244-246	9600	17700	450
AFG₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330	237-240	8200	17100	450
AFM₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328	299	14150	21250 (357 nm)	425
AFM₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330	293	12100 (264 nm)	22900 (357 nm)	*
AFP₁	C ₁₆ H ₁₀ O ₆	298	>320	11200 (267 nm)	15400 (362 nm)	*
AFL	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	314	230-234	10800 (261 nm)	14100 (325 nm)	425

*Fluorescencia violeta de aflatoxina M₂ y fluorescencia amarillo-verdosa de aflatoxina P₁

IV.5.2. Límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ)

El LOD es igual a la concentración del analito (AF) que proporcione una señal 3 veces superior a la señal del ruido. Es la cantidad mínima de analito que puede ser detectada, aunque no necesariamente cuantificada con precisión y exactitud. El LOQ es igual a la concentración de analito (AF) que proporcione una señal 10 veces superior a la señal del ruido (Cruz-Rueda, 2016). Corresponde a la cantidad mínima de analito que puede determinarse cuantitativamente con una adecuada exactitud y precisión.

IV.5.3. 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 fortificaron 1 g de almendra con 50, 100 y 200 ng de AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂, AFM₁, AFM₂, AFP₁ y AFL, por separado, y se les aplicó el método completo. Para conocer la cantidad de estándar de AF que se iba a agregar a la columna de inmunoafinidad, se calculó con la siguiente fórmula:

$$\frac{5mL * V1}{1000 \frac{ng}{mL}} = V2$$

Dónde: 5mL es la cantidad del extracto de la muestra a tomar.

1000 ng mL⁻¹ es el estándar de AF.

V1 es la concentración de AF a recuperar (50, 100 o 200 ng mL⁻¹).

V2 es la cantidad total que se tomará del estándar de AF y que será pasada por columna de inmunoafinidad.

El porcentaje de recuperación, se obtuvo utilizando las ecuaciones de cada una de las rectas presentadas en las curvas de calibración, en donde **Y** representó al área de las muestras, **m** a la pendiente y **x** al valor de la concentración, quedando la siguiente ecuación:

$$x \text{ o } \% \text{ de recuperación} = \frac{y \text{ o } \text{área de las muestras}}{m \text{ o } \text{pendiente}} * 100$$

Después de haber obtenido su área (UL) y concentración, se hizo un ajuste al 100% para conocer la cantidad recuperada de las AF en las muestras que se detectaron en el análisis químico. 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.5.4. Selectividad

Con objeto de obtener la selectividad de la validación de AFs en almendra, se seleccionó la pareja de picos con menor resolución cromatográfica en este caso AFM₁ y AFL. La selectividad (α) se define como el cociente de las constantes de reparto de 2 compuestos que eluyen muy cerca. Representa la capacidad de la fase móvil con la fase estacionaria de lograr separar esta pareja e influye directamente sobre la resolución (R_s). Se calcula con la fórmula:

$$\alpha = \frac{t_{r,2} - t_0}{t_{r,1} - t_0}$$

Dónde: t_0 es tiempo de retención basal.
 $t_{r,2}$ es tiempo de retención del segundo pico.
 $t_{r,1}$ es tiempo de retención del primer pico.

La resolución cromatográfica (R_s) es la medida cuantitativa del grado de separación logrado entre dos picos, se cuantifica con la fórmula:

$$R_s = \frac{(t_{r,2} - t_{r,1})}{\frac{1}{2}(w_{b,1} + w_{b,2})}$$

Dónde: $t_{r,2}$ es tiempo de retención del segundo pico.
 $t_{r,1}$ es tiempo de retención del primer pico.
 $w_{b,1}$ es el ancho de la banda del primer pico.
 $w_{b,2}$ es el ancho de la banda del segundo pico.

Depende de la selectividad, la eficiencia y la retención de los compuestos en estudio.

Se considera una separación aceptable de los dos componentes cuando esta resolución es mayor a uno ($R_s > 1$).

IV.6. Análisis Estadístico

Se realizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para determinar si podían existir diferencias potenciales entre el contenido de AFs en las muestras de almendra, también se llevó a cabo la prueba de rangos de Wilcoxon para determinar en qué grupo había diferencias significativas y por último se realizó una prueba de t por pares para encontrar la relación de AFB₁ y AFL usando 35 muestras.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

V.1. Validación del método

Con la recopilación y el análisis de datos obtenidos con la experimentación, se comprobó que el método de detección y cuantificación de AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂, AFM₁, AFM₂, AFP₁ y AFL en las muestras de almendra de la Ciudad de México por el método de cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC) cumple con los requisitos para el análisis de las muestras.

V.1.1. Linealidad

A partir de los resultados obtenidos en los cromatogramas para cada repetición de AF, se obtuvieron las curvas de calibración, donde se tomó en cuenta el tiempo de retención de cada AF para poder obtener el Área, el límite de LOD y el LOQ.

Tabla 4. Rangos de límites de detección para cada AF de acuerdo a las pruebas de linealidad.

Aflatoxina	LOD (ng g ⁻¹)	Rango TR	R ²
AFB ₁	0.5	7.085-8.849	0.9986
AFB ₂	0.05	17.452-20.228	0.9817
AFG ₁	0.5	7.681-9.541	0.9898
AFG ₂	0.5	11.215-14.513	0.9946
AFM ₁	0.05	2.920-3.024	0.9917
AFM ₂	0.05	20.208-22.447	0.9946
AFP ₁	0.05	15.563-19.318	0.9960
AFL	0.01	3.032-5.569	0.9978

Una vez detectados los picos de cada AF, se graficaron las curvas de calibración donde la variable dependiente es la concentración de AF contra el Área.

De la **Figura 11** a la **Figura 18** se observan las curvas de calibración para cada AF, para poder conocer la linealidad de cada recta se calculó el parámetro de regresión lineal de cada recta y el coeficiente de correlación (R²). Para el caso de las **Tablas 5** a **12**, se observan las concentraciones con su respectiva área y tiempo de retención para cada AF.

Curva de calibración AFB₁

A continuación se dan los parámetros de concentración, área y tiempo de retención usados para calcular la Curva de AFB₁ **Tabla 5**, así como su **Figura 11**.

Tabla 5: Curva de calibración de AFB₁

Concentración (ng mL ⁻¹)	Área (UL)	Tiempo de Retención (min)
0.5	0.341	8.849
1	0.993	8.695
2	1.295	7.877
5	2.357	7.638
10	5.995	7.347
40	24.317	7.085

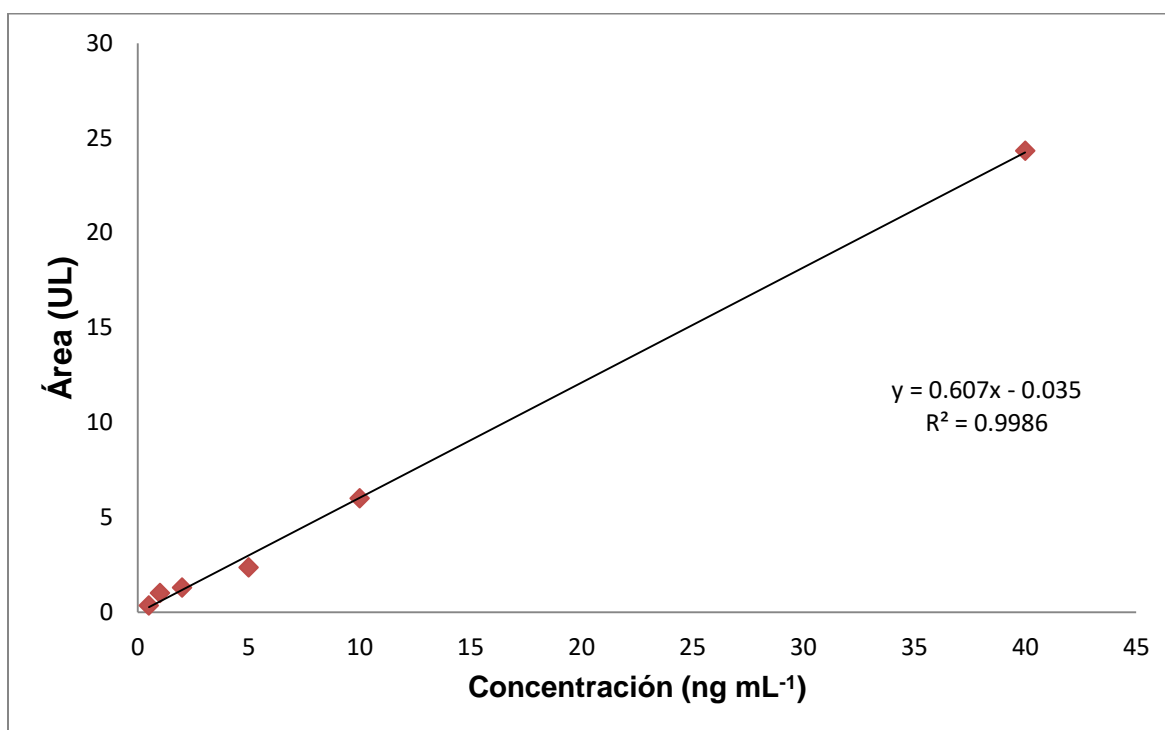


Figura 11. Curva de calibración de AFB₁

Curva de calibración AFB₂

A continuación se dan los parámetros de concentración, área y tiempo de retención usados para calcular la Curva de AFB₂, **Tabla 6**, así como su **Figura 12**.

Tabla 6: Curva de calibración de AFB₂

Concentración (ng mL ⁻¹)	Área (UL)	Tiempo de Retención (min)
0.05	0.63	17.452
0.1	0.8	18.141
0.5	0.82	18.93
8	4.15	20.062
10	6.08	20.228

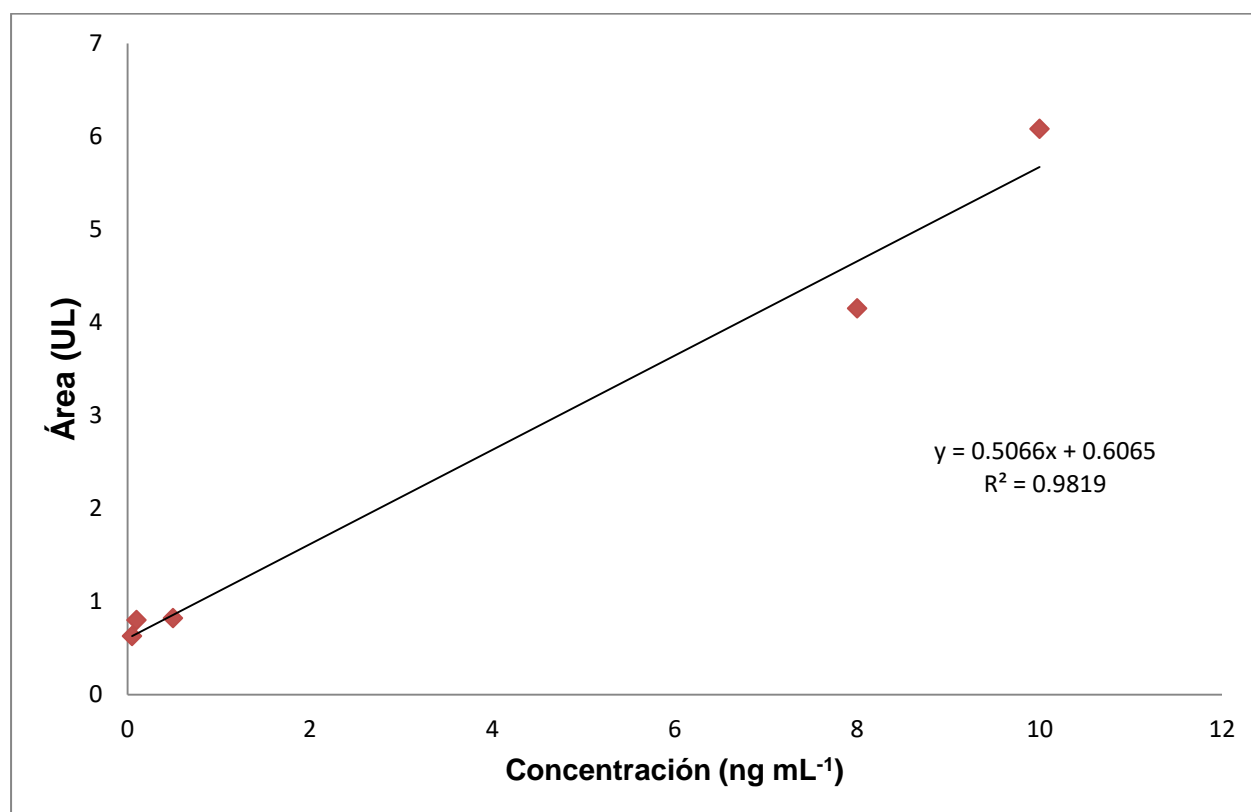


Figura 12. Gráfica curva de calibración AFB₂

Curva de calibración AFG₁

A continuación se dan los parámetros de concentración, área y tiempo de retención usados para calcular la Curva de AFG₁, **Tabla 7**, así como su **Figura 13**.

