

## UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

# DETERMINACIÓN DE AFLATOXINAS EN CEREALES DE CONSUMO INFANTIL COMERCIALIZADOS EN CUAUTITLÀN IZCALLI, EDO DE MÈX.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE: INGENIERA AGRÌCOLA

P R E S E N T A:

REYES PÉREZ JESICA ABIGALI

**ASESORA:** 

DRA. MARTHA YOLANDA QUEZADA VIAY COASESORA:

M. en M. JOSEFINA MORENO LARA

**CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2021** 





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.

#### **DEDICATORIA**

A mi mamá, María Angélica Pérez Alanis, por siempre ser mi punto de apoyo, mi confidente, mi mano derecha y de las personas que siempre han creído en mí, gracias a ti soy la mujer que cumplirá todas sus metas sin miedo alguno.

A mi papá, José Luis Reyes Medrano, por el apoyo brindado a lo largo de mis 21 años de vida académica, por creer en mí y siempre alentarme a hacer lo que me gusta sin importar el qué dirán, gracias por cada día de trabajo y el apoyo incondicional.

Gracias a ambos por el gran esfuerzo que han hecho al darme estudios, por traerme y cuidar de mí, por convertirme en lo que soy y lo que fui. ¡Lo logramos!

#### **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por darme una segunda casa, la oportunidad de conocer personas muy importantes en mi vida y por ofrecerme 8 años de mi vida académica, en el Colegio de Ciencias y Humanidades Plantel Azcapotzalco y en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán - Campo 4.

A la carrera de Ingeniería Agrícola por sembrar semillas de conciencia en nosotros sus alumnos y enseñarnos a cosechar nuevas sociedades.

A mi hermanito, Luis Angel, por no dejar que pasara ni un solo día sin que olvidara que tenía una tesis pendiente, por escucharme, cuidarme y soportarme en todo momento.

A mis abuelitos, Martha y Gil, por el amor incondicional, la fe que pusieron siempre en mí y por nunca mandarme sin desayunar. A Fela y Cope por siempre estar orgullosos de mí y apoyarme. ¡Qué fortuna poder contar con ustedes!

A mis tíos, por sembrar en mí las ganas de estudiar una carrera universitaria y siempre llegar a más. Con su ejemplo logré llegar hasta aquí.

A mis amigos: David Antonio, por siempre seguir mis locuras y no dejarme morir en el intento; Karla Marisol, por ser mi amiga de toda la vida y compartir conmigo 11 años de estudio; Itzel por ser mi primer amiga de la uni y siempre estar conmigo en todas las batallas; Karen, por apoyarme cada que lo necesitaba y siempre tener los consejos indicados; a Maik por hacer del último año el más significativo y enseñarme a disfrutar de esos pancitos después de clases, a Margarito, Axel y todos los que me apoyaron a lo largo de mi vida universitaria, gracias por tantas risas, pizzas, anécdotas y fotos en las letras de cada lugar de los viajes de práctica.

A mis mejores amigos, Citlalli y Emanuel, por siempre haber tenido las palabras indicadas en el momento preciso, por ser un pilar importante en mi vida y por la amistad tan sincera que me han ofrecido a lo largo de tantos años. Gracias por haberme dado los ánimos suficientes para continuar con mis metas.

A la Dra. Martha Yolanda Quezada Viay, por haberme brindado su apoyo, confianza y amistad, por ser más que una maestra y haber buscado las herramientas necesarias para que las lecciones no solo se quedaran dentro del salón de clases, por darme la oportunidad de superarme académicamente y como persona, gracias a usted no conocí límites, llegué hasta Paraguay y logré ser Ingeniera.

A la M. en M. Josefina Moreno Lara, por brindarme la oportunidad de adentrarme al mundo de las micotoxinas, por compartir su conocimiento y siempre guiarme en esta ardua investigación. Aún nos quedan muchos hongos micotoxinogénicos que investigar.

Al servicio social "Análisis de calidad poscosecha de granos y semillas y sus derivados alimenticios" en el cual se derivó el trabajo de "Determinación de micotoxinas en alimentos de consumo infantil comercializados en México", colaboración con el CEMIT de la Universidad de Asunción de Paraguay, dando origen al presente trabajo de tesis.

A la Dra. Andrea Alejandra Arrúa, por la oportunidad de presentar parte de mi trabajo de tesis en la "I Jornada Paraguaya de Micotoxicología" como cierre del proyecto "Ocurrencias de micotoxinas en alimentos comerciales y leche para bebé en el Área Metropolitana, Paraguay" en el Centro de Estudios Multidisciplinarios de Investigaciones Tecnológicas (CEMIT) de la Universidad Nacional de Asunción (UNA).

A UNIGRAS, por haberme brindado la oportunidad de trabajar en sus instalaciones, conocer gente nueva, ampliar mis conocimientos y por haber sembrado en mí el interés de continuar haciendo investigación.

Y, por último, pero no menos importante, quiero agradecer, en memoria al Dr. Ernesto Moreno Martínez, por ser pionero y fundador de la Unidad de Investigación de Granos y Semillas (UNIGRAS), dando origen a la investigación de las micotoxinas a nivel nacional.

"Mientras nosotros sigamos trabajando con las aflatoxinas usted vivirá".



Un ingeniero agrícola no solo se encuentra en el campo, también nos encontramos en el laboratorio estudiando aquellos hongos poscosecha productores de toxinas.



ASUNTO: VOTO APROBATORIO

asatiro de Sansaca

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN PRESENTE

> ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA Jefa del Departamento de Titulación de la FES Guautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de Tesis.** 

Determinación de aflatoxinas en cereales de consumo infantil comercializados en Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx.

Que presenta la pasante: Jesica Abigali Reyes Pérez

Con número de cuenta: 313350702 para obtener el título de: Ingeniera Agrícola

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

#### **ATENTAMENTE**

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 15 de Febrero de 2021.

#### PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Rosa Navarrete Maya	Rueu
VOCAL	Dr. Alejandro Espinosa Calderón	
SECRETARIO	Dra. Martha Yolanda Quezada Viay	
1er. SUPLENTE	Ing. Priscila Anaid Rivera Cruz	
2do. SUPLENTE	Ing. Jonathan Alfredo Fernández Mendiola	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).



VNIVERADAD NACIONAL AVPOMA DE MEXICO

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

MERCHANICAL STREET

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA

Jefa del Departamento de Titulación
de la Fres Cirautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de Tesis**.

Determinación de aflatoxinas en cereales de consumo infantil comercializados en Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx.

Que presenta la pasante: Jesica Abigali Reyes Pérez

Con número de cuenta: 313350702 para obtener el título de: Ingeniera Agrícola

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

#### **ATENTAMENTE**

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 15 de Febrero de 2021.

### PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Rosa Navarrete Maya	· · ·
VOCAL	Dr. Alejandro Espinosa Calderón	Nega Enel
SECRETARIO	Dra. Martha Yolanda Quezada Viay	
1er. SUPLENTE	Ing. Priscila Anaid Rivera Cruz	
2do. SUPLENTE	Ing. Jonathan Alfredo Fernández Mendiola	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).



ASUNTO: VOTO APROBATORIO

asatiro de Sansaca

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN PRESENTE

> ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA Jefa del Departamento de Titulación de la FES Guautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de Tesis.** 

Determinación de aflatoxinas en cereales de consumo infantil comercializados en Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx.

Que presenta la pasante: Jesica Abigali Reyes Pérez

Con número de cuenta: 313350702 para obtener el título de: Ingeniera Agrícola

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

#### **ATENTAMENTE**

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 15 de Febrero de 2021.

#### PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Rosa Navarrete Maya	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·
VOCAL	Dr. Alejandro Espinosa Calderón	
SECRETARIO	Dra. Martha Yolanda Quezada Viay	Myster.
1er. SUPLENTE	Ing. Priscila Anaid Rivera Cruz	
2do. SUPLENTE	Ing. Jonathan Alfredo Fernández Mendiola	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).



ASUNTO: VOTO APROBATORIO

ACMIL O DA STORAGA

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA

Jefa del Departamento de Titulación

de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de Tesis**.

Determinación de aflatoxinas en cereales de consumo infantil comercializados en Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx.

Que presenta la pasante: Jesica Abigali Reyes Pérez

Con número de cuenta: 313350702 para obtener el título de: Ingeniera Agrícola

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

#### ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 15 de Febrero de 2021.

#### PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Rosa Navarrete Maya	· · ·
VOCAL	Dr. Alejandro Espinosa Calderón	
SECRETARIO	Dra. Martha Yolanda Quezada Viay	
1er. SUPLENTE	Ing. Priscila Anaid Rivera Cruz	Jan Jan
2do. SUPLENTE	Ing. Jonathan Alfredo Fernández Mendiola	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).



ASUNTO: VOTO APROBATORIO

A SHE ME SEE SEE SHEET A

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA

Jefa del Departamento de Titulación

de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de Tesis.** 

Determinación de aflatoxinas en cereales de consumo infantil comercializados en Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx.

Que presenta la pasante: Jesica Abigali Reyes Pérez

Con número de cuenta: 313350702 para obtener el título de: Ingeniera Agrícola

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

#### **ATENTAMENTE**

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 15 de Febrero de 2021.

#### PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Rosa Navarrete Maya	
VOCAL	Dr. Alejandro Espinosa Calderón	
SECRETARIO	Dra. Martha Yolanda Quezada Viay	
1er. SUPLENTE	Ing. Priscila Anaid Rivera Cruz	
2do. SUPLENTE	Ing. Jonathan Alfredo Fernández Mendiola	- Alake

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

#### **INDICE**

1)	RE	SUMEN	13
2)	IN	TRODUCCIÓN	13
3)	JU	STIFICACIÓN	15
4)	MA	ARCO TEÓRICO	17
	a)	CARACTERÍSTICAS DE LOS CEREALES	17
		Arroz (Oryza sativa L.)	18
		Trigo (Triticum vulgare L. y T. durum L.)	19
		Maíz (Zea mays L.)	20
		Avena (Avena sativa L.)	21
	b)	ANATOMÍA DEL GRANO	22
	c)	PROCESOS DE PRODUCCIÓN DE CEREALES PARA DESAYUNO	23
		PROCESO CLÁSICO	24
		PROCESO MODERNO (EXTRUSIÓN)	26
	d)	EMPAQUETADO Y DISTRIBUCIÓN	26
	e)	MEDIOS DE COMERCIALIZACIÓN DE LOS CEREALES	27
	f)	DAÑOS FITOSANITARIOS EN LA CADENA DE PRODUCCIÓN	28
	g)	MICOTOXINAS	30
		Clasificación	31
	h)	AFLATOXINAS	32
		Estructura y propiedades	33
		Mecanismo de acción de las aflatoxinas	34
	i)	TOXICIDAD	34
	j)	HONGOS PRODUCTORES DE AFLATOXINAS	35
	k)	MÉTODOS DE DETECCIÓN DE AFLATOXINAS	38
		PRUEBAS PRESUNTIVAS	38
		PRUEBAS RÁPIDAS	39
		PRUEBAS ANALÍTICAS	39
	1)	LEGISLACIÓN	40
5)	OB	BJETIVOS	42
	m)	OBJETIVO GENERAL	42
	n)	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	42
		PÓTESIS	42

7)	MF	ETODOLOGÍA	42
	o)	RECOLECCIÓN DE MUESTRAS	42
	p)	ETIQUETADO Y LISTADO DE MUESTRAS	43
	q)	DETERMINACIÓN DE AFLATOXINAS	46
		Preparación de muestras y extracción de aflatoxinas	47
		Purificación de aflatoxinas	47
		Cuantificación de aflatoxinas	48
	r)	DETERMINACIÓN DE MICOBIOTA	49
		Preparación e inoculación sobre placas Petrifilm	50
		Incubación	50
		Interpretación	50
		Identificación de la micobiota	51
8)	AN	NÁLISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN	53
	s)	Determinación de aflatoxinas	53
	t)	Determinación de AF en cereales de marcas registradas	55
	u)	Concentración de AF en las muestras por marca comercial	59
	v)	Determinación de AF en cereales de venta a granel	60
	w)	Concentración de AF por tipo de cereal de elaboración	61
	x)	Determinación de micobiota	64
9)	CC	ONCLUSIONES	69
10	BI	BLIOGRAFÍA	70

#### INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Especies fúngicas productoras de micotoxinas de importancia biológica y económica en humanos, animales y agricultura31
Tabla 2. Cantidades máximas de AF permisibles a nivel internacional
Tabla 3. Listado de muestras por características del producto
Tabla 4. Listado de muestras evaluadas por lugar de procedencia
Tabla 5. Características para identificación de levaduras y mohos
Tabla 6. Concentración de aflatoxinas en las muestras que resultaron positivas para AF. y sus concentraciones
Tabla 7. Concentración de aflatoxinas en los productos registrados bajo marca comercial que son distribuidos en empaque en los supermercados
Tabla 8. Concentración de aflatoxinas en los productos de venta a granel en Cuautitlán Izcalli, Edo. de México
Tabla 9. Muestras de cereales de desayuno clasificadas de acuerdo a su marca comercial
Tabla 10. Muestras de marcas comerciales analizadas por tipo de cereal y su concentración de AF

#### INDICE DE FIGURAS

Figura 1 Esquema de los principales granos y sus partes
Figura 2 Diagrama del proceso clásico de producción de cereales de desayuno 24
Figura 3 Estructuras características de los 4 principales hongos productores de micotoxinas
Figura 4 Estructura molecular de la aflatoxina B1
Figura 5 Estructuras morfológicas del género <i>Aspergillus</i> vista al microscopio a 400x
Figura 6 Conidióforos de A. flavus y A parasiticus, vista en microscopio a 400x 38
Figura 7 Fotos ilustrativas de los lugares de procedencia de las muestras colectadas. 43
Figura 8 Muestras de cereales de marcas comerciales
Figura 9 Muestras de cereales de venta a granel
Figura 10 Preparación de muestras
Figura 11 Proceso de extracción de aflatoxinas
Figura 12 Proceso de cuantificación de AF
Figura 13 Placas 3M <sup>TM</sup> Petrifilm <sup>TM</sup>
Figura 14 Detección de hongos en placas Petrifilm
Figura 15 Siembra de muestras en MSA
Figura 16 Preparación de muestras para identificación morfológica
Figura 17 Diferentes imágenes de <i>Penicillium spp</i>
Figura 18 Diferentes imágenes de <i>Mucor spp</i>
Figura 19 Diferentes imágenes de <i>Cladosporium sp</i>
Figura 20 Diferentes imágenes de <i>Rhizopus sp.</i>
Figura 21 Diferentes imágenes de Aspergillus Sec. Nigri
Figura 22 Porcentaje y número de muestras contaminadas con hongos en cada grupo de productos analizados.



#### **RESUMEN**

En el presente trabajo de investigación se determinó la concentración de aflatoxinas (AF) en dos tipos de cereales de desayuno: cereales de venta comercial y de venta a granel. Como parte de la metodología se empleó el uso de columnas de anticuerpos monoclonales para determinación de AF y placas Petrifilm 3M para determinación y cuantificación de colonias fúngicas. Como resultado se obtuvo que en ambos tipos de muestras se reportó presencia de aflatoxinas, sin embargo, en las muestras de venta a granel se encontró la mayor concentración. En la prueba de micobiota no se reportaron hongos productores de aflatoxinas: *A. flavus y A. parasiticus* por lo que se confirma que las aflatoxinas pueden encontrarse en el producto aun cuando el hongo está ausente.

#### **INTRODUCCIÓN**

Las micotoxinas son metabolitos secundarios tóxicos y de los contaminantes más importantes que deben ser controlados para proteger la salud pública en todo el mundo. La FAO estima que los hongos productores de micotoxinas afectan a una cuarta parte de los cultivos a nivel mundial y que alrededor de 1 millón de toneladas de productos alimenticios se pierden al año por esta causa (FAO, 2019).

La contaminación con micotoxinas en los granos generalmente es un proceso aditivo; puede iniciarse en el campo, aumentar durante la cosecha y operaciones de secado y continuar acumulándose durante el almacenamiento (Bogantes *et al.*, 2004). Actualmente, más de 400 toxinas producidas por 350 especies de hongos han sido aisladas y caracterizadas; de éstas, las investigaciones se han enfocado en aquellas que causan daños significativos a humanos y animales (Brase *et al.*, 2009). Los efectos de dichas toxinas cuestan millones de dólares anualmente en pérdidas a nivel mundial en salud humana, animal y productos agrícolas (Vasanthi y Bhat, 1998).

Las micotoxinas de gran importancia en salud pública son: aflatoxinas, tricotecenos, fumonisinas, ocratoxinas y zearalenona (Abrunhosa *et al.*, 2014). Donde las aflatoxinas son de las de mayor importancia dado su grado de toxicidad.



Las aflatoxinas son un grupo de aproximadamente 20 compuestos, producidos por especies del género *Aspergillus*, entre ellos *A. flavus* y *A. parasiticus*. Las toxinas se localizan en el micelio o en las esporas de estos hongos, o bien, también pueden ser excretadas (exotoxinas) que se liberan en el medio donde éste crece. Existen cuatro aflatoxinas principales, conocidas como AFB1, AFB2, AFG1 y AFG2. La aflatoxina B1 es la más tóxica de todas, se ha correlacionado el consumo de alimento contaminado con estas toxinas y el desarrollo de carcinoma hepatocelular en humanos y en una amplia variedad de especies animales (Richard, 2007; Wu *et al.*, 2014). La exposición a aflatoxinas (dosis-dependiente) también ha sido relacionada con el retraso en el crecimiento infantil, una condición en la cual la altura de los niños está por debajo de la referencia de crecimiento establecida por la Organización Mundial de la Salud (WHO-IARC, 1993). Este tipo de estudio es importante desde el punto de vista de salud pública, debido a que se ha asociado la intoxicación infantil con vulnerabilidad a enfermedades infecciosas y deficiencias en el aprendizaje (Khlangwiset *et al.*, 2011).

La contaminación por aflatoxinas llega a nuestros alimentos mediante dos vías, las cuales son: los alimentos sin procesar (cereales, semillas oleaginosas, frutas, frutos secos, etc.) y los alimentos que deben ser procesados (productos derivados de cereales; pan, pasta, cereales de desayuno, etc.). Las micotoxinas en general son compuestos termoestables, pueden alcanzar los 300°C sin sufrir daños en su composición, y dada esta característica resisten las altas temperaturas de los procesos de elaboración de diversos productos que se encuentran en el mercado, entrando así en la cadena alimentaria (Soriano, 2007).

La industria alimentaria ofrece una amplia gama de alimentos, donde los cereales de desayuno forman parte de la primera comida del día de niños en todo el mundo por ser un alimento versátil, que puede encontrarse de distintas formas y sabores, siendo destinado para satisfacer los gustos y necesidades de los consumidores de cualquier edad.

Se define como cereales de desayuno a los cereales en hojuelas o expandidos, elaborados a base de granos de cereales sanos, limpios y de buena calidad (AEFC, 2010).



Dichos cereales de desayuno se obtienen a partir de la harina de cereales en lugar de utilizar el cereal en grano. Las materias primas más utilizadas para su elaboración son el trigo, maíz, arroz, avena, cebada y otros cereales comestibles, ya sean enteros o en trozos, de los cuales el maíz, arroz y trigo están mayormente contaminados por aflatoxinas (AEFC, 2010).

Los cereales de desayuno se venden principalmente mediante cadenas comerciales las cuales ofrecen que el producto cuente con un empaque y registro, sin embargo, estos productos también son comercializados a granel. La venta de un producto a granel se caracteriza por no contar con un empaque propio que lo proteja y del cual escasamente se toman las consideraciones pertinentes para su cuidado, es por ello que tienen una mayor susceptibilidad a la contaminación, lo cual es causante de que la calidad de este producto se vea disminuida.

#### **IUSTIFICACIÓN**

La contaminación de los granos básicos por hongos productores de aflatoxinas es principalmente causada por su mal manejo poscosecha. Entre los granos básicos se encuentran el maíz, arroz, trigo y avena, con los cuales se lleva a cabo la elaboración de cereales de desayuno para alimentar a la población infantil de México.