Tabla 7: Curva de calibración de AFG1

Concentración (ng mL ⁻¹)	Área (UL)	Tiempo de Retención (min)
0.5	0.44	8.473
1	0.46	7.681
2	0.58	9.541
8	0.96	9.003
16	1.19	9.166
64	5.46	9.101
100	9.68	9.095

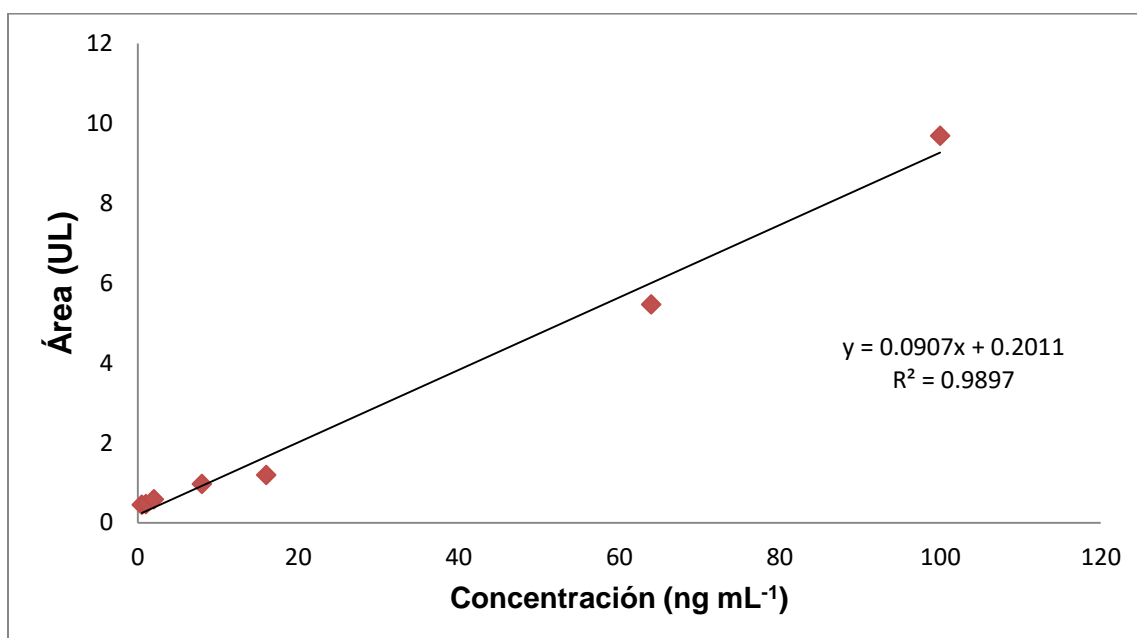


Figura 13. Gráfica de la curva de calibración de AFG₁

Curva de calibración AFG₂

A continuación se dan los parámetros de concentración, área y tiempo de retención usados para calcular la Curva de AFG₂, **Tabla 8**, así como su **Figura 14**.

Tabla 8: Curva de calibración de AFG₂

Concentración (ng mL ⁻¹)	Área (UL)	Tiempo de Retención (min)
0.5	0.20	14.177
1	1.05	11.215
2	1.57	12.062
4	5.91	12.002
10	12.78	14.507
16	17.47	14.513
32	35.12	14.476
64	91.13	14.492
100	159.66	14.464
128	195.61	14.455

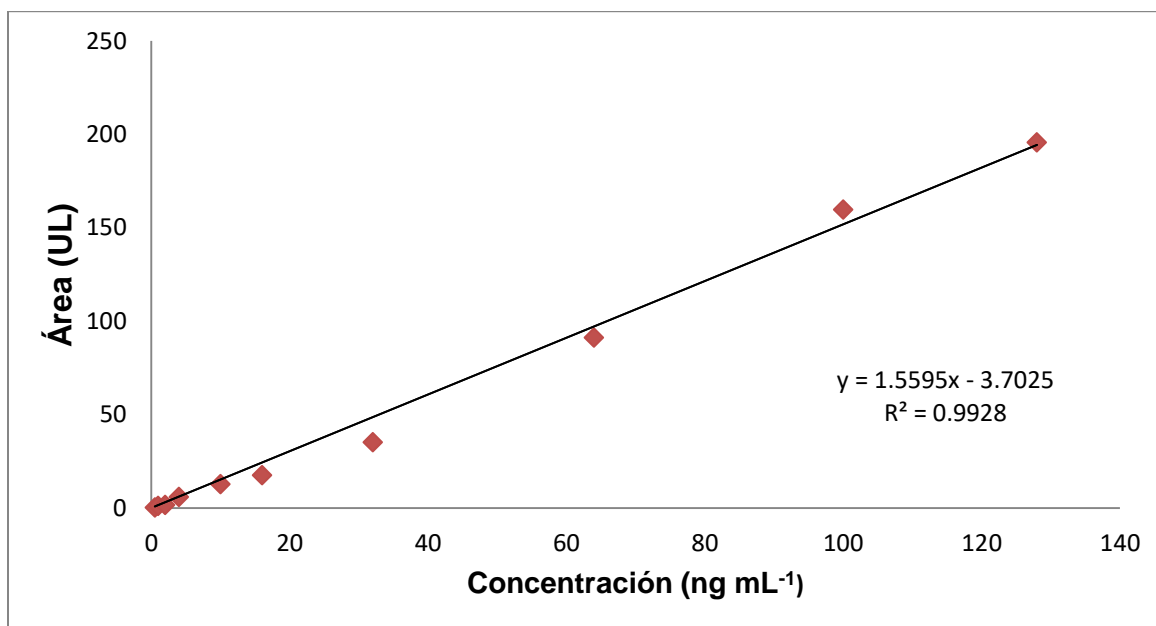


Figura 14. Gráfica de la curva de calibración de AFG₂

Curva de calibración AFM₁

A continuación se dan los datos y la gráfica de la AFM₁, **Tabla 9**, así como su **Figura 15**.

Tabla 9: Curva de calibración de AFM₁.

Concentración (ng mL ⁻¹)	Área (UL)	Tiempo de Retención (min)
0.05	0.425	3.024
0.1	0.636	2.941
0.5	0.696	3.008
10	2.436	2.935
20	3.296	2.971
40	6.495	2.920

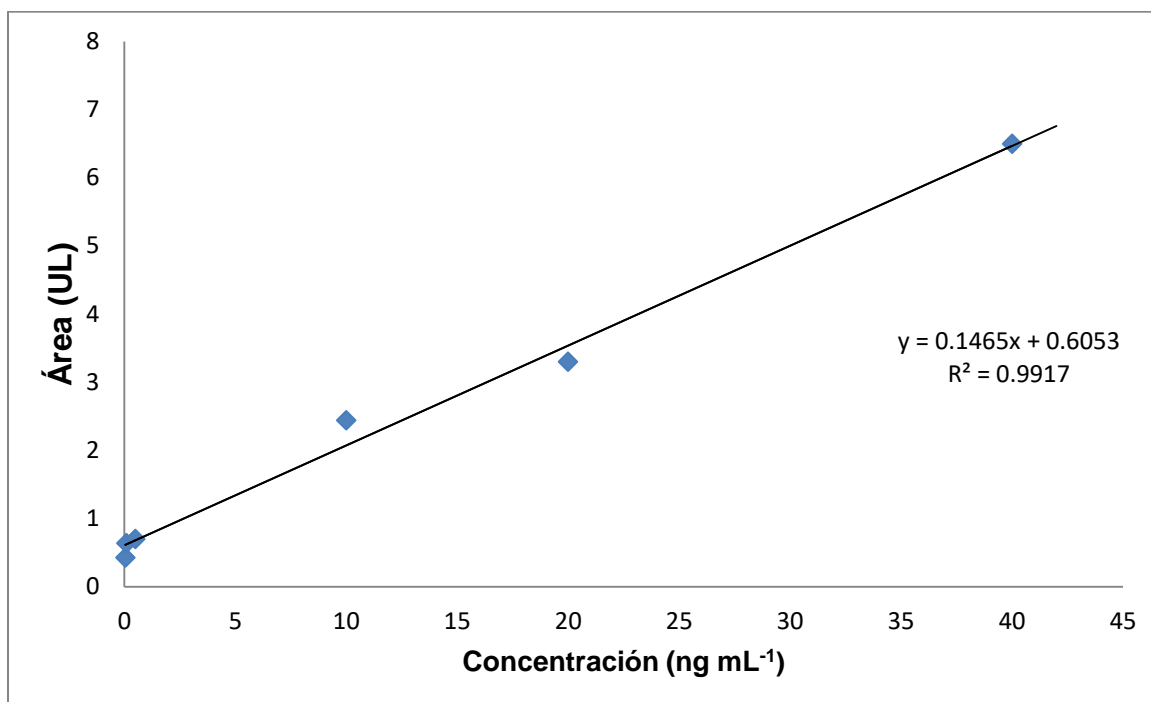


Figura 15. Gráfica de la curva de calibración de AFM₁

Curva de calibración AFM₂

A continuación se dan los datos y la gráfica de la AFM₂, **Tabla 10** y **Figura 16**.

Tabla 10: Curva de calibración de AFM₂.