Los centros de abastecimiento para este producto son principalmente las cadenas comerciales, las cuales se encuentran bajo el registro de alguna marca y ofrecen el producto debidamente empacado e inocuo y con sus especificaciones de contenido de acuerdo con las normas vigentes; sin embargo, por otro lado también puede obtenerse de la venta a granel, ésta llevada a cabo en puntos de venta como materias primas, dulcerías, mercados o tiendas de abarrotes, lugares en que se le tiene poco manejo sanitario y no tan buenas condiciones de almacenamiento por lo que están expuestos a una mayor contaminación microbiológica, lo cual puede desencadenar el crecimiento de patógenos poniendo en riesgo la salud del consumidor.

Otra característica propia de las aflatoxinas es su acumulación en el organismo, en el cual, el órgano mayormente dañado es el hígado, dado que las aflatoxinas son acumulables y que éstas no pueden ser eliminadas, hay un mayor riesgo en la población infantil si su alimentación es basada en productos que pudieran estar contaminados aún con bajas dosis de aflatoxinas, lo cual a largo plazo puede tener graves consecuencias a su salud.

La exposición crónica a las aflatoxinas tiene varias consecuencias, y como se ha mencionado anteriormente, las aflatoxinas son carcinógenos potentes que pueden afectar a cualquier órgano o sistema, y especialmente al hígado y el riñón; son causa de cáncer hepático y se han relacionado con otros tipos de cáncer, así mismo, son mutágenas (afectan al DNA) y pueden causar defectos congénitos en niños. Del mismo modo, los niños pueden sufrir retraso del crecimiento, aunque estos últimos datos todavía están por confirmar, puesto que hay otros factores que pueden contribuir al retraso del crecimiento como la malnutrición (OMS, 2018).

En México las aflatoxinas son las únicas micotoxinas con regulación y se encuentran bajo las siguientes normativas: NOM-188-SSA1-2002, (Productos y Servicios. Control de aflatoxinas en cereales para consumo humano y animal, especificaciones sanitarias); y la NOM-247-SSA1-2008, (Productos y servicios. Cereales y sus productos), en las cuales se establece un límite máximo de 20 μg/kg de aflatoxinas totales (AFT), respectivamente.

A pesar de contar con estas normas de apoyo, es poca la investigación realizada sobre el tema, siendo aún menor si se tratase de presencia de aflatoxinas en productos ya elaborados, por lo cual se realizó este trabajo de investigación cuya finalidad fue determinar la concentración de aflatoxinas persistentes en los cereales de desayuno y evaluar si la procedencia de éstos influye en su inocuidad, para de este modo contribuir a su aseguramiento y poder tomar desde campo y durante el periodo poscosecha las medidas necesarias para evitar y/o reducir la contaminación de la materia prima, por hongos productores de aflatoxinas y con ello evitar que éstas lleguen a ser consumidas por la población y evitar daños a la salud de los consumidores.



#### MARCO TEÓRICO

#### CARACTERÍSTICAS DE LOS CEREALES

Los cereales son parte del grupo de especies alimentarias más importante del mundo, se podrían definir como los frutos secos, enteros y sanos de la familia de las gramíneas, pudiéndose incluir a esta definición algunos pseudocereales (como el amaranto).

Se considera como gramíneas a las plantas monocotiledóneas, de tallos cilíndricos, huecos, con nudos, hojas alternas y largas, con flores en espiga y granos secos, su fruto consta de una cariopse, que se define como fruto seco indehiscente, con una semilla en la cual las paredes del ovario (pericarpio) y la testa, están estrechamente unidas siendo inseparables. Esta cubierta encierra al embrión y al endospermo (Whyte, 1964).

La palabra cereal deriva de "Ceres" diosa griega de la alimentación, ya que constituyen la fuente de energía alimenticia más económica del mundo, y proporcionan las dos terceras partes o más de la energía humana y de la aportación de proteínas (LABIFIGRAS, 2013). Los cereales contienen almidón, lípidos, celulosa, gluten y distintas proteínas, todos estos componentes son básicos en la alimentación humana. Desde la antigüedad, la humanidad ha aprovechado probablemente el fruto de las gramíneas durante más de 10 mil años.

Los principales cereales que México produce son: trigo, maíz, avena, arroz, amaranto, soya y centeno. Constituyen un producto básico de la dieta en México y en la mayor parte del mundo, por sus características nutritivas, su costo moderado y su capacidad para provocar saciedad inmediata. Además, su preparación agroindustrial y tratamiento culinario son relativamente de gran versatilidad. En nuestra sociedad la forma de consumo de los cereales es muy variada; pan, pastas, botanas o cereales para el desayuno, entre otros. Los más utilizados en la alimentación humana son el trigo, el arroz, el maíz y la avena (Martínez, 2016). El trigo y el arroz son destinados prácticamente en forma exclusiva a la alimentación humana, en tanto que, en maíz, una parte importante de su superficie cultivada se destina a la alimentación animal.



#### Arroz (Oryza sativa L.)

El arroz es el cereal más extendido por el mundo, se cultiva ampliamente en los cinco continentes, es de importancia fundamental para la mitad de la población mundial; es el grano alimenticio más importante en la dieta de por lo menos 2,900 millones de personas en Asia, África y América Latina, y sin duda continuará siendo fuente primaria de alimentación en el futuro. En México, el arroz es uno de los principales cultivos que fueron introducidos con el arribo de las migraciones de europeos, hacia finales del Siglo XV y principios del XVI. Su consumo per cápita es de 8.7 Kg (SIAP, 2019).

Tras su introducción en el país, este grano básico fue ganando importancia en la dieta alimenticia de la población, y en la actualidad ocupa el tercer lugar en cuanto a superficie y producción después de maíz y trigo.

#### Producción mundial y nacional

El arroz es el alimento básico predominante para 17 países de Asia y el Pacífico, nueve países de América del Norte y del Sur y ocho países de África. La producción a nivel mundial es de 495 millones de toneladas, de las cuales, más del 30% se producen en China (SIAP, 2019).

En México los principales estados productores en el ciclo Primavera-Verano son: Campeche, Nayarit, Michoacán, Veracruz y Colima; mientras que en el Otoño-Invierno son: Nayarit y Campeche (SIAP, 2019).

Campeche se constituye como el principal estado productor, pues aporta 88,659 toneladas de este grano, seguido por Nayarit con 76,858 ton y Michoacán con 31,414 ton (SIAP, 2019).



#### Trigo (*Triticum vulgare* L. y *T. durum* L.)

La palabra trigo proviene del vocablo latino *triticum*, que significa quebrado, triturado o trillado, haciendo referencia a la actividad que se debe realizar para separar el grano de trigo de la cascarilla que lo recubre (RAE, 2019).

El trigo (de color amarillo) es uno de los tres granos más ampliamente producidos a nivel global, junto al maíz y el arroz, y el más ampliamente consumido por el hombre en la civilización occidental desde la antigüedad. Según la FAO, el consumo per cápita mundial de trigo es el más alto de los cereales, con 67.2 kg anuales en el 2018 (Juárez, 2019). Los países con el consumo per cápita más alto son Turquía (209.7 kg), Egipto (186.2 kg) e Irán (166.4 kg). México se ubica por debajo del consumo per cápita mundial con 56.1 kg anuales (SIAP, 2019).

El grano del trigo es utilizado para hacer harina, harina integral, sémola, cerveza y una gran variedad de productos y derivados alimenticios. Del trigo se obtiene harina blanca que procede del trigo blando (*Triticum vulgare*) y la sémola procedente del trigo duro (*Triticum durum*). La diferencia entre el trigo duro y blando reside en el endospermo, que es la parte interior de la semilla. En las variedades de trigo blando, los gránulos de almidón están unidos menos estrechamente a la matriz de la proteína que los trigos duros. Esto se debe aparentemente a la friabilina, pequeña proteína presente en el trigo blando (Pérez, 2015).

#### Producción mundial y nacional

Este grano se ubica en el primer sitio en superficie cosechada y volumen comercializado en el mercado internacional, mientras que, en producción, se ubica en el segundo sitio, sólo después del maíz. Durante el ciclo comercial 2018/19 (julio del 2018 a junio del 2019), se cosecharon 215.3 millones de hectáreas de trigo en el mundo, con una producción de 730.5 millones de toneladas, de acuerdo con el Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA).

Del total de la producción mundial, 67.2% se cosechó en los cinco principales productores: Unión Europea (18.7%), China (18.0%), India (13.7%), Rusia (9.8%) y Estados Unidos (7%). México participa con 1.0% (Juárez, 2019).

A nivel nacional en el año 2019 se tuvo una producción de 2,943,445 ton, de las cuales el 49% fueron producidas en Sonora, principal estado productor, seguido por Guanajuato y Baja California con 12% y 9% respectivamente (SIAP, 2019).

#### Maíz (Zea mays L.)

El maíz es, sin duda, parte de la identidad de México, fue un alimento importante entre las grandes civilizaciones azteca y maya, mucho antes de la llegada de Colón y los colonizadores, con base en diversos hallazgos, como cerámica y lítica principalmente, así como el estudio de sedimentos y depósitos de restos vegetales en contextos arqueológicos, se cree que el maíz fue domesticado hace aproximadamente 8, 000 años (Benz, 1997). El maíz, es una especie monocotiledónea anual, perteneciente a la familia de las Poáceas (Gramíneas). A diferencia de los demás cereales, es una especie monoica, lo que significa que sus inflorescencias, masculina y femenina, se ubican separadas dentro de una misma planta; esto determina además que su polinización sea fundamentalmente cruzada (Maroto, 1998).

El maíz forma parte de la vida cotidiana de los mexicanos, no sólo en tortillas y platillos típicos, sino también en muchos productos derivados de su industrialización. El consumo per cápita de este grano es de 345.6 kg (SIAP, 2019). El maíz es utilizado tanto en alimentación humana como animal, pudiendo obtenerse numerosos productos a partir de las distintas variedades botánicas cultivadas.

#### Producción mundial y nacional

De acuerdo con el USDA, durante el ciclo 2018/19 los cinco principales países productores concentraron 74.8 por ciento de la producción mundial: Estados Unidos (32.6%), China (22.9%, Brasil (9.0%), Unión Europea (5.7 %) y Argentina (4.5%). México ocupó el séptimo sitio, con 2.5% de la producción mundial (USDA, 2019).



A nivel nacional, se tiene una producción de 27, 169, 400 ton de grano de maíz, donde Sinaloa se encuentra como el principal estado productor con 21%, seguido por Jalisco 14% y Michoacán 7% (SIAP, 2019).

#### Avena (Avena sativa L.)

Los escritos antiguos indican que la avena ya existía en Asia entre 900 a 500 a. de C. Fue introducida a México en el presente siglo a finales de los años veinte por la comunidad de los menonitas, un grupo religioso dedicado fundamentalmente a la agricultura en el norte del país (ASERCA, 1995).

La avena contiene la más alta concentración de proteínas en relación con los granos que más se producen en el mundo. Esto aunado a su excelente distribución de aminoácidos la convierten en un alimento de muy alto valor nutritivo (QUAKER, 2015).

En la industria alimenticia la avena se utiliza primordialmente en cereales y como salvado por su doble contenido de fibra en comparación con la harina común. En productos para hornear se usa por sus propiedades de retención de humedad que mantienen más fresco y durante mayor tiempo el producto, mejorando la consistencia del mismo. Los alimentos para niños contienen altas porciones de avena. El consumo per cápita de este grano es de 2.6 kg (SIAP, 2019).

#### Producción mundial y nacional

En la producción mundial los volúmenes producidos de avena en la temporada 2018/19 alcanzaron 23.3 millones de toneladas, según las estimaciones del USDA (2019). La Unión Europea tuvo una aportación del 35.6% de la producción de este grano, mientras que en países individuales los más importantes fueron Rusia (20,6%), Canadá (14,8%), Australia y EE. UU. con 4.7% y 4.1%, respectivamente. México se encuentra en la posición número 16 de producción con un total de 99,305 ton (Larraín, 2018).

A nivel nacional se producen 99,305 ton, Chihuahua se encuentra como el primer estado productor de avena con el 54%, seguido por el estado de México 27% e Hidalgo 3% (SIAP, 2019).



#### ANATOMÍA DEL GRANO

Aunque la forma y el tamaño de las semillas pueden ser diferentes, los granos de los diferentes cereales tienen una estructura y valor nutritivo similar; constan de tres estructuras físicas fundamentales: el pericarpio, cáscara, testa o salvado; el endospermo y germen o embrión (Sánchez, 2019).

#### **❖** EMBRIÓN

Es el componente más pequeño del grano, representa solo el 2% o 3% de su tamaño y es el principal responsable de la germinación de la semilla. La plántula se compone a su vez de la plúmula u hojas embrionarias, la radícula o raíz embrionaria primaria y el cotiledón (figura 1) (Llach, 2018).

#### **❖** ENDOSPERMO

Representa cerca del 83% del grano, constituye la reserva de alimento de una semilla, habitualmente es almidón. También se denomina albumen. Sus principales componentes son los carbohidratos y las proteínas, pero también contiene vitaminas, minerales y fibra soluble. La harina refinada se compone principalmente de endospermo, en parte porque es el mayor componente del grano y también por su alto contenido de almidón (figura 1) (Llach, 2018).

#### **❖** CUBIERTA O TESTA

Representa cerca del 13% - 15% del grano. Es el conjunto de capas que cubren el interior del grano, concretamente al endospermo y al germen. Estas capas tienen funciones vitales para la protección del grano durante las fases vegetativas de la planta. Protege al grano contra los insectos, el clima, enfermedades, entre otros (figura 1) (Llach, 2018).

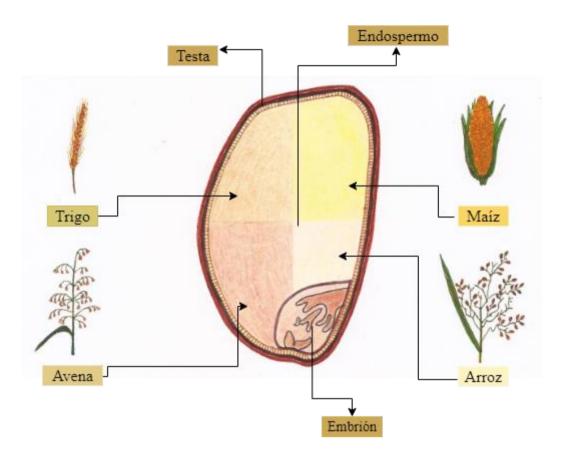


Figura 1.- Esquema de los principales granos y sus partes

Fuente: Esquema elaborado por Karen I. Hidalgo Téllez, 2020. Edición propia.

#### PROCESOS DE PRODUCCIÓN DE CEREALES PARA DESAYUNO

En primer lugar, se lleva a cabo la recolección de los cereales cultivados. A pesar de que el grano se cosecha generalmente una vez al año (dos en algunas zonas tropicales), los cereales se consumen durante todo el año, por lo que ha de ser almacenado durante largos períodos de tiempo. El almacenamiento en grandes estructuras de hormigón o metal llamadas silos es, hoy en día, el sistema más generalizado. Una vez recolectado y tras su almacenamiento, el grano de cereal se somete a una serie de operaciones de limpieza y acondicionamiento para posteriormente ser procesado (AEFC, 2011).

Los procesos para la fabricación de los cereales de desayuno se pueden dividir en dos grandes tipos, los métodos clásicos, que no usan extrusores, o los métodos modernos, que sí los utilizan.



En los métodos clásicos la homogeneización y cocción de la masa tiene lugar en un equipo independiente, aunque se utilicen luego extrusores de rodillo para dar al producto su forma final, y algún otro procedimiento, como la fritura o el secado/tostado, para provocar la expansión o retirar la humedad del producto. Por su parte, en los métodos modernos, tanto la cocción como el moldeado del producto tienen lugar en el propio extrusor (Guy, 2002).

#### PROCESO CLÁSICO

El proceso clásico parte de los granos crudos, y consta de las etapas que se sintetizan en el siguiente diagrama:

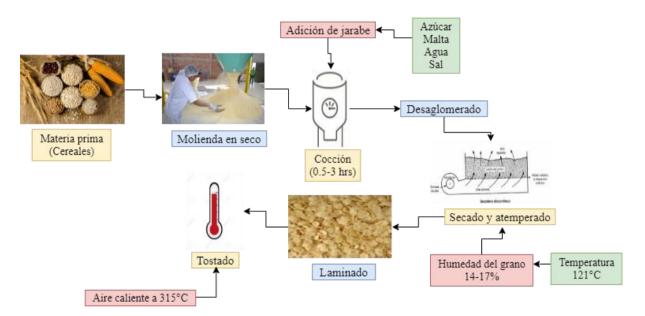


Figura 2.- Diagrama del proceso clásico de producción de cereales de desayuno.

Fuente: Elaboración propia.

#### Etapas de producción

A continuación, se describe el proceso de producción de los cereales de desayuno (figura 2):

#### a) Molienda en seco

En la primera etapa el grano procedente directamente del campo o almacén, donde se obtiene ya parcialmente seco, se somete a una molienda en seco cuyos objetivos son retirar el germen, así como la cáscara que ocasiona problemas durante el laminado. Cada uno de estos granos dará lugar a un copo, una vez laminado.

#### b) Cocción

Se lleva a cabo en un licor que contiene agua y otros componentes que son muy importantes para el desarrollo del sabor, como son azúcares, jarabe de malta y sal. El jarabe de malta contiene azúcares, proteínas y aminoácidos que provocan reacciones de pardeamiento no enzimático, fundamentales en el desarrollo del sabor de las hojuelas. Para la cocción se usan tanques rotatorios horizontales, construidos de acero inoxidable y aislado, a los que se adiciona vapor axialmente.

#### c) Desaglomerado

A la salida del tanque de cocción es frecuente que algunos granos se hayan aglomerado, por lo que se hace necesario separarlos. El desaglomerado se lleva a cabo mediante inyección de aire, que seca la superficie de los granos.

#### d) Secado

El grano cocido presenta un contenido en humedad de 28–34%, demasiado alto para ser laminados, por lo que es necesario reducirlo al 14–17%. Para ello se usan secadores con aire caliente (121°C). Es muy importante que en esta etapa no se tueste la superficie del grano, por lo que hay que vigilar cuidadosamente los parámetros del proceso. A la salida del secadero se enfrían los granos a temperatura ambiente, para proceder al atemperado.

#### e) Atemperado

Este consiste básicamente dejar los granos reposar para que se equilibre completamente la humedad interior y exterior de los granos. Durante esta etapa se produce también una cierta retrogradación del almidón que es básica para un correcto laminado.

#### f) Laminado

El laminado se lleva a cabo en cintas u otros transportadores a muy baja velocidad, de forma que, a la salida, ya haya pasado el tiempo necesario, que va desde 3 a 24 h, en función del secador utilizado.

Un laminador consta básicamente de dos rodillos o cilindros metálicos que giran en sentido opuesto, uno hacia el otro, haciendo que los granos pasen por su espacio intermedio, que es regulable. El interior de los rodillos es hueco, lo que permite pasar agua para refrigerar la superficie, que se suele calentar por la presión de los granos. Una vez formados, vía transporte neumático, los copos son conducidos a una criba en la que se separan los que tienen un tamaño no deseado, mientras que el resto de los copos es conducido a un horno para proceder al tostado de estos (Guy, 2002).



#### g) Tostado

El tostador puede ser un tambor rotativo que trabaja con aire caliente. La temperatura máxima del aire es de 315°C, lo que produce la formación de burbujas en la superficie de los copos y proporciona el color dorado característico, además de provocar reacciones de caramelización que contribuyen al sabor de los productos. A la salida del tostado es posible añadir vitaminas, que no habrían resistido las altas temperaturas del proceso de producción, así como azúcar o aromas, lo que se hace pulverizando sobre los copos la solución que los contiene. Ya sólo resta el empaquetado, que es una parte esencial del proceso para permitir la conservación de las propiedades del producto durante su almacenamiento (Guy, 2002).