Concentración (ng mL ⁻¹)	Área (UL)	Tiempo de retención (min)
0.05	0.146	20.208
0.5	0.16	22.447
2	0.5	20.544
64	38.9	20.966
100	73.412	20.905
128	90.17	20.844

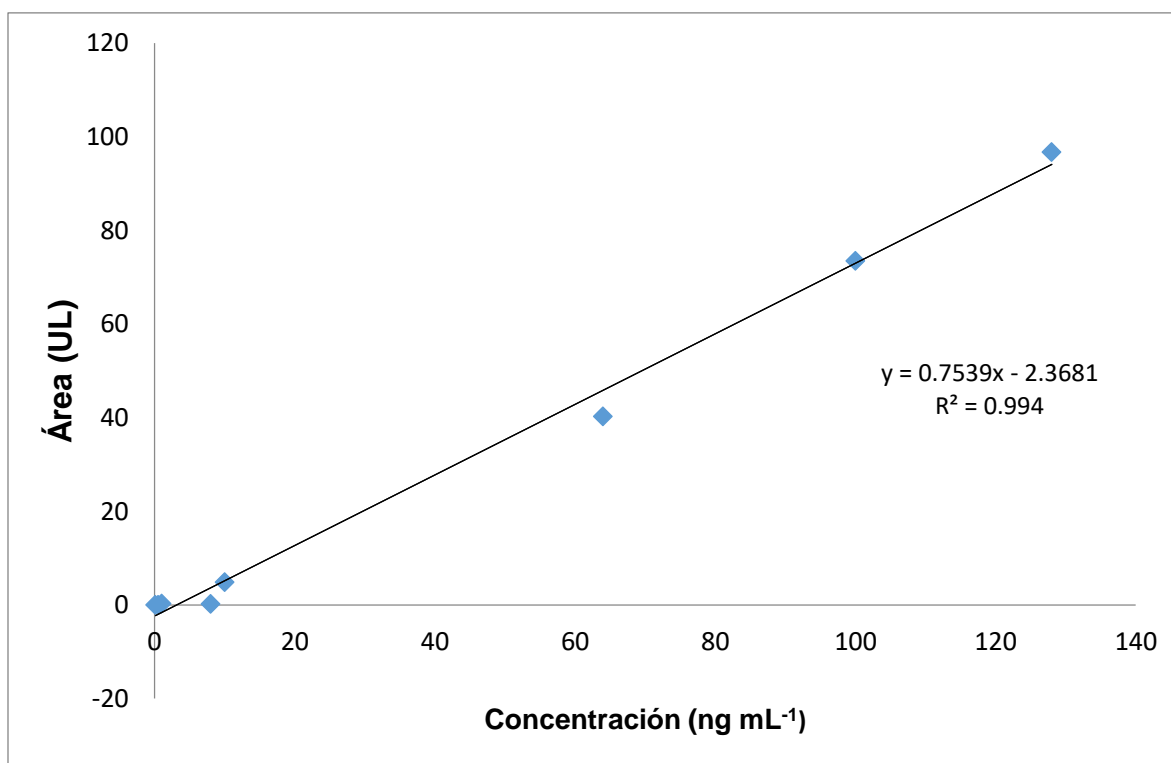


Figura 16. Gráfica curva de calibración de AFM₂.

Curva de calibración AFP₁

A continuación se dan los datos y la gráfica de la AFP₁, **Tabla 11, Figura 17.**

Tabla 11: Curva de Calibración de AFP₁.

Concentración (ng mL ⁻¹)	Área (UL)	Tiempo de retención (min)
0.05	0.356861	15.563
0.1	0.432036	16.711
0.5	0.658508	16.817
64	9.10722	19.318
100	14.97025	18.065
128	17.28316	18.213

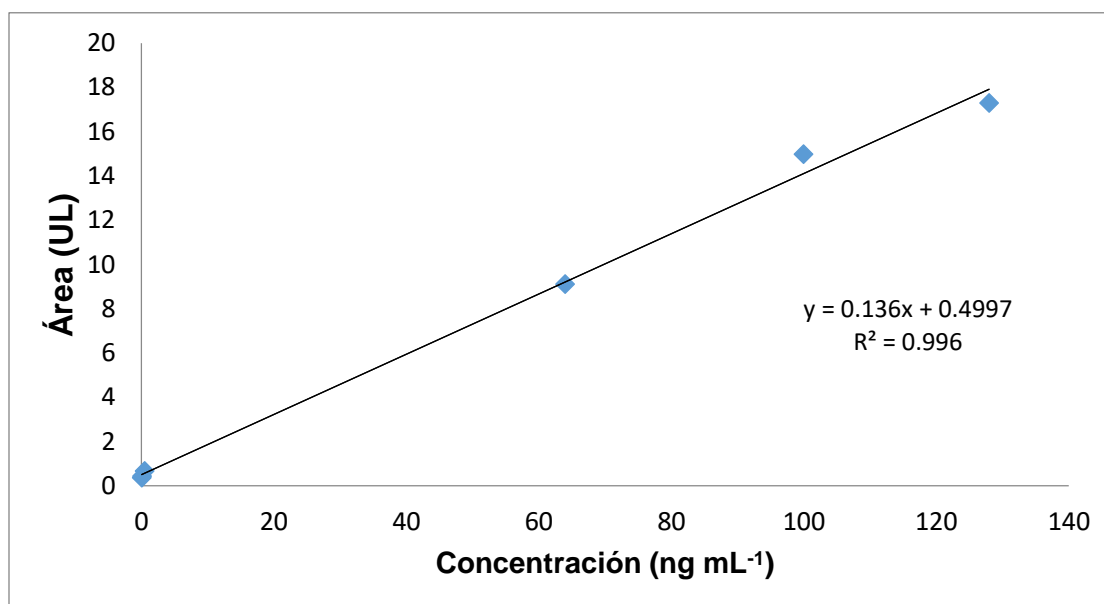


Figura 17. Gráfica curva de calibración de AFP₁.

Curva de calibración AFL

A continuación se dan los datos y la gráfica de la AFL, **Tabla 12, Figura 18.**

Tabla 12: Curva de Calibración de AFL.

Concentración (ng mL ⁻¹)	Área (UL)	Tiempo de retención (min)
0.01	0.39	4.605
0.1	0.55	3.513
1	0.69	4.859
2	1.3	4.16
5	2.9	3.353
15	6.9	4.265
25	10.5	3.032
30	12.6	3.81
40	17.6	5.569

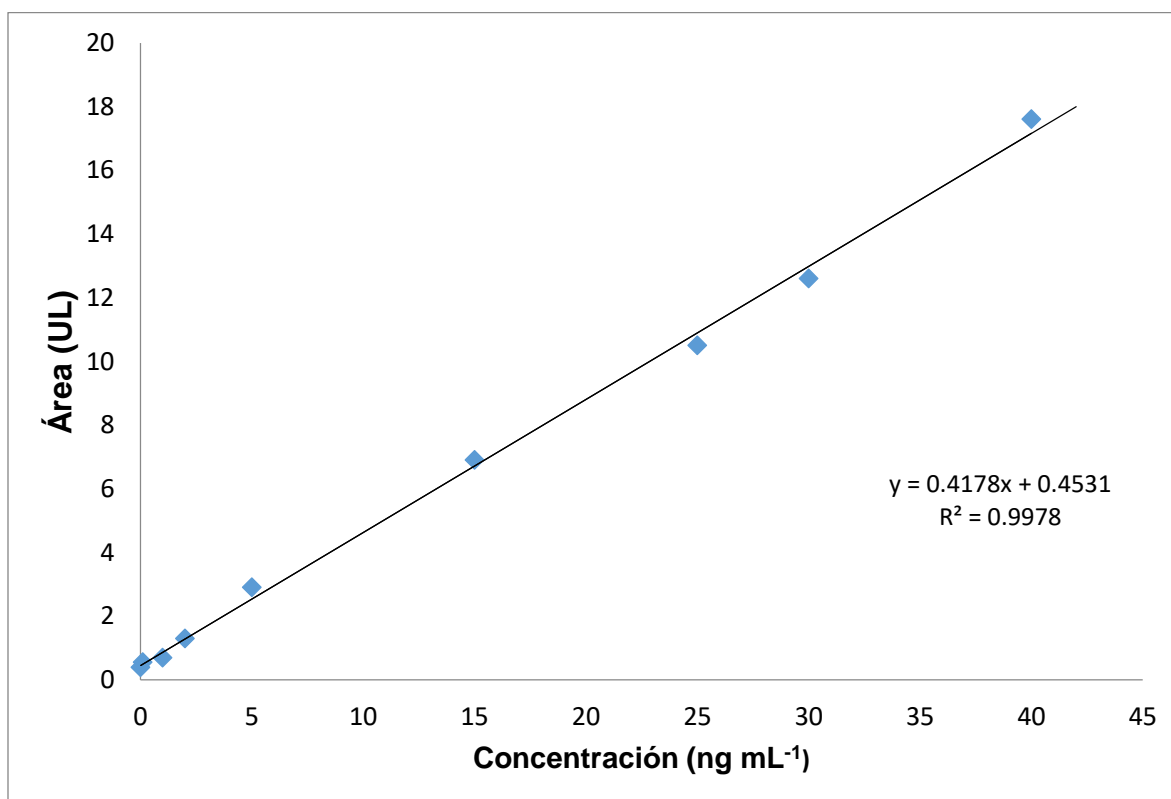


Figura 18. Gráfica curva de calibración de AFL.

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

El Límite de detección (LOD) del equipo se estableció en relación con el ruido en el cromatograma. El límite de detección (LOD) es igual a la concentración de aflatoxina que da una señal que es tres veces mayor que el ruido. El límite de cuantificación (LOQ) es igual a la concentración de aflatoxina que da una señal que es diez veces mayor que el ruido. (Cruz-Rueda, 2016). **Tabla 13.**

Tabla 13. LOD y LOQ para cada Aflatoxina.

Aflatoxina	LOD (ng g ⁻¹)	LOQ (ng g ⁻¹)
AFB ₁	0.5	5
AFB ₂	0.05	0.5
AFG ₁	0.5	5
AFG ₂	0.5	5
AFM ₁	0.05	0.5
AFM ₂	0.05	0.5
AFP ₁	0.05	0.5
AFL	0.01	0.1

V.1.3. Porcentaje de Recuperación

El método de extracción presenta un porcentaje de recuperación del 85% a 100% para las 8 AFs, esto quiere decir que el método para extraer las AFs en la almendra es eficiente. La **Tabla 14** presenta los datos del experimento de recuperación de las 8 AFs en la almendra. Como demostración de que el porcentaje de recuperación estuvo bien calculado se eligieron 4 cromatogramas que comprueban la certeza del método empleado (**Figura 19**).

Tabla 14: Datos del experimento de Porcentaje de Recuperación.