#### PROCESO MODERNO (EXTRUSIÓN)

La extrusión es un proceso que combina diversas operaciones unitarias como el mezclado, la cocción, el amasado y el moldeo. El objetivo principal de la extrusión consiste en ampliar la variedad de los alimentos que componen la dieta elaborando a partir de ingredientes básicos, alimentos de distinta forma, textura y color (Fellows, 1994).

En este proceso no se parte de granos limpios como en el caso anterior, sino de harinas, las cuales son cocidas y moldeadas en un extrusor. La masa cocida es cortada a la salida del extrusor para formar unos pellets, que luego se atemperan y laminan, al igual que los granos en el proceso tradicional. Según las condiciones de trabajo en el interior del extrusor es posible desarrollar diferentes propiedades en el producto final. Así, por ejemplo, si la presión y la temperatura son altas en el troquel, la brusca descompresión a la salida, dará lugar a productos expandidos, (inflados).

Una importante ventaja de este proceso es que se pueden mezclar harinas de diversa procedencia, con lo que es posible obtener una mayor gama de productos y aprovechar harinas de diversas calidades (Guy, 2002).

#### EMPAQUETADO Y DISTRIBUCIÓN

Es la última fase del proceso, el producto es transportado a la envasadora, que lo introduce inicialmente en bolsas impermeables a la humedad ambiente, y luego en cajas.



La humedad óptima del empaque para conservar la textura y prolongar la vida de almacén es de 2%. Los envases y embalajes utilizados son generalmente de cartón, reciclado en la mayoría de los casos.

Las cajas son etiquetadas indicando la marca, el nombre y número de registro del fabricante, peso neto, peso bruto y día de producción, permitiendo su trazabilidad. De esta forma, queda constancia de la procedencia, los movimientos y procesos por los que pasa un determinado producto.

Tras el etiquetado, se procede al almacenaje y transporte, hasta llegar a los consumidores a través de los distintos puntos de venta (AEFC, 2011).

#### MEDIOS DE COMERCIALIZACIÓN DE LOS CEREALES

La producción de cereales de desayuno es principalmente llevada a cabo por compañías o firmas comerciales, entre las que destaca Kellogg´s, de origen norteamericano, a la cual le pertenecen diversas presentaciones de cereales como Corn Flakes, Zucaritas, Choco Krispis, entre otras.

Estas compañías deben seguir normativas de calidad donde se lleva a cabo la evaluación de la materia prima, procesos de elaboración, embalaje y etiquetado, con la finalidad de prever a los consumidores productos con la calidad e inocuidad pertinente. Su comercialización es principalmente en cadenas comerciales o tiendas de conveniencia.

Por otro lado, la comercialización de estos productos también es llevada a cabo mediante la venta a granel, la cual se define como la comercialización de un producto que no ha sido objeto de acondicionamiento previo y es medido o pesado en presencia del comprador (RAE, 2020).



Estos productos son conocidos por la población por no contar con un empaque y etiqueta de su contenido específico, así como su venta a grandes o pequeños volúmenes de acuerdo con la cantidad solicitada por el comprador. De igual manera, pocas veces se sabe sobre la procedencia de estos productos. Son comúnmente comercializados en establecimientos locales como dulcerías, tiendas de abarrotes, materias primas, etc., donde pocas veces son considerados los requerimientos óptimos de almacenamiento de estos productos, promoviendo la contaminación de estos al estar expuestos.

#### DAÑOS FITOSANITARIOS EN LA CADENA DE PRODUCCIÓN

La contaminación de los granos por hongos fitopatógenos genera pérdidas debidas a varias causas como la disminución del poder germinativo, decoloración de la semilla, calentamiento, alteraciones bioquímicas, posibilidad de producción de toxinas, y pérdida de materia seca.

La temperatura ideal para el crecimiento de la mayor parte de los hongos en los granos está entre los 25°C y los 26°C, en cuanto a la humedad relativa del aire, la germinación de las esporas varía entre el 65% y el 93%, dependiendo de la especie. Por lo tanto, para prevenir el crecimiento de los hongos, la humedad relativa del aire en el interior de la masa de granos, deberá ser menor que 65% y la temperatura, lo más baja posible, dentro de ciertos límites económicos y técnicos reales (FAO, 1993).

La contaminación puede ser iniciada en campo, donde en los últimos años las alteraciones climáticas han afectado la calidad de las cosechas, dado que hay variaciones climáticas y de precipitación se hace cada vez más complejo el control fitosanitario de los cultivos. La alta humedad relativa propicia el crecimiento de hongos fitopatógenos y estos pueden prevalecer en los granos al momento de la cosecha y almacenamiento (FONADE, 2013).

Los principales hongos de campo encontrados en los granos de los cereales son de los géneros *Cladosporium*, *Helminthosporium*, *Alternaria y Fusarium*. Causan la decoloración de los granos de los cereales, lo que a menudo se observa cuando los granos quedan expuestos a la excesiva humedad de la cosecha (FAO, 1993).

De igual modo la contaminación puede llevarse a cabo en el almacenamiento de los granos, esto bajo condiciones desfavorables de temperatura y humedad en donde las esporas de algunos hongos se mantienen presentes en los granos inclusive antes de la cosecha. Los daños causados por los hongos de almacén son mayores que los producidos por los hongos de campo (Christensen, 1974). Las condiciones del grano que propician a que ocurran daños por hongos en cuestiones de almacenamiento son la elevada humedad del grano, las condiciones físicas en que se encuentre el mismo (partido, sucio, etc.) y la cantidad que muestre de materias extrañas, así como de la presencia de organismos ajenos (Bolívar, 2007).

Ninguna especie de hongo se desarrolla a una humedad relativa (HR) inferior al 60%. Los hongos de la especie *Aspergillus*, la más resistente a ambientes secos, entre los hongos de granos almacenados, crece a 65% de HR. Como muchas especies se desarrollan a más del 70% de HR, un grano a 27°C estará expuesto a la invasión de hongos de almacén mientras el nivel de humedad esté por encima del 12.5 al 13.4% (Christensen, 1974).

Los métodos físicos para el control de los hongos de almacén son el mantenimiento de humedades y temperaturas lo más bajas posibles, en la masa de granos, dentro de márgenes razonables y económicos. La limpieza adecuada del producto al llegar al centro de acopio o almacenamiento es otra precaución indispensable para prevenir y controlar los hongos (FAO, 1993).

Una vez mencionado lo anterior, es justificable la alta posibilidad de adquirir materias primas contaminadas por hongos para la posterior elaboración de productos como los cereales para el desayuno.

Algunos de los hongos que prevalecen en los granos son productores de micotoxinas, las cuales poseen la propiedad de ser termoestables, característica que les brinda resistencia a las altas temperaturas de los procesos de transformación, quedando estas presentes aún en el producto terminado.



#### **MICOTOXINAS**

Las micotoxinas son metabolitos secundarios tóxicos producidos por ciertos hongos que contaminan los granos de cereales y otros productos agrícolas que son susceptibles a estos microorganismos. La palabra micotoxina deriva de las palabras griegas *Mikes*, hongo y *toxina*, veneno (Arrúa, 2009).

Los cereales, son contaminados por hongos antes y durante la cosecha o el almacenamiento. Actualmente, más de 400 toxinas producidas por 350 especies de hongos han sido aisladas y caracterizadas; de éstas, las investigaciones se han enfocado en aquellas que causan daños significativos a humanos y animales, siendo las más importantes desde el punto de vista de la seguridad alimentaria las toxinas producidas por hongos de los géneros *Aspergillus, Fusarium y Penicillium*, entre las que se encuentran las aflatoxinas, ocratoxina A, las fumonisinas y los tricotecenos (Brase *et al.*, 2009).

La presencia de estas micotoxinas puede darse de forma individual o simultánea con otras, lo que puede provocar efectos sinérgicos en el organismo aumentando su toxicidad (Soriano, 2007). A diferencia de los efectos negativos sobre la salud humana y animal, las funciones naturales de las micotoxinas no han sido claramente establecidas, pero se cree que participan en la eliminación de otros microorganismos que compiten en el mismo ambiente. Además, se piensa que ayudan a los hongos patógenos a invadir los tejidos del hospedero (Brase *et al.*, 2009). A pesar de que existen diferencias geográficas y climáticas en la producción y presencia de micotoxinas en los cultivos, la exposición a dichas sustancias ocurre a nivel mundial (Kuiper-Goodman, 2004).

Las enfermedades que causan las toxinas de los hongos son llamadas micotoxicosis (Bryden, 2012). Elevados niveles de micotoxinas en la dieta pueden causar efectos adversos agudos o crónicos sobre la salud del hombre y una gran variedad de especies animales, afectando a distintos órganos, aparatos o sistemas, especialmente al hígado, riñón, sistema nervioso, endocrino e inmunitario (Faustman *et al.*, 2005).



#### Clasificación

En general, las toxinas se clasifican de acuerdo con la especie fúngica de la que se aislaron, a su estructura química y al modo de acción. Sin embargo, una sola especie puede producir varias toxinas y una toxina puede ser producida por diferentes especies fúngicas (Fernández, et al., 1997; Zain, 2011). Las diferentes micotoxinas son producidas principalmente por cuatro géneros de hongos (Mycotoxin, 2019):



Figura 3.- Estructuras características de los 4 principales hongos productores de micotoxinas

Fuente: Mycotoxin, 2019. Edición propia.

Tabla 1. Especies fúngicas productoras de micotoxinas de importancia biológica y económica en humanos, animales y agricultura.

Micotoxina
Aflatoxinas (AF)
Tricotecenos
Fumonisinas (FUM)
Ocratoxina (OC)
Zearalenona (ZEN)

Fuente: Elaboración propia, con datos de ELIKA, 2018.



#### **AFLATOXINAS**

La palabra aflatoxina está conformada por 3 letras: A, por el género *Aspergillus*, fla, por la especie *flavus*, y *toxin*, que significa veneno (Ellis *et al.* 1991).

Estas toxinas son producidas por 2 principales especies de hongos: *A flavus* y *A parasiticus*; pueden localizarse en el micelio o en las esporas de los hongos, o pueden ser excretadas como exotoxinas que se liberan en el medio donde crece el hongo (Arrúa, 2009).