AF	Contaminación basal (ng mL ⁻¹)	Concentración de AF (ng mL ⁻¹)	Área (UL) de AF añadida	Área (UL) de AF recuperada	Concentración de AF recuperada (ng mL ⁻¹)	% de recuperación
AFB ₁	0	100	60.79	60.66	99.78	100
AFB ₂	0	100	60.8	59.51	97.87	98
AFG ₁	0	100	9.68	8.27	85.48	85
AFG ₂	0	50	63.03	61.76	48.99	98
AFM ₁	0	50	7.5	7.49	49.93	100
AFM ₂	0	200	116.48	114.39	196.4	98
AFP ₁	0	50	7.11	6.95	48.87	98
AFL	0	50	22	21.14	48.05	96

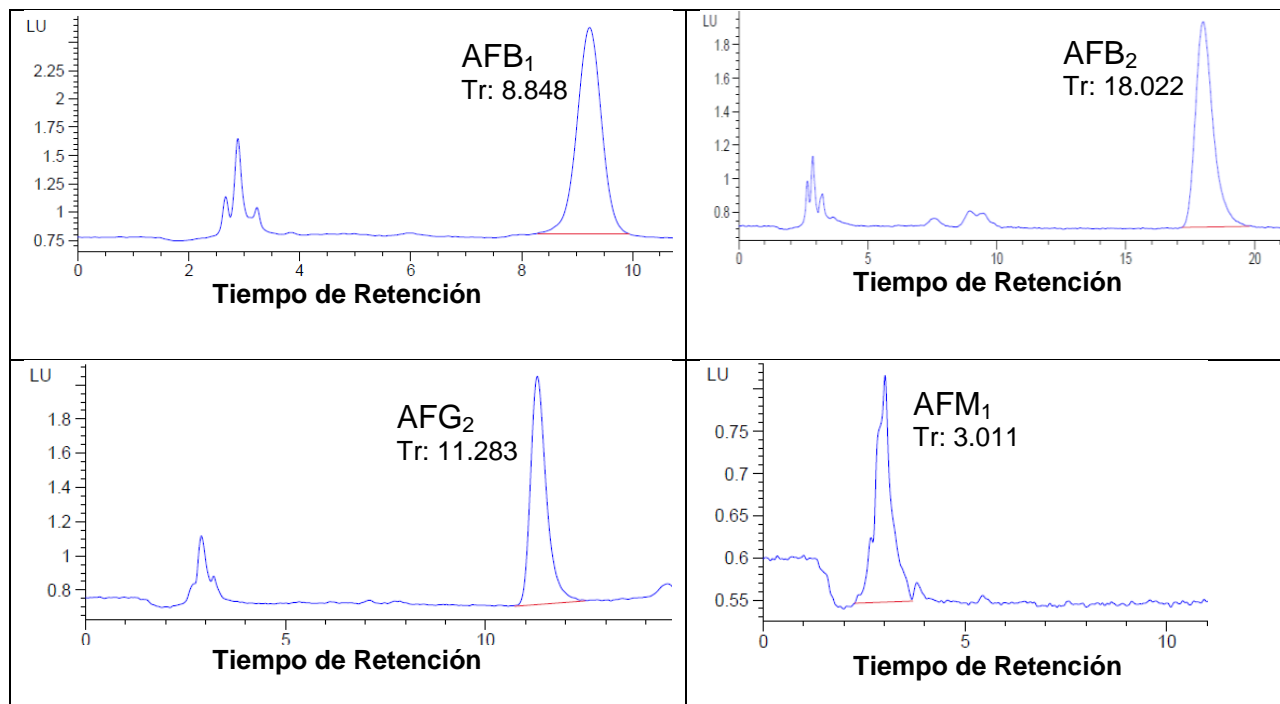


Figura 19: Cromatogramas que demuestran la obtención del porcentaje de recuperación.

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 Fisicoquímicos de la Secretaría de Salud (SSA, 2011) que son:

Tabla 15. Criterios de aceptación para recuperar residuos y contaminantes en alimentos y agua (SSA, 2011) y Criterios para recuperar aflatoxinas (CE, 2006).

Concentración del analito	Rango de aceptación	Fuente
$< 1 \mu\text{g kg}^{-1}$ ó $\mu\text{g L}^{-1}$	50 – 120%	SSA
1 a $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ ó $\mu\text{g L}^{-1}$	60 – 120%	
10 a $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ ó $\mu\text{g L}^{-1}$	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%	
$< 1 \mu\text{g kg}^{-1}$	50 – 120%	CE
$1 \text{ a } 10 \mu\text{g kg}^{-1}$	70 – 110%	
$> 10 \mu\text{g kg}^{-1}$	80 – 110%	

V.1.4. Selectividad

Se obtuvo una selectividad (α) de 1.338 lo que nos indica que el método analítico empleado es eficiente.

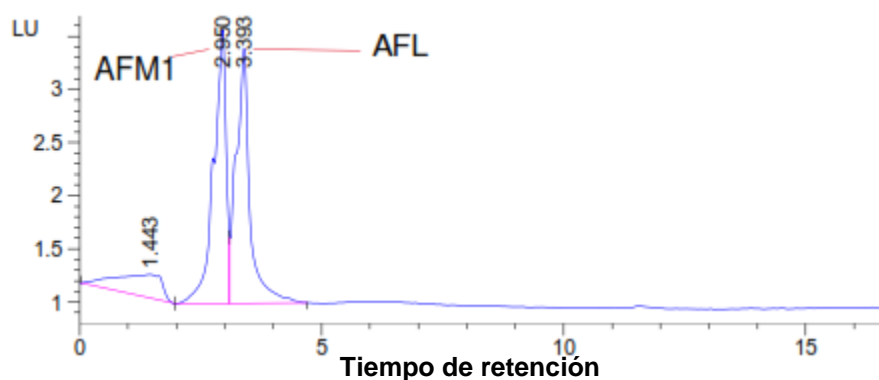


Figura 20: Cromatograma de la muestra 29 con AFM₁ y AFL con buena selectividad y eficiencia

$$\alpha = \frac{3.393 - 1.642}{2.950 - 1.642} = \mathbf{1.338}$$

Y la resolución lograda fue de:

$$R_s = \frac{(3.393 - 2.950)}{\frac{1}{2}(0.408 + 0.4468)} = \mathbf{1.036}$$

La cual se considera una separación aceptable de los dos componentes con una sobreposición de las áreas de los picos mínima.

V.2. AFs en las muestras de almendra.

En la **Tabla 16** se muestran las concentraciones de AFt en un gramo, son cantidades muy altas debido a que llevan sumados los hidroxilados de AFs y significa las dosis internas reales de consumo de las AFs. No se han presentado dosis reales de consumo de AFs en los artículos publicados pues no se reportan los metabolitos hidroxilados que son productos de desintoxicación que los organismos forman para bajar las toxicidades de las cuatro AFs originales (**Tabla 17**). Sólo se han publicado los metabolitos hidroxilados de microorganismos y del hígado de animales, pero nunca de semillas de almendra. **El presente trabajo es un reporte nuevo a nivel mundial** que prueba que las almendras forman metabolitos hidroxilados de AFs (**Tabla 18**) sin tener hígado, siendo semillas que aparentemente siguen las mismas vías de biosíntesis y de descontaminación de las AFs.

Tabla 16: Concentración de Aflatoxinas (ng g⁻¹) en 1 g de almendra de las 35 muestras compradas.

Muestra	AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂	AFM ₁	AFM ₂	AFP ₁	AFL	AFt
1	26.78	0	261.48	23.43	0	0	41.77	30.07	383.54
2	8.60	0	41.18	17.24	0	10.53	216.93	2.58	297.06
3	73.04	3.43	38.10	23.96	0	4.56	1.43	0	144.51
4	11.42	20.24	115.00	24.47	0.08	13.74	329.42	3.84	518.22
5	30.93	7.30	65.87	41.04	0.08	12.05	232.03	6.20	395.51
6	5.41	49.22	47.42	8.59	3.80	32.32	468.16	2.53	617.44
7	4.21	2.15	19.14	2.84	0	22.84	54.57	1.42	107.18
8	2.85	4.00	0.27	2.18	0	14.22	0.86	3.73	28.10
9	20.04	109.86	70.84	21.20	0	4.02	169.97	8.22	404.14
10	9.28	16.16	185.09	5.04	16.89	17.27	50.20	84.22	384.16
11	85.54	8.54	111.91	6.18	0	18.44	77.84	97.94	406.39
12	5.45	8.51	6.39	42.36	0	15.45	59.16	1.36	138.68
13	31.45	8.63	87.51	4.50	13.56	7.52	20.52	2.35	176.05
14	17.35	1.32	137.81	3.01	14.87	1.12	0.41	0.86	176.74
15	31.31	2.00	138.70	3.28	0	4.73	1.55	0	181.57
16	46.89	1.98	32.22	3.53	15.60	1.92	0.98	0	103.12
17	32.77	11.56	604.90	20.48	0	6.34	1.94	0	677.98
18	3.98	6.95	380.84	29.43	0	14.48	26.26	3.56	465.50
19	53.50	12.68	144.34	58.04	0.38	15.40	34.84	2.02	321.19
20	92.94	4.13	368.52	52.81	0	6.76	28.36	0	553.53
21	46.80	19.67	19.41	54.25	0.17	19.56	195.74	13.07	368.67
22	3.71	96.74	24.53	8.24	0	12.59	551.61	4.83	702.26
23	20.49	58.97	21.34	47.30	2.35	17.72	130.84	5.92	304.93
24	7.25	75.90	48.58	42.59	0.52	16.65	64.52	5.61	261.60
25	5.32	87.71	24.07	7.00	2.03	50.48	114.48	3.20	294.29
26	0	0.52	0	0	0	2.67	0.21	72.78	76.17
27	0.33	0.43	3.13	0.84	0	2.26	0.13	114.14	121.26
28	0	0.02	0	0	0	1.92	0	98.68	100.62
29	0	0.56	0	0.52	129.63	6.75	0	98.38	235.84
30	0	0.42	0	0.96	0	3.45	0	103.74	108.58
31	0.33	0.33	0	1.06	61.50	3.43	0	104.81	171.46
32	0	0.21	0	0	0	2.00	0	63.55	65.76
33	0.52	0	0	0	0	0	0	113.41	113.93
34	0	0.18	0	0	0	2.49	0.25	57.74	60.66
35	0	0	0	0	0	0	0.73	95.41	96.14
Promedio	19.38	17.72	85.67	15.89	7.47	10.4	82.16	34.46	273.22

Nota: 1 µg kg⁻¹ = 1 ng g⁻¹

Tabla 17: Concentración de Aflatoxinas básicas (ng g⁻¹) en 1 g de almendra de las 35 muestras.

Muestra	AFB₁	AFB₂	AFG₁	AFG₂	AFt básicas
1	26.78	0	261.48	23.43	311.69
2	8.60	0	41.18	17.24	67.02
3	73.04	3.43	38.10	23.96	138.52
4	11.42	20.24	115.00	24.47	171.14
5	30.93	7.30	65.87	41.04	145.15
6	5.41	49.22	47.42	8.59	110.64
7	4.21	2.15	19.14	2.84	28.33
8	2.85	4.00	0.27	2.18	9.30
9	20.04	109.86	70.84	21.20	221.94
10	9.28	16.16	185.09	5.04	215.57
11	85.54	8.54	111.91	6.18	212.17
12	5.45	8.51	6.39	42.36	62.71
13	31.45	8.63	87.51	4.50	132.09
14	17.35	1.32	137.81	3.01	159.49
15	31.31	2.00	138.70	3.28	175.29
16	46.89	1.98	32.22	3.53	84.61
17	32.77	11.56	604.90	20.48	669.71
18	3.98	6.95	380.84	29.43	421.20
19	53.50	12.68	144.34	58.04	268.56
20	92.94	4.13	368.52	52.81	518.40
21	46.80	19.67	19.41	54.25	140.12
22	3.71	96.74	24.53	8.24	133.22
23	20.49	58.97	21.34	47.30	148.10
24	7.25	75.90	48.58	42.59	174.32
25	5.32	87.71	24.07	7.00	124.10
26	0	0.52	0	0	0.52
27	0.33	0.43	3.13	0.84	4.73
28	0	0.02	0	0	0.02
29	0	0.56	0	0.52	1.08
30	0	0.42	0	0.96	1.38
31	0.33	0.33	0	1.06	1.72
32	0	0.21	0	0	0.21
33	0.52	0	0	0	0.52
34	0	0.18	0	0	0.18
35	0	0	0	0	0.00
Promedio	19.39	17.72	85.67	15.90	138.68

Nota: 1 µg kg⁻¹ = 1 ng g⁻¹

Tabla 18: Concentración metabolitos hidroxilados de Aflatoxinas (ng g⁻¹) en 1 g de almendra de las 35 muestras.

Muestra	AFM₁	AFM₂	AFP₁	AFL	AFt Hidroxiladas
1	0	0	41.77	30.07	71.85
2	0	10.53	216.93	2.58	230.04
3	0	4.56	1.43	0	5.99
4	0.08	13.74	329.42	3.84	347.08
5	0.08	12.05	232.03	6.20	250.36
6	3.80	32.32	468.16	2.53	506.80
7	0	22.84	54.57	1.42	78.84
8	0	14.22	0.86	3.73	18.80
9	0	4.02	169.97	8.22	182.20
10	16.89	17.27	50.20	84.22	168.58
11	0	18.44	77.84	97.94	194.22
12	0	15.45	59.16	1.36	75.97
13	13.56	7.52	20.52	2.35	43.96
14	14.87	1.12	0.41	0.86	17.25
15	0	4.73	1.55	0	6.28
16	15.60	1.92	0.98	0	18.50
17	0	6.34	1.94	0	8.27
18	0	14.48	26.26	3.56	44.30
19	0.38	15.40	34.84	2.02	52.63
20	0	6.76	28.36	0	35.12
21	0.17	19.56	195.74	13.07	228.55
22	0	12.59	551.61	4.83	569.03
23	2.35	17.72	130.84	5.92	156.83
24	0.52	16.65	64.52	5.61	87.28
25	2.03	50.48	114.48	3.20	170.19
26	0	2.67	0.21	72.78	75.65
27	0	2.26	0.13	114.14	116.53
28	0	1.92	0	98.68	100.60
29	129.63	6.75	0	98.38	234.76
30	0	3.45	0	103.74	107.19
31	61.50	3.43	0	104.81	169.74
32	0	2.00	0	63.55	65.55
33	0	0	0	113.41	113.41
34	0	2.49	0.25	57.74	60.48
35	0	0	0.73	95.41	96.14
Promedio	7.47	10.45	82.16	34.46	134.54

Nota: 1 µg kg⁻¹ = 1 ng g⁻¹

V.2.1. Análisis Estadístico

Con las pruebas de Kruskal-Wallis se encontró:

Tabla 19: Pruebas de Kruskal-Wallis

Aflatoxinas	Grados de libertad	Valor de la estadística K-W	Valor de p (Significancia)	Diferencia significativa
AFB ₁ , AFB ₂ , AFG ₁ y AFG ₂	3	5.940	0.1146	No
AFM ₁ , AFM ₂ , AFP ₁ y AFL	3	27.083	<0.0001	Si
Todas	7	34.413	<0.0001	Si

Con la prueba estadística de Suma de Rangos de Wilcoxon corregida para múltiples pruebas:

Para AFM₁, AFM₂, AFP₁ y AFL, encontramos que la AFM₂ fue significativamente diferente de todas las otras, con un valor de $p < 0.0001$ en todos los casos. El resto no fueron estadísticamente diferentes entre sí.

Cuando se probaron todos los diferentes pares de AFs, sólo los niveles de AFM₂ fueron significativamente diferentes de todas las otras. Los valores p fueron:

Tabla 20: Comparación de AFM₂ entre las demás AFs.

Contra	AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂	AFM ₁	AFP ₁	AFL
AFM ₂	0.003	0.004	0.001	0.002	0.0006	0.0003	0.0007

Por último se realizó una prueba de t por pares para encontrar la relación de AFB₁ y AFL, usando 35 muestras y no se encontró una diferencia significativa, quizá debido a que son AFs interconvertibles entre sí. Al hacer un análisis por lugares, encontramos una diferencia significativa en el Mercado de San Juan con un valor de $p = 0.0014$. Es posible porque el tipo de almacenamiento del Mercado de San Juan usa cajas de menor volumen, al menudeo. En la Central de Abasto y de Jamaica se venden volúmenes al mayoreo con menos cuidado en su almacenamiento.

De un total de 35 muestras analizadas el 100% de ellas, resultaron contaminadas con al menos alguna de las ocho AFs; del total de muestras, el 80% (28/35) presentó contaminación por AFB₁, el 89% (31/35) de AFB₂, 74% (26/35) de AFG₁, 83% (29/35) con AFG₂, 40% (14/35) de AFM₁, 91% (32/35) de AFM₂, 83% (29/35) de AFP₁ y 86%

(30/35) con AFL. Las empresas de exportación americanas y de importación mexicanas no analizan las AFs como cancerígenos de alimentos. **Tabla 16.**

Las concentraciones presentadas para AFs básicas fueron muy variadas y comprenden los rangos de 0.33 a 92.94 ng g⁻¹ para AFB₁, 0.02 a 109.86 ng g⁻¹ para AFB₂, 0.27 a 604.90 ng g⁻¹ para AFG₁ y 0.52 a 58.04 ng g⁻¹ para AFG₂. **Tabla 17.** Para las AFs hidroxiladas se encuentran en los rangos de 0.08 a 129.63 ng g⁻¹ para AFM₁, 0.12 a 50.48 ng g⁻¹ para AFM₂, 0.13 a 551.61 ng g⁻¹ para AFP₁ y 0.86 a 114.14 ng g⁻¹ para AFL. **Tabla 18.**

Los análisis muestran también que hubo una diferencia significativa en el Mercado de San Juan con respecto a los otros mercados ya que las muestras de almendra de este mercado presentan altas concentraciones de AFs hidroxiladas con respecto a las básicas las cuáles no pasan de 1.72 ng g⁻¹.

La muestra más contaminada por AFs básicas fue la 17 con una concentración de 669.71 ng g⁻¹ proveniente del mercado de Jamaica, la muestra más contaminada por AFs hidroxiladas es la muestra 22 también del mercado de Jamaica con una concentración de 569.03 ng g⁻¹. De las 35 muestras analizadas, nuevamente la 22 resultó ser la más contaminada de todas con 7 de las 8 aflatoxinas reportadas (no contiene AFM₁) con una concentración de AFt de 702.26 ng g⁻¹. **Figura 21.**

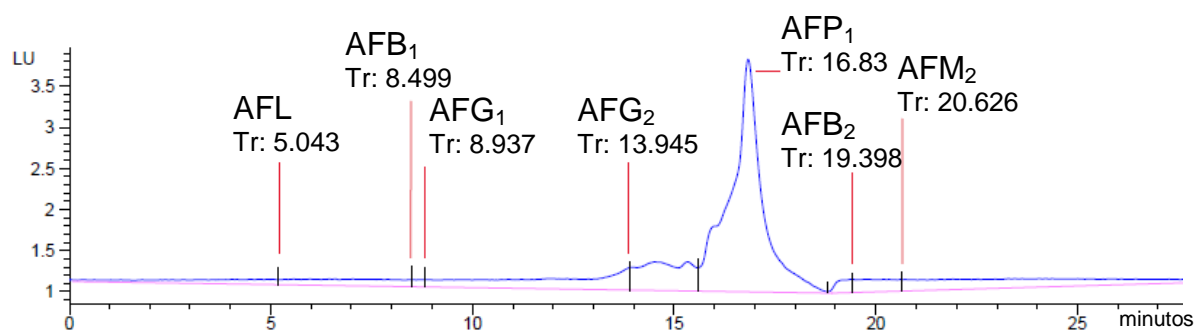


Figura 21. Cromatograma de la muestra 22 de almendra con una concentración de AFt de 702.26 ng g⁻¹ e identificación de 7 de las 8 AFs reportadas.

En las almendras analizadas se encontró la presencia de las ocho aflatoxinas tanto las 4 básicas (AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂) como de los 4 hidroxilados (AFM₁, AFM₂, AFP₁, AFL) siendo este estudio el primero en su tipo a nivel mundial.

Cabe señalar que ninguna de las muestras analizadas cumplen con los límites establecido por la NOM-188-SSA1-2002 que es de $20 \mu\text{g kg}^{-1}$ para AFt; y por el *Codex Alimentarius* de $15 \mu\text{g kg}^{-1}$ de AFt para frutos secos, todas las muestras se encuentran altamente contaminadas.

Los análisis estadísticos señalan que no hay diferencias significativas entre las AFs básicas pero sí entre sus hidroxilados, siendo la AFM₂ significativamente diferente de entre todas las demás; cada almendra es un individuo diferente con una contaminación específica según las condiciones durante su desarrollo y pueden presentar una distribución aleatoria de estas.

Las muestras de almendra presentan, en general, altas concentraciones de AFt debido a que estas toxinas se asocian a alimentos altos en carbohidratos y grasas. Algunas especies de *Aspergillus* obtienen la materia prima para el crecimiento en una forma saprófita es decir, obtienen las sustancias a partir de materia orgánica en descomposición y por lo tanto, mantienen la habilidad de secretar una gran diversidad de hidrolasas que las ayuda a utilizar a los nutrientes. Las proteínas hidrolíticas más importantes asociadas con *Aspergillus* son las proteasas, amilasas, lipasas y pectinasas (Mellon *et al.*, 2007).

Las lipasas tienen un importante papel hidrolítico en el metabolismo cuando los triglicéridos son usados como fuente de carbono. En particular el gen lipA que codifica a lipasa se ha sugerido que promueve la síntesis de aflatoxinas en ambientes ricos en lípidos por su aparente papel en la captura de nutrientes de carbono a partir de dichas fuentes (Rodrigues *et al.*, 2012).

Los patrones de formación de las AFs y de lípidos son similares. La biosíntesis ocurre, cuando, bajo determinadas condiciones físicas, químicas y biológicas, se interrumpe la reducción de los grupos cetónicos y se favorecen reacciones de condensación en la ruta metabólica para la producción de ácidos grasos (Ehrlich *et al.*, 2002). Este proceso tiene como resultado la síntesis de compuestos policetónicos (aflatoxinas). La ruta bioquímica generalmente aceptada para la biosíntesis de las AF involucra aproximadamente 23 reacciones enzimáticas y la mayor parte de los genes involucrados han sido aislados y caracterizados (Cleveland *et al.*, 2005; Ehrlich *et al.*,

2002; Scherm *et al.*, 2005). Estudios recientes sugieren que la regulación transcripcional en la biosíntesis por *Aspergillus sp.*, envuelve un modelo complejo de acción positiva o negativa afectada por respuestas fisiológicas debido a estímulos internos y externos (Scherm *et al.*, 2005). La síntesis de las AFs inicia cuando una molécula de acetato y una de malonil CoA son transformados a una unidad inicial de hexanoil por la acción de la enzima ácido-graso sintetasa (Coran *et al.*, 2002; Sweeney & Dobson, 1999); luego esta unidad crece por la acción de la policétido sintetasa hasta la formación del ácido norsolorínico, el primer precursor estable de la ruta biosintética.

Figura 22.

Esta estructura básica C²⁰ poli-β-quétido sufre posteriormente de 12 a 17 transformaciones enzimáticas hasta llegar a la formación de versicolorina A y B como lo muestra la **Figura 22**. De la versicolorina A se derivará la formación de AFB₁ y AFG₁ a partir de un intermediario llamado dimetil-esterigmatocistina y por su parte la versicolorina B producirá dihidro-dimetil-esterigmatocistina la cual lleva a la producción de las AFB₂ y AFG₂ (Scherm *et al.*, 2005; Sweeney & Dobson, 1999; Woloshuk & Prieto, 1998). Cabe mencionar que *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius* y otros ascomicetos y deuteromicetos incluyendo *A. nidulans* producen la micotoxina llamada esterigmatocistina que resulta ser el penúltimo intermediario en la ruta de la síntesis de las AFs (Sweeney & Dobson, 1999).