El término "aflatoxina" fue acuñado en Inglaterra en la década de 1960, cuando 100,000 pavos que fueron alimentados con harina de cacahuate contaminada con la micotoxina murieron a causa de una enfermedad desconocida que se denominó enfermedad "X" de los pavos (Blount, 1961). Posteriormente se confirmó la presencia de una toxina del hongo *Aspergillus flavus* en el extracto del medio de crecimiento, la cual mostró toxicidad en ratas y patos (Lancaster *et al.* 1961).

Las aflatoxinas contaminan cultivos básicos para la alimentación incluyendo los cereales, (principalmente el maíz, trigo, sorgo y arroz, así como en sus subproductos), causando trastornos agudos y crónicos sobre la población humana (Richard, 2007; Wu *et al.*, 2014).

La producción de aflatoxinas es favorecida tanto por factores que ocurren en campo como en almacén (Devreese *et al.*, 2013). En campo, la producción de aflatoxinas se incrementa con el estrés hídrico, las altas temperaturas y los daños a la planta hospedante producidos por insectos (Rodríguez *et al.*, 2010; Kebede *et al.*, 2012). Aunado a lo anterior, la incidencia de aflatoxinas se ve favorecida por el ataque de plagas que se desarrollan bajo condiciones específicas como la fecha de siembra, altas densidades de siembra y de incidencia de malezas (Rodríguez, 1996). En almacén, las condiciones de alta temperatura y humedad, aireación e inóculo primario proveniente del campo también son determinantes en el incremento de la síntesis de aflatoxinas en los granos (Hernández *et al.*, 2007).

De acuerdo con la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer, (International Agency for Research on Cancer IARC, 2012) se clasifican varias micotoxinas como carcinógenas o potencialmente carcinógenas para el hombre, siendo las aflatoxinas las que presentan un mayor riesgo como agentes carcinógenos. Dentro de las aflatoxinas se han identificado actualmente 18 compuestos, pero sólo las aflatoxinas B1 (AFB1), B2 (AFB2), G1 (AFG1), G2 (AFG2) y M1 (AFM1) se analizan rutinariamente, siendo la más peligrosa de todas la AFB1 (IARC, 2012). Las letras B y G se refieren a los colores azul (Blue) y verde (Green) de fluorescencia observados bajo la luz ultravioleta de onda larga, esta propiedad permite llevar a cabo la cuantificación por métodos fisicoquímicos, y los números se refieren a los patrones de separación de estos compuestos al utilizar cromatografía de capa fina (Moreno, 2004).

La producción de aflatoxinas se inicia durante la fase estacionaria del crecimiento del hongo. Al inicio del crecimiento del hongo la producción de aflatoxinas es baja o nula, pero a medida que los niveles de nitrógeno y fosfatos se reducen en el medio, el metabolismo primario se desorganiza produciéndose la acumulación de metabolitos primarios e iniciándose la producción de aflatoxinas (Arrúa, 2009; Yu *et al.*, 2002).

#### Estructura y propiedades

Químicamente las aflatoxinas son difuranocumarinas, estos compuestos que están conformados por anillos heterocíclicos, los furanos relacionados a la toxicidad y un anillo de lactona responsable de la fluorescencia bajo luz ultravioleta y el cual también hace que estos metabolitos sean susceptibles a la hidrólisis alcalina (Moreno, 2004; Lillehoj, 1983).

Cuando se encuentran en estado puro son termorresistentes, alcanzando sus puntos de fusión en temperaturas superiores a 250°C y se funden entre 190°C y 310°C; y rangos de pH entre 3 y 10. Son poco solubles en agua pudiendo ser extraídas con solventes orgánicos moderadamente polares (Arrúa, 2009). En la figura 4 se muestra la estructura molecular de la AFB1.



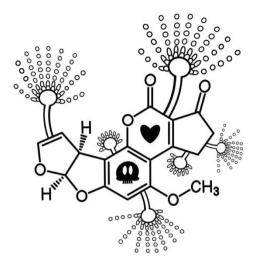


Figura 4.- Estructura molecular de la aflatoxina B1.

Fuente: Tracy, 2020.

#### Mecanismo de acción de las aflatoxinas

Las aflatoxinas ingeridas mediante los alimentos son absorbidas en la mucosa intestinal y pasan al torrente circulatorio, a través del cual llegan al hígado, riñones, canales biliares y sistema nervioso donde se acumulan.

La AFB<sub>1</sub>, es absorbida en el intestino delgado y es transportada por los glóbulos rojos y las proteínas hasta el hígado. La toxina entra en la célula y es metabolizada en el retículo endoplasmático para ser hidroxilada y transformarse en varios compuestos como aflatoxinas  $P_1$ ,  $M_1$ ,  $Q_1$ . También puede darse la formación de aflatoxina B1-8,9-epóxido que puede ser eliminado por la orina (Arrúa, 2009; Galtier, 1999).

#### **TOXICIDAD**

Los efectos tóxicos dependen de las dosis, duración de la ingestión, edad y del estado nutricional de la persona o animal. Las principales aflatoxicosis se han dado en países como India, China, Tailandia, África, Asia y algunas regiones de Sudamérica. En la población infantil se ha relacionado epidemiológicamente la presencia de aflatoxinas con ictericia neonatal, encefalopatía y degeneración de la grasa visceral (Peraica *et al.*, 1999).



Algunos de los efectos tóxicos que pueden generar las aflatoxinas en humanos son:

- Efectos mutagénicos los cuales se refieren a una alteración de la información genética lo cual incrementa la frecuencia de mutaciones.
- Efectos teratogénicos o bien defectos congénitos durante la gestación del feto, donde el embrión es más susceptible durante los primeros estadíos de la diferenciación morfológica.
- Efectos genotóxicos donde las sustancias genotóxicas pueden unirse directamente al ADN o actuar mediante la afectación de las enzimas involucradas en la replicación del ADN y causar mutaciones que pueden o no desembocar en un cáncer.
- ❖ Efecto inmunotóxico relacionado a todo aquello que dañe nuestro sistema inmune en donde pudieran no observarse patologías clínicas.
- Efecto carcinogénico donde los carcinógenos actúan interactuando con el ADN de una célula e induciendo mutaciones genéticas.

La aflatoxina B1 es considerada la más potente y con actividad carcinogénica, teratogénica y mutagénica, el órgano mayormente afectado es el hígado por lo que es considerada como una hepatotoxina.

#### HONGOS PRODUCTORES DE AFLATOXINAS

El género *Aspergillus* comprende alrededor de 180 especies. La mayoría de sus especies son hongos filamentosos saprófitos que desempeñan un papel esencial en la degradación de la materia orgánica. Su hábitat natural es el suelo donde sobreviven y se desarrollan sobre materia en descomposición. Este género es uno de los más abundantes en la naturaleza y puede encontrarse en cualquier ambiente. Para su crecimiento, *Aspergillus* requiere de una humedad relativa entre el 70 y 90 %, contenido de agua en la semilla entre 15 y 20 % y un rango de temperatura amplio (0 a 45 °C) (Klich, 2002).



Se reproducen asexualmente por conidios cuya germinación da origen a las hifas. El conidióforo característico de *Aspergillus*, aunque es una estructura unicelular posee tres partes bien diferenciadas: vesícula (extremo apical hinchada), estipe o conidióforo (sección cilíndrica situada debajo de la vesícula) y célula pie (sección final, a veces separada por un septo, que une el conidióforo con el micelio) (figura 5) (Moreno, 2004).

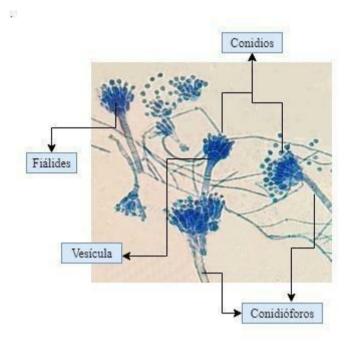


Figura 5.- Estructuras morfológicas del género Aspergillus vista al microscopio a 400x.

Fuente: Tracy, 2020. Edición propia.

Las enfermedades causadas en los cultivos, por hongos del género *Aspergillus* se presentan cuando el hongo se reproduce asexualmente (Méndez, 2015).

Los hongos de este género, tienen gran potencial biótico, son degradadores activos del material orgánico y en consecuencia muy útiles en la ecología del planeta. Sin embargo, causan enfermedades en el humano y animales por tres mecanismos diferentes (Cuenca, 2012):

- Hipersensibilidad: Esta puede ser congénita y en estos casos el hongo sólo actúa como lo harían otros antígenos ambientales, por ejemplo, polvo o pólenes ocasionando desde una rinitis alérgica, hasta un asma crónico severo.
- Invasión (micosis): Los hongos del género Aspergillus, son capaces de invadir porque producen diversas enzimas inducidas como lipasas y proteasas, elastasas o DNAsas. A pesar de la diversidad de substancias potencialmente patógenas, las infecciones humanas generalmente requieren de factores predisponentes
- Intoxicación por ingesta de metabolitos fúngicos (micotoxicosis): En estos casos, substancias como las aflatoxinas producidas durante el crecimiento de A. flavus y A. parasiticus cuando se desarrollan abundantemente sobre alimentos, puede causar daños a diversos órganos, aun cuando al momento de la ingesta, el hongo ya no esté presente. Se ha demostrado el potencial hepatotóxico y cancerígeno de muchos metabolitos como las aflatoxinas y ocratoxinas de diversas especies de Aspergillus.

La sección *Flavi* está constituida por cerca de 22 especies, de las cuales las especies productoras de aflatoxinas son: *A flavus* y *A parasiticus* (Vargas *et al.*. 2011).

Las cepas toxigénicas de *A flavus* generalmente producen solo aflatoxina B1 y B2, mientras que las cepas de *A parasiticus*, producen aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 (Hesseltine *et al*, 1970).



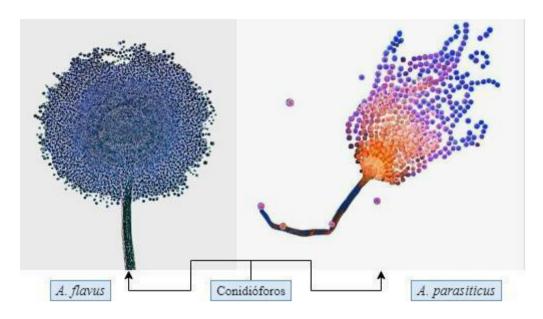


Figura 6.- Conidióforos de A. flavus y A parasiticus, vista en microscopio a 400x.