El aflatoxicol (AFL) es uno de los metabolitos de AFB₁ que se forma por la reducción selectiva del ciclopentanona carbonilo de AFB₁ y es 18 veces menos tóxico que este. La aflatoxina P₁ (AFP₁) es el derivado fenólico resultado de la O-desmetilación de la AFB₁ y su toxicidad es bastante reducida con respecto a AFB₁ aunque se sugiere que la formación de AFP₁ representa una destoxificación más que un paso de activación. Las Aflatoxinas M₁ (AFM₁) y la M₂ (AFM₂) son productos metabólicos oxidativos de las AFB₁ y AFB₂ producidos por el organismo que las ingiere, siendo la AFM₁ de 2 a 10% menos cancerígeno que AFB₁. Si bien estos derivados hidroxilados han sido estudiados y reportados en modelos animales, su presencia y formación en modelos vegetales aún no está del todo explicado, pero en el presente trabajo se comprueba su presencia.

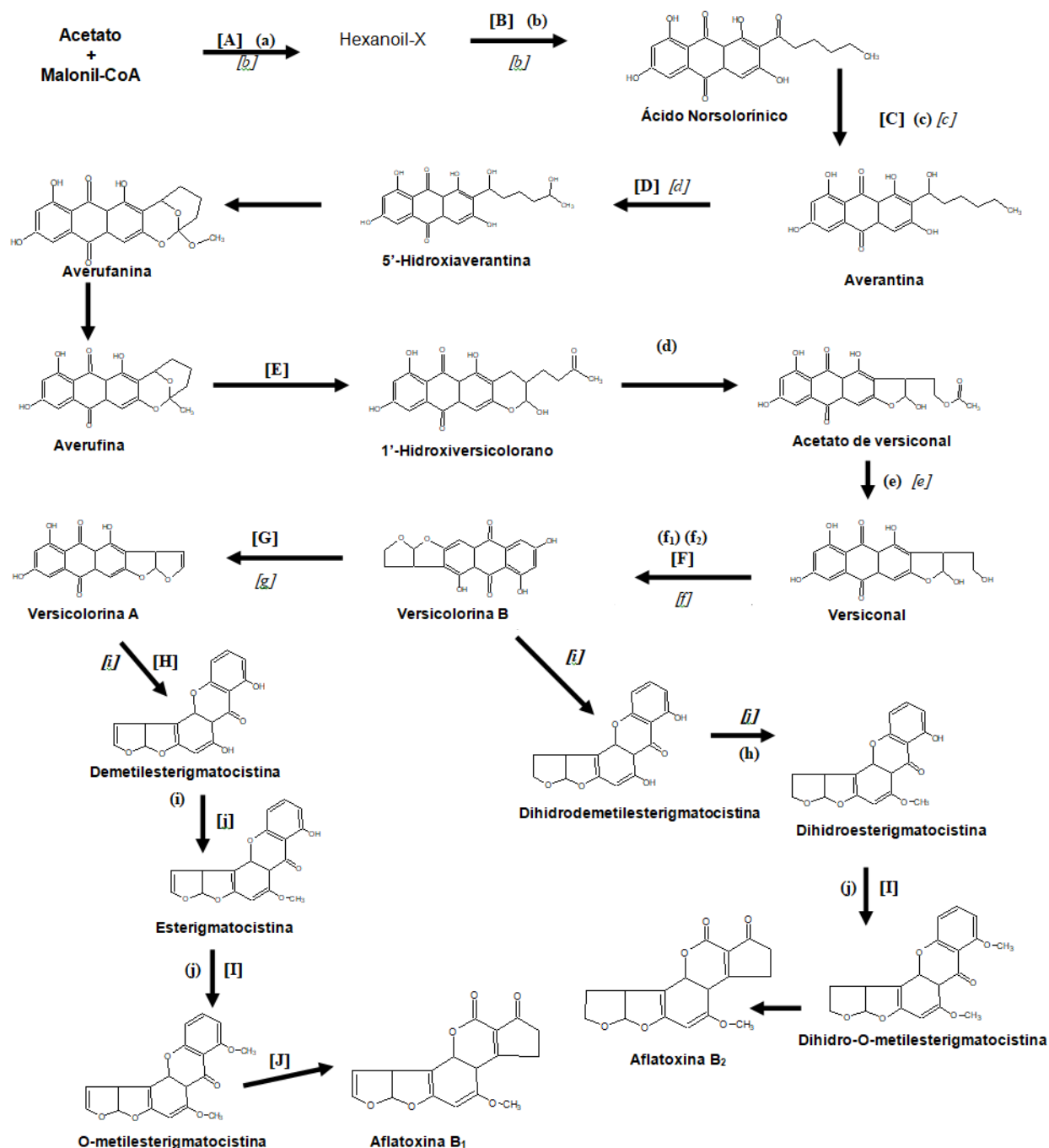


Figura 22. Ruta biosintética de la esterigmatocistina y aflatoxinas. Enzimas involucradas: (a) Ácido-graso sintetasa, (b) policétido sintetasa, (c) ácido norsolorínico reductasa, (d) versiconal hemiacetal acetato reductasa, (e) esterasa, (f1) versicolorina B sintetasa, (f2) versiconil ciclaza, (g) desaturasa, (h) O-metil-transferasa (MT-II), (i) O-metil-transferasa, (j) O-metil-transferasa (MT-I). Genes involucrados en la biosíntesis de las aflatoxinas: [A] fas1A and fas2A, [B] pksA, [C] nor1, norA, [D] avnA, [E] avf1 (afB and afW), [F] vbs, [G] verB, [H] ver1A, afS, [I] omtA and [J] ord1. Genes involucrados en la síntesis de la esterigmatocistina: [a] stcJ and stcK, [b] stcA, [c] stcE, [d] stcF, [e] stcI, [f] stcN, [g] stcL, [h] stcS, [i] stcU and [j] stcP (Minto & Townsend, 1997; Woloshuk & Prieto, 1998; Prieto *et al.*, 1996; Bennett *et al.*, 1997; Sweeney & Dobson, 1999).

Las muestras de almendra probablemente estaban infectadas por *A. parasiticus* ya que esta produce altos niveles de aflatoxinas B y G (Picot *et al.*, 2017). AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂ se encuentran en todas nuestras muestras, siendo la AFG₁ la que presentó la mayor concentración de esta AF en una muestra con 604.90 ng g⁻¹.

La contaminación de las almendras con aflatoxinas puede ocurrir durante el desarrollo de la semilla, en el secado o cuando se almacenan. La contaminación por aflatoxinas en las almendras ocurre principalmente durante el desarrollo del fruto porque después de la cosecha, el riesgo de infección por *Aspergillus spp.* y la contaminación por aflatoxinas pueden controlarse si se mantienen las condiciones de humedad adecuadas durante el almacenamiento (Campbell *et al.*, 2003). El daño por insectos a la fruta o a la semilla al crear heridas, facilitan la infección además traen consigo esporas y propágulos de los hongos a la semilla. No se requiere daño por insectos para la infección de la semilla, pero es un factor de riesgo clave para la contaminación por aflatoxinas. Las almendras analizadas no presentaron ningún daño exterior por lo que la alta concentración de AFs puede ser por la contaminación del fruto o bien al mal almacenamiento.

Compuestos químicos como fenoles, naftoquinonas, taninos y plumbaginas que poseen potentes efectos contra la biosíntesis de aflatoxinas únicamente se han encontrado en la cutícula de la almendra y sólo en trazas. Por otro lado, compuestos que presentan algún tipo de actividad biológica y que se ha demostrado que se producen en altas concentraciones en las almendras, como los triterpenoides, fenólicos y esteroides, no han mostrado tener una actividad antiaflatoxicogénica significativa, esto puede explicar la alta concentración de AFs en las muestras analizadas. Faltan estudios sobre este tema en las almendras como se han hecho en otras nueces, pero es un hecho conocido que, en las almendras, las aflatoxinas suelen acumularse en la cutícula o tegumento (Rodrigues *et al.*, 2012; Gradziel & Wang, 1994).

Nuestro estudio sugiere que la almendra es una de las matrices más contaminadas por AFs; las cantidades de AFs básicas contenida en la almendra (139 ng g^{-1}) superan a las del cacahuete (8 ng g^{-1}) y se pueden equiparar con las cantidades reportadas en la pimienta (192 ng g^{-1}) (Garduño–García *et al.*, 2017). Podemos concluir que las cantidades de AFs en almendra se encuentran entre las más altas en alimentos. La almendra se consume en diferentes variedades y de moderadas a altas cantidades, se preparan y condimentan diversos platillos con ella y además se elaboran cremas y otros cosméticos. Por lo tanto la contribución de AFs de la almendra al organismo se puede considerar relativamente alta en comparación a otras oleaginosas como el cacahuete o el pistache.

Este estudio presenta un análisis detallado de la contaminación por AFs en la almendra al reportar por primera vez la presencia de las ocho AFs (AFB_1 , AFB_2 , AFG_1 , AFG_2 , AFM_1 , AFM_2 , AFP_1 y AFL). La falta de normatividad en los países sobre este tema, evitan la reducción de la concentración de AF en los alimentos.

VI. CONCLUSIONES

- Se validó el método analítico para la determinación y cuantificación de AF en la almendra, por medio de columnas de inmunoafinidad y utilizando un equipo de Cromatografía de Alta Eficiencia (HPLC).
- Se muestrearon tres de los mercados más importantes y representativos de la Ciudad de México para la obtención de las 35 muestras de almendra natural.
- En las almendras analizadas se encontró la presencia de ocho aflatoxinas tanto las 4 básicas (AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂) como de sus cuatro hidroxilados (AFM₁, AFM₂, AFP₁, AFL). Estos resultados se reportan por primera vez no solamente en México sino también a nivel mundial.
- Valores de recobro por > 85% muestran una buena recuperación para las ocho AFs así como una buena selectividad y resolución cromatográfica.
- De las 35 muestras analizadas el 100% de ellas, resultaron contaminadas con al menos alguna de las ocho AFs. Del total de muestras, el 80% (28/35) presentó contaminación por AFB₁, el 89 % (31/35) de AFB₂, 74 % (26/35) de AFG₁, 83 % (29/35) con AFG₂, 40 % (14/35) de AFM₁, 91 % (32/35) de AFM₂, 83 % (29/35) de AFP₁ y 86 % (30/35) con AFL.
- Ninguna de las muestras analizadas cumplen con los límites establecido por la NOM-188-SSA1-2008 que es de 20 ng g⁻¹ para AFt; y por el *Codex Alimentarius* de 15 ng g⁻¹ de AFt para frutos secos, todas las muestras se encuentran altamente contaminadas (con la concentración más alta de AFt de 702.26 ng g⁻¹).
- Los análisis estadísticos señalan que no hay diferencias significativas entre las AFs básicas pero sí entre sus hidroxilados, siendo la AFM₂ significativamente diferente de entre todas las demás.
- La almendra resultó ser uno de los alimentos más contaminados con aflatoxinas; las cantidades de AFs básicas contenida en la almendra (139 ng g⁻¹) superan a las del cacahuete (8 ng g⁻¹) y se pueden equiparar con las cantidades reportadas en la pimienta (192 ng g⁻¹). Podemos concluir que las cantidades de AFs en almendra presentan un riesgo al consumidor y un aporte importante de cancerígenos de alimentos en la dieta.