Fuente: Tracy, 2020. Edición propia.

# MÉTODOS DE DETECCIÓN DE AFLATOXINAS

Las aflatoxinas pueden ser analizadas mediante 3 tipos de pruebas: presuntivas, rápidas y analíticas.

#### PRUEBAS PRESUNTIVAS

Pueden realizarse a nivel de campo y sirven para determinar si deben o no realizarse pruebas cuantitativas. Están basadas en la propiedad de las aflatoxinas de emitir fluorescencia bajo luz ultravioleta de 36 nm (Arrúa, 2009).

# Método Holaday - Velasco

La muestra se hace pasar a través de una mini columna de albúmina neutra, gel de sílice, florisil, CaSO<sub>2</sub> y fibra de vidrio, donde las aflatoxinas quedan retenidas en el florisil y se observan una banda fluorescente bajo luz ultravioleta (Moreno, 2004).

#### Método Romer

Se hace pasar la muestra por una columna de composición patentada donde las aflatoxinas quedan retenidas. También se observa una banda fluorescente bajo luz ultravioleta (Moreno, 2004).



# PRUEBAS RÁPIDAS

Sirven para definir la presencia o ausencia de aflatoxinas.

# Luz negra

El grano contaminado con *A. flavus* produce una característica fluorescencia verdeamarillo brillante cuando es examinado en un cuarto oscuro bajo una longitud de onda corta de luz ultravioleta que es comúnmente llamada luz negra (254 nm). También es considerada una prueba presuntiva y asume la presencia de AF, por la presencia del ácido kójico que indica que *A. flavus* está presente. Este método no determina la cantidad de AF totales (Moreno, 2004).

#### PRUEBAS ANALÍTICAS

Son aquellos que determinan en forma exacta el nivel de la toxina en un producto (Soriano, 2007).

# Cromatografía de capa fina (TLC)

Es un análisis semi cuantitativo que determina la concentración de aflatoxinas B y G, bajo luz UV de 365 nm. El método de extracción es aceptado por la Association of Official Analytical Chemicals (AOAC). Detecta niveles bajos como 1 ng/g (Arrúa, 2009; Moreno, 2004).

# Cromatografía líquida (HPLC)

Este análisis permite detectar concentraciones de hasta 100 µg /100 g de muestra, es el método más exacto, pero más costoso y que requiere de personal capacitado para poder llevar a cabo la cuantificación (Arrúa, 2009).

#### Kits de pruebas rápidas

Estas pruebas hacen posible determinar las concentraciones de aflatoxinas mediante métodos serológicos cualitativos y cuantitativos como son Aflatest, Agri-Screen- Ez-Screen y Quick-Card (Arrúa, 2009; Moreno, 2004).

# Prueba de ELISA

Esta prueba es mediante inmunoabsorción ligado a enzimas, técnica de inmunoensayo en la cual un antígeno inmovilizado se detecta mediante un anticuerpo enlazado a una enzima capaz de generar un producto detectable (Lequin, 2005).



## ❖ Inmunoafinidad en columna de anticuerpos monoclonales

Este método cuantitativo consiste en el empleo de anticuerpos inmovilizados para aislar AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 y AFM1 de extractos de forrajes, alimentos, granos, leche y sus productos (Vicam, 1999). Los anticuerpos quedan ligados a pequeñas esferas de vidrio y retenidos en la columna, éstos actúan selectivamente atrapando las aflatoxinas. Como último paso, estas son extraídas empleando un solvente y posterior a esto se lleva a cabo la medición en un fluorómetro.

La ventaja de este análisis es la rapidez en que se eliminan las interferencias en el primer paso y su capacidad de detección a partir de 0.5 µg (Hansen, 1990).

La eficiencia en el análisis depende de varios factores como: la calidad del muestreo, el método de análisis seleccionado (calidad de reactivos, equipo, etc), conocimientos y destreza del analista (Moreno y Gil, 1991).

#### LEGISLACIÓN

Diferentes legislaciones tanto internacionales como nacionales establecen límites máximos de tolerancia en diferentes alimentos, además de normalizar muestreos y análisis, esto debido a que el contenido de sustancias tóxicas es inevitable en los alimentos.

En la tabla 2 se muestran los límites máximos permitidos de aflatoxinas en productos elaborados a base de cereales.

Tabla 2. Cantidades máximas de AF permisibles a nivel internacional.

		Aflatoxina	Límite
País	Producto	(AF)	máximo
México		AF totales	
(Norma Oficial Mexicana	Cereales para consumo	(B1, B2, G1,	
NOM-188-SSA1-2002)	humano y animal	G2)	20 μg/kg
	Cereales y derivados	AFB1	2 μg/kg
	para consumo humano	AF totales	4 μg/kg
		AFB1	5µg/kg
Unión Europea	Maíz procesado	AF totales	10µg/kg
América latina y			
MERCOSUR (Brasil,			
Paraguay, Uruguay y	Harinas o sémolas de		
Argentina)	maíz	AF totales	20 μg/kg
	Todos los alimentos		
<b>Estados Unidos</b>	salvo leche	AF totales	20 μg/kg

Fuente: Elaboración propia con datos de Vega (2012); FAO (2003 y 2004); OJEU (2004) y MERCOSUR/GMC/RES (2002).



# **OBIETIVOS**

#### **OBJETIVO GENERAL**

❖ Determinar la concentración de aflatoxinas, mediante columnas de anticuerpos monoclonales marca Vicam, en cereales de consumo infantil de marcas comerciales y de venta a granel en el municipio de Cuautitlán Izcalli, Edo de Méx.

# **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Recolectar productos de cereales para desayuno elaborados con maíz, trigo, avena y arroz destinados al consumo infantil, disponibles comercialmente en el municipio de Cuautitlán Izcalli, Edo de Méx.
- Determinar la concentración de aflatoxinas en las diferentes muestras mediante el método de aflatest-vicam.
- Determinar la calidad sanitaria de las muestras con el método de siembra por disolución en placas Petrifilm.
- ❖ Determinar la presencia de *A. flavus y A. parasiticus* potenciales productores de aflatoxinas en las muestras.
- ❖ Correlacionar la presencia de aflatoxinas con el tipo de cereal con que fue elaborado el producto, marca, y punto de venta.

#### HIPÓTESIS

La concentración de aflatoxinas será mayor en los cereales infantiles de venta a granel que en los de marcas registradas.

#### **METODOLOGÍA**

#### RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

Se recolectaron 40 diferentes muestras de cereales; 20 de ellas de venta comercial (bajo marcas registradas) y 20 de venta a granel. Se realizó la selección considerando que el producto fuese elaborado con al menos uno de los 4 principales cereales mencionados (Avena, arroz, maíz y trigo), la selección fue totalmente al azar con 3 repeticiones.

Las muestras fueron obtenidas de diferentes puntos de venta dentro del municipio de Cuautitlán Izcalli, entre ellas se consideraron el mercado del Carmen, dulcerías, tiendas de semillas, materias primas y de abarrotes, así como establecimientos de autoservicio como Walmart, tiendas 3B y Waldo's.



Figura 7.- Fotos ilustrativas de los lugares de procedencia de las muestras colectadas.

Cereales a granel - Mercado del Carmen (izquierda). Cereales bajo marcas registradas 
Tiendas de autoservicio (derecha).

Fuente: Fotos propias.

# ETIQUETADO Y LISTADO DE MUESTRAS

Cada una de las muestras fue identificada de acuerdo al tipo de lugar de procedencia y por el tipo de cereal de elaboración.

Se realizó un listado con las características de cada una de las muestras para poder ser identificadas entre ellas, las cuales se muestran en la tabla 3 y tabla 4:



# Tabla 3. Listado de muestras por características del producto.

#### Muestras de marcas comerciales

3.	Cereal de trigo inflado y endulzado sabor

vainilla

5. Arroz inflado sabor chocolate

1. Hojuelas de maíz azucaradas

7. Aritos de maíz, trigo y avena

9. Hojuelas de maíz con azúcar

11. Bolitas de maíz y arroz sabor chocolate

13. Hojuelas de maíz

15. Cereal sabor manzana, hojuelas de avena, trigo, pasas y manzana deshidratada

17. Hojuelas de maíz

19. Hojuelas de maíz sabor chocolate

Fuente: Elaboración propia.

2. Cereal de maíz y miel

4. Hojuelas de avena

 Avena instantánea integral con sabor miel con nuez

8. Avena instantánea integral con manzana

10. Hojuelas de maíz con azúcar

12. Hojuelas de maíz cubiertas con chocolate

14. Hojuelas de maíz con azúcar

16. Aritos de maíz, trigo y avena

18. Bolitas de maíz y arroz sabor chocolate

20. Hojuelas de maíz azucaradas





Figura 8.- Muestras de cereales de marcas comerciales.

Fuente: Fotografía propia.

Tabla 4. Listado de muestras evaluadas por lugar de procedencia.

# Muestras de venta a granel

Establecimiento de compra	Producto
Dulcería	Arroz inflado sabor chocolate
	Aros de cereal
Tienda de abarrotes	Aros de cereal
Tienda de semillas	Hojuelas de maíz
	Arroz inflado sabor chocolate
Materias primas	Arroz inflado sabor chocolate
	Hojuelas de maíz azucaradas
	Aros de cereal
Mercado local 1	Hojuelas de maíz azucaradas
	Hojuela de chocolate
	Estrella
	Bolitas de cereal sabor chocolate

# Tabla 4. Continuación

Mercado local 2

Aros de cereal

Hojuelas de maíz

Arroz inflado sabor chocolate

Hojuela de chocolate

Mercado local 3

Estrella

Hojuela de chocolate

Bolitas de cereal sabor chocolate

Hojuelas de maíz azucaradas

Fuente: Elaboración propia.



Figura 9.- Muestras de cereales de venta a granel.

Fuente: Fotografía propia.

# DETERMINACIÓN DE AFLATOXINAS

La metodología que se llevó a cabo para la cuantificación de aflatoxinas fue la mencionada por el método Aflatest de Vicam (Vicam, 1999).