VII. REFERENCIAS

- Abdel-Gawad, K. M., & Zohri, A. A. 1993. Fungal flora and mycotoxins of six kinds of nut seeds for human consumption in Saudi Arabia. *Mycopathologia*, 124(1): 55-64.
- Abdulkadar, A. H. W., Al-Ali, A., & Al-Jedah, J. 2000. Aflatoxin contamination in edible nuts imported in Qatar. *Food Control*, 11(2): 157-160.
- Akiyama, H., Goda, Y., Tanaka, T., Toyoda, M. 2001. Determination of aflatoxins B₁, B₂, G₁ y G₂ in spices using a multifunctional column clean-up. *Journal of Chromatography A*, 932: 153-157.
- AOAC. 2005. Natural toxins in Official Methods of Analysis of AOAC international. Horwitz, W (Ed.). 17th edition. Trucksess, M.W. Chapter Editor. Chapter 49: Natural Toxins. Vol.II Food Composition Additives; Natural contaminants. Washington, D.C. USA. p. 1-42.
- Asao, T., Büchi, G., Abdel-Kader, M.M., Chang, S.B., Wick, E.L. y Wogan, G.N. 1965. The structures of aflatoxins B₁ and G₁. *Journal of American Chemistry Society*, 87: 882-886
- Baltaci, C., Ilyasoğlu, H., Yüksel, F. 2012. Single-Laboratory validation for the determination of Aflatoxin B₁, B₂, G₁, and G₂ in foods base on Immunoaffinity column and Liquid Chromatography with postcolumn derivatization and fluorescence detection. *Food Analytical Methods*, 6(1): 36-44.
- Bennett, R.A., Essigmann, J.M., Wogan, G.N. 1981. Excretion of an aflatoxin-guanine adduct in the urine of aflatoxin B₁-treated rats. *Cancer Research*, 41: 650-654.
- Bennett, J.W., Chang P.-K., Bhatnagar D. 1997. One gene to whole pathway: The role of norsolorinic acid in aflatoxin research. *Advanced Applied Microbiology* 45: 1-15.
- Binder, E.M. 2007. Managing the risk of mycotoxins in modern feed production. *Animal Feed Science and Technology*, 133: 149-166.
- Bottalico, A., & Logrieco, A. 2001. Occurrence of toxigenic fungi and mycotoxins in Italy. Occurrence of toxigenic fungi and mycotoxins in plants, food and feeds in Europe, European Commission, COST Action, 835: 69-104.
- Braicu, C., Puia, C., Bodoki, E., Socaciu, C. 2008. Screening and quantification of aflatoxins and ochratoxin in different cereals cultivated in Romania using thin layer chromatography-densitometry. *Journal of Food Quality*, 31:108-120.
- Büchi G., Foulkes D. M., Kurono M., Mitchell G. F. 1966. The total synthesis of racemic Aflatoxin B₁. *Journal of the American Chemical Society*, 88: 4534-4536.
- Cabañes, F.J., Abarca, M.L., Bragulat, M.R., Castellá, G. 2007. Especies productoras de micotoxinas. En: J.M. Ramos ed. *Micotoxinas en Alimentos*. España. Ediciones Díaz de Santos. 29-61.
- Campbell, B. C., Molyneux, R. J., & Schatzki, T. F. 2003. Current research on reducing pre-and post-harvest aflatoxin contamination of US almond, pistachio, and walnut. *Journal of Toxicology: Toxin Reviews*, 22(2-3): 225-266.

Canestrari, G., Ricci, B., Pizzamiglio, V., Biancardi A., Piazza ,P., Merialdi, G., Tosi, G., Giacometti, F., Nocetti, M., Fustini, M., Serraino, A., Andrea Formigoni, A. 2016. Aflatoxin B1 Risk Management in Parmigiano Reggiano Dairy Cow Feed. *Italian Journal of Food Safety*, 5(1):5291.

Carrillo, L. 2003. *Los hongos de los alimentos y forrajes*. Universidad Nacional de Salta. Argentina. 128 pp.

CD, Commission Directive. 1998. 98/53/EC of 16 July 1998 laying down the sampling methods and the methods of analysis for the official control of the levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal of the European Communities*, L201/93, Luxembourg.

CE, Comisión Europea. 2006. 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. Consultado el 20 de Septiembre de 2017.
<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:070:0012:0034:ES:PDF>

CE, Comisión Europea. 2010. Documento de orientación para las autoridades competentes en materia de control del cumplimiento de la legislación de la UE sobre aflatoxinas. Consultado el 15 de Abril de 2017.
http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/contaminants/guidance-2010_es.pdf

Charoenpornsook, K., & Kavisarasai, P. 2006. Mycotoxins in animal feedstuff of Thailand. *Journal of Science and Technology*, 6: 25-28.

Cheraghali, A. M., Yazdanpanah, H., Doraki, N., Abouhossain, G., Hassibi, M., Ali-abadi, S., Aliakbarpoor, M., Amirahmadi, M., Askarian, A., Fallah, N., Hashemi, T., Jalali, M., Kalantari, N., Khodadadi, E., Maddah, B., Mohit, R., Mohseny, M., Phaghihy, Z., Rahmani, A., Setoodeh, L., Soleimany, E., Zamani, F. 2007. Incidence of aflatoxins in Iran pistachio nuts. *Food and Chemical Toxicology*, 45: 812-816.

Chiavaro, E., Dall'Asta, C., Galaverna, G., Biancardi, A., Gambarelli, E., Dossena, A., Marchelli, R. 2001. New reversed-phase liquid chromatographic method to detect aflatoxins in food and feed with cyclodextrins as fluorescence enhancers added to the eluent. *Journal of Chromatography A*, 937: 31-40.

Chuang, S., La Vecchia, C., Boffetta, P. 2009. Liver cancer: descriptive epidemiology and risk factors other than HBV and HCV infection. *Cancer Letters*, 286: 9–14.

Cleveland, T.E; Yu, J., Bhatnagar, D., Chen, Z.Y., Brown, R.L., Chang, P.K. & Cary, J.W. 2005. Progress in elucidating the molecular basis of the host plant-*Aspergillus flavus* interaction: A basis for devising strategies to reduce Aflatoxin contamination in crops. *In: Aflatoxin and Food Safety*. Abbas, H.K. Ed. Taylor and Francis CRC, FL, EEUU. 167-193.

Codex Alimentarius. 2008. Codex General Standard for contaminants and toxins in food and feed. FAO. Codex Stan193-1995. 56 pp. Consultado el 23 de Mayo de 2017.
http://www.codexalimentarius.net/download/standards/17/CXS_193e.pdf

Coran, M.H.W., & Craig A.T. 2002. Initial characterization of a type I fatty acid synthase and polyketide synthase multienzyme complex NorS in the biosynthesis of Aflatoxin B₁. *Chemistry and Biology*, 9: 981–988.

Creppy, E. E. 2002. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicology letters*, 127(1): 19-28.

Croy, R.G., Essigmann, J.M., Reinhold, V.N., Wogan, G.N. 1978. Identification of the principal aflatoxin B₁-DNA adduct formed in vivo in rat liver. *Proceedings of the National Academy of Science*, 75: 1745–1749.

Cruz-Rueda, V. 2016. *Curso de Validación de Métodos Analíticos*. Centro de Capacitación. R.H. World SA de CV. Consultado el 20 de Junio de 2017.
<http://www.rhworld.com.mx>

Daradimos, E., Marcaki, P., Koupparis, M. 2000. Evaluation and validation of two fluorometric HPLC methods for the determination of aflatoxin B₁ in olive oil. *Food Additives and Contaminants*, 17: 65–73.

Das, B, Ahmed, N., & Singh, P. 2011. *Prunus* diversity- early and present development: A review. *International Journal of Biodiversity and Conservation*, 3(14): 721-734.

D’Mello, J.P.F., & Macdonald, A.M.C. 1997. Mycotoxins. *Animal Feed Science Technology*, 69: 155-166.

EFSA, European Food Safety Authority. 2010. Dietary reference values. Consultado el 25 de Marzo de 2017.
<https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/dietary-reference-values-and-dietary-guidelines>

Ehrlich, K.C., Montalbano, B.G., Cary, J.W. & Cotty, P.J. 2002. Promoter elements in the aflatoxin pathway polyketide synthase gene. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1576: 171-175.

FAO, Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura. 2004. Reglamentos a nivel mundial para las micotoxinas en alimentos y en las raciones. Estudio FAO Alimentación y Nutrición No. 81 Roma, Italia.

FAOSTAT, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Statistics Division. 2014. Production/Crops for almonds with Shell. Consultado el 25 de Marzo de 2017.
<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>

Feizy, J., Beheshti, H.R., Khoshbakht Fahim, N., Fakoor Janati, S.S., Davari, G. 2010. Survey of aflatoxins in rice from Iran using immune affinity column clean-up and HPLC with fluorescence detection. *Food Additives and Contaminants*, 3: 263-267.

Fernandes-Oliveira, C.A., Kobashigawa, E., Alves, T., Mestieri, L., Albuquerque, R., Correa, B. 2000. Aflatoxin B₁ residues in eggs of laying hens fed a diet containing different levels of the mycotoxin. *Food Additives and Contaminants*, 17(6): 459-462.

Fernández, A., Hernández, M., Verde, M.T., Sanz, M. 2000. Effect of aflatoxin on performance, hematology, and clinical immunology in lambs. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 64: 53–58.

Frisvad, J.C., Thrane, U., Samson, R.A. 2007. Mycotoxin producers. *In: Dijksterhuis, J., Samson, R.A., (Eds.). A multifaceted approach to fungi and Food. Food Mycology*. 135-159.

García, S., & Heredia, N. 2006. Mycotoxins in Mexico: Epidemiology, management, and control strategies. *Mycopathologia*, 162: 255-264.

- Garduño-García, JI., Carvajal-Moreno, M*, Rojo-Callejas F., Ruiz-Velasco S. 2017. Detection of Aflatoxins, mutagens and carcinogens, in black, white and green peppers (*Piper nigrum L.*). Journal of Microbial and Biochemical Technology. 9(3):95-104.
- Gilbert, J. 2002. Validation of analytical methods for determining mycotoxins in food stuffs. Trends in Analytical Chemistry, 21: 468-486.
- Gimeno, A. 2004. Aflatoxina M₁ en la Leche. Riesgos para la Salud Pública. Prevención y Control, Alimentación Animal, 49: 32-44.
- Gong, Y., Hounsa, A., Egal, S., Sutcliffe, A.E., Hall, A.J., Cardwell, K.F., Wild, C.P. 2004. Postweaning exposure to aflatoxin results in impaired child growth: a longitudinal study in Benin, West Africa. Environmental Health Perspectives, 112: 1334–1338.
- Gradziel, T.M. 2009. Almond (*Prunus dulcis*) breeding. Breeding plantation tree crops: temperate species. Springer, New York. 1–31.
- Gradziel, T. M., & Wang, D. 1994. Susceptibility of California almond cultivars to aflatoxigenic *Aspergillus flavus*. HortScience, 29(1): 33-35.
- Guzmán, D. 2007. La exposición a la aflatoxina B-1 en animales de laboratorio y su significado en la salud pública. Salud Pública de México, 49(3): 227-235.
- Hussein, H.S., & Brasel, J.M. 2001. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. Toxicology, 167(2):101–134.
- INEGI, Instituto Nacional de Estadística y Geografía. 1998. Cultivos perennes de México: VII Censo Agropecuario-Almendro. 21-25.
- Jaimez, J., Fuente, C.A., Vázquez, B.I., Franco, C., Cepeda, A., Mahuizer, G. 2000. Application of the assay of aflatoxins by liquid chromatography with fluorescence detection in food analysis. Journal of Chromatography A, 882: 1-10.
- Jiménez, M., & Mateo, R. 2001. Occurrence of toxigenic fungi and mycotoxins in agricultural commodities in Spain. Occurrence of toxigenic fungi and mycotoxins in plants, food and feeds in Europe, European Commission, COST action, 835, 173-190.
- Kiessling, K.H., Pettersson, H., Sandholm, K., Olsen, M. 1984. Metabolism of aflatoxin, ochratoxin, zearalenone, and three tricothecenes by intact rumen fluid, rumen protozoa, and rumen bacteria. Applied and Environmental Microbiology, 47: 1070–1073.
- Kok, W. 1994. Derivatization reactions for the determination of aflatoxins by liquid chromatography with fluorescence detection. Journal of Chromatography B, 659: 127-137.
- Liu, Y., & Wu, F., 2010. Global burden of aflatoxin-induced hepatocellular carcinoma: a risk assessment. Environmental Health Perspectives, 118: 818–824.
- Lutfullah, G., & Hussain, A. 2011. Studies on contamination level of aflatoxins in some dried fruits and nuts of Pakistan. Food Control, 22(3): 426-429.

Manetta, A.C., Di Giuseppe, L., Giammarco, M., Fusaro, I., Simonella, A., Gramenzi, A., Formigoni, A. 2005. High-performance liquid chromatography with post-column derivatisation and fluorescence detection for sensitive determination of aflatoxin M1 in milk and cheese. *Journal of Chromatography A*, 1083: 219–222.

MAPAMA, Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente. 2013. Monografía *Prunus amygdalus*. Consultado el 23 de Marzo de 2017.

http://www.mapama.gob.es/es/ministerio/servicios/informacion/almendra_tcm7-315319.pdf

Mellon, J. E., Cotty, P. J., & Dowd, M. K. 2007. *Aspergillus flavus* hydrolases: their roles in pathogenesis and substrate utilization. *Applied microbiology and biotechnology*, 77(3): 497-504.

Minto, R.E., & Townsend C.A. 1997. Enzymology and molecular biology of aflatoxin biosynthesis. *Chemical Review* 97: 2537-2552.

Muench, K.F., Misra, R.P., Humayun, M.Z. 1983. Sequence specificity in aflatoxin B₁-DNA interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 80: 6–10.

Muscarella, M., Lo Magro, S., Palermo, C., Centonze, D. 2007. Validation according to European Commission Decision 2002/657/ EC of a confirmatory method for aflatoxin M1 in milk based on immunoaffinity columns and high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Analytica Chimica Acta*, 594:257–264.

Norma del Instituto Argentino de Normalización y Certificación (NOM IRAM 32). 1997. Metrología. Vocabulario VIM.

Norma Oficial Mexicana (NOM-247-SSA1-2008). 2008. Productos y servicios. Cereales y sus productos. Productos de panificación. Disposiciones y especificaciones sanitarias y nutrimentales. Consultado el 23 de Mayo de 2017.

http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5100356&fecha=27/07/2009

Omede, A.A., 2008. Critical issues in poultry feed quality evaluation in Nigeria. *Proceedings of the 23rd Worlds Poultry Congress*, June 29-July 4, Brisbane, Australia, 455 pp.

OPS, Organización Panamericana de la Salud. 1983. Criterios de salud ambiental 11. *Publicación Científica N° 453*. Organización Mundial de la Salud. 2-83.

Padrón, M., Yuef, H., Hernández Delgado, S., Reyes Méndez, C. A., & Vázquez Carrillo, G. 2013. El Género *Aspergillus* y sus Micotoxinas en Maíz en México: Problemática y Perspectivas. *Revista mexicana de fitopatología*, 31(2), 126-146.

Palumbo, J. D., Mahoney, N. E., Light, D. M., Siegel, J., Puckett, R. D., Michailides, T. J. 2014. Spread of *Aspergillus flavus* by navel orangeworm (*Amyelois transitella*) on almond. *Plant Disease*, 98(9): 1194-1199.

Paul, P.S., Johnson, D.W., Mirocha, C.J., Soper, F.F., Thoen, C.C., Muscoplat, C.C., Weber, A.F. 1977. *In vitro* stimulation of bovine peripheral blood lymphocytes: suppression of phyto mitogen and specific antigen lymphocyte responses by aflatoxin. *American Journal of Veterinary Research*, 38: 2033–2035.

Peña, R., Alcaráz, M.C., Arce, L., Ríos, A., Valcárcel, M. 2002. Screening of aflatoxins in feed samples using a flow system coupled to capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography*, 967:303–314.

Peraica, M., Radic, B., Lucic, A., Pavlovic, M., 1999. Toxic effects of mycotoxins in humans. *Bulletin of the World Health Organization*, 77: 754–763.

Perusia, O.R., & Rodríguez, R. 2001. Micotoxicosis. *Revista de Investigación Veterinaria de Perú*, 12 (2): 87–116.

Picot, A., Ortega-Beltran, A., Puckett, R. D., Siegel, J. P., & Michailides, T. J. 2017. Period of susceptibility of almonds to aflatoxin contamination during development in the orchard. *European Journal of Plant Pathology*, 148(3): 521-531.

Pitt, J.I., Basílico, J.C., Abarca, M.L., López, C. 2000. Mycotoxins and toxigenic fungi. *Medical Mycology*, 38: 41–46.

Prieto, R., Yousibova, G.L., Woloshuk, C.P. 1996. Identification of aflatoxin biosynthetic genes by genetic complementation in an *Aspergillus flavus* mutant lacking the aflatoxin gene cluster. *Applied Environmental Microbiology* 62: 3567-3571.

RAE, Real Academia Española. «Almendra». *Diccionario de la Lengua Española*. Edición del Tricentenario. Actualización 2017. Consultado el 23 de Marzo de 2017.
<http://dle.rae.es/?id=1yDmgAi>

Reddy, S.V., Mayi, D.K., Reddy, M.U., Thirumala, D.K., Reddy, D.V. 2001. Aflatoxin B1 in different grades of chillies (*Capsicum annum* L.) in India as determined by indirect competitive ELISA. *Food Additives Contaminants*, 18:553-558.

Rodrigues, P., Venâncio, A., Lima, N. 2012. Mycobiota and mycotoxins of almonds and chestnuts with special reference to aflatoxins. *Food Research International*, 48(1): 76-90.

Rodrigues, P., Venâncio, A., Lima, N. 2012. Aflatoxigenic fungi and aflatoxins in Portuguese almonds. *The Scientific World Journal*, 2012: 1-9.

Sanchis, V., Marín, S., Ramos, A.J. 2007. Factores determinantes en la producción de micotoxinas. En: J.M. Ramos ed. *Micotoxinas en Alimentos*. España: Ediciones Díaz de Santos. 63-89.

Sarimehmetoglu, B., Kuplulu, O., Haluk Celik, T. 2004. Detection of aflatoxin M1 in cheese samples by ELISA. *Food Control*, 15: 45–49.

Schade, J. E., McGreevy, K., King, A. D., Mackey, B., Fuller, G. 1975. Incidence of aflatoxin in California almonds. *Applied Microbiology*, 29(1): 48-53.

Schatzki, T. F. 1996. Distribution of aflatoxin in almonds. *Journal of agricultural and food chemistry*, 44(11), 3595-3597.

Schatzki, T. F., Ong, M. S. 2001. Dependence of aflatoxin in almonds on the type and amount of insect damage. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 49(9): 4513-4519.

Scheidegger, K.A., & Payne, G.A. 2003. Unlocking the secrets behind secondary metabolism: A review of *Aspergillus flavus* from pathogenicity to functional genomics. *Journal of Toxicology-Toxin Reviews*, 22(2-3): 423-459.

Scherm, B., Palomba, M., Serra, D., Marcello, A. & Migheli, Q. 2005. Detection of transcripts of the aflatoxin genes *afID*, *afIO*, and *afIP* by reverse transcription–polymerase chain reaction allows differentiation of aflatoxin-producing and non-producing isolates of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *International Journal of Food Microbiology*, 98: 201–210.

Shipman, M.K., Boniface, D.R., Tefft, M.E., McCloghry, F. 1997. Antenatal perineal massage and subsequent perineal outcomes: a randomised controlled trial. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 104 (7): 787–91.

SIAP, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2012. Monografía de cultivos: Almendra. Consultado el 22 de Marzo de 2017.
<http://www.gob.mx/siap/articulos/monografias-32658>

Soriano del Castillo, J.M. 2007. *Micotoxinas en Alimentos*. Ediciones Díaz de Santos. España. 396 pp.

Sotomayor, R.E., Washington, M., Nguyen, L., Nyanganyi, R., Hinton, D. M. and Chou, M. 2003. Effects of intermittent exposure to aflatoxin B₁ on DNA and RNA adduct formation in rat liver: dose-response and temporal patterns. *Toxicological Sciences*, 73. 329-338.

SSA, Secretaría de Salud. 2011. Comisión de control analítico y ampliación de cobertura, Criterios para la validación de métodos fisicoquímicos. Consultado el 20 de Septiembre de 2017.
www.cofepris.gob.mx/TyS/.../cvfq032011.pdf

Sweeney, M.J., & Dobson, A.D.W. 1998. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. *International Journal of Food Microbiology*, 43: 141–158.

Sweeney, M.J., & Dobson, A.D.W. 1999. Molecular biology of mycotoxin biosynthesis. *FEMS Microbiology Letters*, 175(2): 149-163.

Tavcar-Kalcher, G., Vrtac, K., Pestevsek, U., Vengust, A. 2007. Validation of the procedure for the determination of aflatoxin B₁ in animal liver using immunoaffinity columns and liquid chromatography with postcolumn derivatisation and fluorescence detection. *Food Control*, 18: 333–337.

Turner, N., Subrahmanyam, S., Piletsky, S., 2009. Analytical methods for determination of mycotoxins: a review. *Analytica Chimica Acta*, 632: 168-180.

USDA. United States Department of Agriculture. 2010. Almond Forecast Overview. Foreign Agricultural Service. Consultado el 20 de Marzo de 2017.
https://www.fas.usda.gov/htp/horticulture/Tree%20Nuts/2009_Almonds.pdf

USDA. United States Department of Agriculture. Foreign Agricultural Service. 2017. Tree Nuts: World Markets and Trade. Consultado el 12 de Abril de 2017.
<https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/TreeNuts.pdf>

Van Egmond, H.P., Heisterkamp, S.H., Paulsch W.E. 1991. EC-collaborative study on the determination of aflatoxin B₁ in animal feeding stuffs. *Food Additives and Contaminants*, 1:17-29.

Wagacha, J.M., & Muthomi, J.W. 2008. Mycotoxin problem in Africa: Current status, implications to food safety and health and possible management strategies. *International Journal of Food Microbiology*, 124: 1-12.

Whitaker, T. B., Slate, A., Birmingham, T., Adams, J., Jacobs, M., Gray, G. 2010. Correlation between aflatoxin contamination and various USDA grade categories of shelled almonds. *Journal of AOAC International*, 93(3), 943-947.

WHO, World Health Organization. 1979. *Mycotoxins Environmental Health Criteria*. 1: 21–84.

Wickson, E.J. 2007. *The California fruits and how to grow them*. 21th Edition. Pacific Rural Press, San Francisco, CA. 153 pp.

Wild, C.P., & Turner, P.C. 2002. The toxicology of aflatoxins as a basis for public health decisions. *Mutagenesis*, 17 (6): 471-481.

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

Woloshuk, C.P., & Prieto, R. 1998. Genetic organization and function of the aflatoxin B1 biosynthetic genes. *FEMS Microbiology Letters*, 160 (2): 169-176.