## Preparación de muestras y extracción de aflatoxinas

De cada una de las muestras obtenidas se tomaron 50 gr, los cuales se colocaron en vasos independientes y posteriormente se les agregó a cada uno 100 ml de metanol al 80% y 5 gr de cloruro de sodio (figura 10).

Posteriormente se licuó cada una de las preparaciones durante 1 minuto y se filtró con papel Whatman no.1 sobre probetas graduadas, al obtener los primeros 40 ml de filtrado, se extrajeron 10 ml los cuales se diluyeron en 40 ml de agua destilada (figura 10).

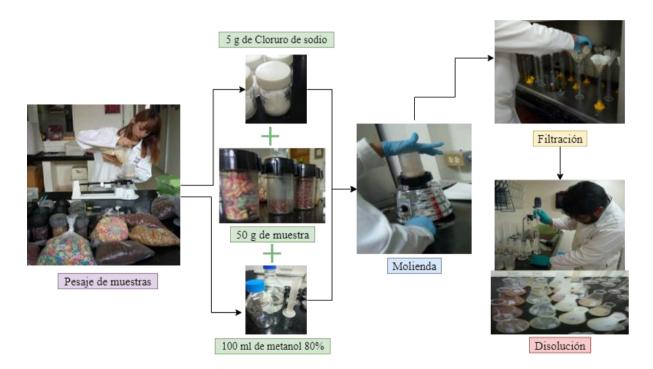


Figura 10.- Preparación de muestras.

Fuente: Elaboración propia.

#### Purificación de aflatoxinas

De la disolución anterior se extrajeron 10 ml y se pasaron por papel filtro colocado en embudo de vidrio sobre las jeringas de cristal. Posteriormente mediante bombeo se pasó el filtrado por la columna de anticuerpos monoclonales en la cual se lleva a cabo la retención de aflatoxinas mediante la ligadura del antígeno (AF) al anticuerpo (figura 11).



Se realizaron dos lavados con agua destilada (purificación) y se agregó 1 ml de metanol grado HPLC para separar las aflatoxinas del anticuerpo, recuperando las AF en viales de cristal (figura 11).

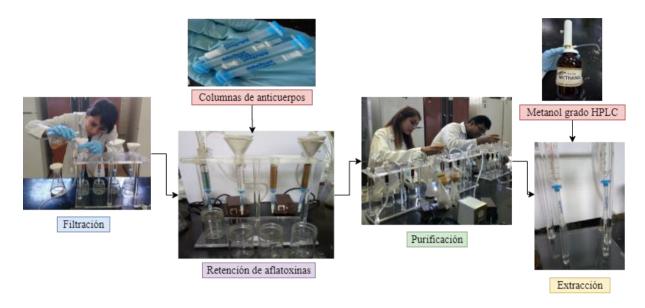


Figura 11.- Proceso de extracción de aflatoxinas.

Fuente: Elaboración propia.

#### Cuantificación de aflatoxinas

Para poder llevar a cabo la cuantificación de aflatoxinas en el fluorómetro (marca Vicam), fue necesario revelar la fluorescencia de las moléculas, para lo cual se agregó  $0.1\,\text{ml}$  de revelador de bromo a las AF ya una vez extraídas en el paso anterior. Se insertó el vial con la muestra en el equipo previamente calibrado y se esperó  $1\,\text{minuto}$  para poder dar lectura a los resultados, estos fueron dados en ppb o bien  $\mu\text{g/kg}$  (figura 12).



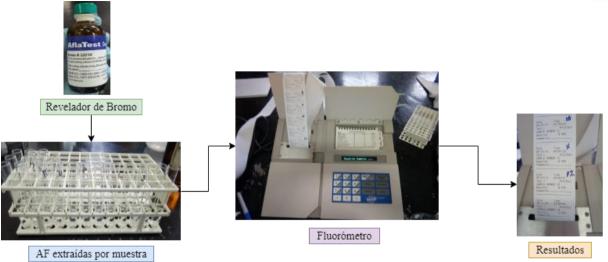


Figura 12.- Proceso de cuantificación de AF.

Fuente: Elaboración propia.

# DETERMINACIÓN DE MICOBIOTA

La metodología empleada fue siembra por disolución sobre placas 3M Petrifilm para determinación de mohos y levaduras. La placa para el recuento de mohos y levaduras 3M<sup>TM</sup> Petrifilm<sup>TM</sup> Aqua (AQYM) es un sistema con medio de cultivo listo para usar que contiene nutrientes complementados con antibióticos, un agente gelificante soluble en agua fría y un indicador que facilita la enumeración de mohos y levaduras. Una de las ventajas de emplear este medio de cultivo es que es de uso rápido, por lo que se utiliza para el diagnóstico oportuno en laboratorios de investigación, centros de acopio, puntos aduanales y en la industria de alimentos. Se siguió la metodología sugerida por los elaboradores de dicho producto (3M Petrifilm, 2010).



Figura 13.- Placas 3M<sup>TM</sup> Petrifilm<sup>TM</sup>.

Fuente: 3M Petrifilm, 2010.

# Preparación e inoculación sobre placas Petrifilm

En una balanza de precisión colocada en la campana de flujo laminar, se pesó 1 gr de cada una de las muestras, en condiciones de asepsia. Se realizó la disolución del gramo de muestra con 9 ml de agua destilada estéril en tubos de ensayo estériles, se agitó por unos segundos y con apoyo de una micropipeta se extrajo 1 ml de la disolución. Esta muestra se colocó cuidadosamente sobre el filtro de la placa Petrifilm para hidratarla, posteriormente se colocó nuevamente la película que recubre la muestra evitando dejar aire atrapado (figura 14).

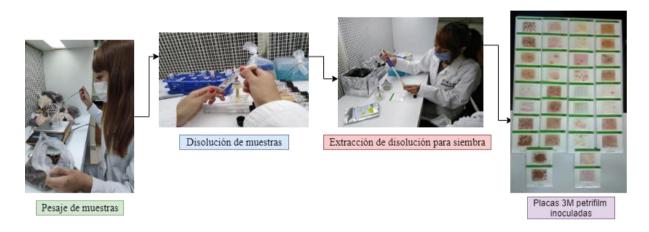


Figura 14.- Detección de hongos en placas Petrifilm.

Fuente: Elaboración propia.

#### Incubación

La incubación de las placas Petrifilm, fue llevada a cabo por un lapso de 5 días, a una temperatura de 20-25°C. Estas fueron colocadas en posición horizontal, con la parte transparente hacia arriba.

#### Interpretación

Una vez transcurrido el tiempo de incubación (3 a 5 días con observaciones intermedias), se determinó la calidad sanitaria de las muestras en cuanto al número de colonias de hongos.

La identificación de mohos, se realizó de acuerdo a la tabla 5 brindada por la guía de instrucciones del producto, la cual muestra las diferencias para poder identificar entre los mohos y las levaduras.



Tabla 5. Características para identificación de levaduras y mohos.

Levaduras	Mohos
Colonias pequeñas	Colonias grandes
Colonias elevadas (tridimensionales)	Colonias planas
Bordes difusos	Bordes definidos
De color canela rosado a azul verdoso	Color variable
Colonias de color uniforme	Colonias con un centro oscuro*

Fuente: (3M Petrifilm, 2010).

## Identificación de la micobiota

La identificación de la micobiota en las muestras de alimentos se realizó por medio de siembra directa en placas de malta sal agar (MSA).

Para la preparación de 750 ml de medio de cultivo MSA, se requirieron 19 g de agar, 32 g de cloruro de sodio y 17.5 g de extracto de malta. Se disolvieron los ingredientes en un matraz de 1 l, con 750 ml de agua destilada, se esterilizó en la autoclave a 120°C por un lapso de 30 min. Posterior a esto, se hizo el vaciado del medio de cultivo sobre cajas de Petri estériles y se dejaron reposar para que pudieran cuajar, se esperó un lapso de 3 días antes de su uso para descartar cualquier tipo de contaminación ambiental.

Para la siembra se requirió del uso de un área estéril conformada por una campana de flujo laminar, en donde se realizó la siembra utilizando el material biológico obtenido de las placas Petrifilm, con el apoyo de mecheros para mantener el área estéril y con un asa bacteriológica se tomó una muestra de los hongos y se colocaron sobre la caja de Petri con MSA, marcando cada una de las cajas para su posterior reconocimiento.



Una vez realizado esto con todas las muestras, se colocaron en la incubadora con temperatura controlada a 26°C por un lapso de 7 días para permitir el adecuado desarrollo de las colonias. Pasando el tiempo debido se prosiguió a la revisión e identificación macro- y microscópica de las colonias.

Para la identificación de los hongos por medio de sus características morfológicas se recurrió a la técnica de tinción con azul de metileno, la cual resalta las estructuras reproductivas para hacer más fácil la identificación. Para la preparación se colocó una gota de azul sobre un portaobjeto limpio, se colocó con apoyo de una aguja de disección una muestra de los hongos obtenidos y se prosiguió a observar bajo el microscopio con el objetivo de 10x. Se siguieron las claves de identificación señaladas por Moreno (1988) basadas en las estructuras morfológicas de los hongos.

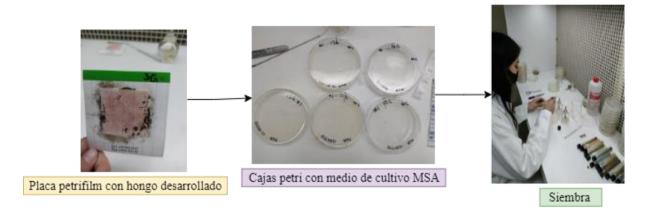


Figura 15.- Siembra de muestras en MSA.

Fuente: Fotografías propias





Figura 16.- Preparación de muestras para identificación morfológica.

Fuente: Herrero, S/F y fotografías propias.

#### ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### Determinación de aflatoxinas

Se ha reportado en la literatura que los cereales de desayuno elaborados a base de maíz, arroz y trigo están frecuentemente contaminados con aflatoxinas, aunque los niveles de contaminación varían en diferentes países (Londoño y Martínez, 2017). Como resultado de la determinación de AF, de un total de 40 muestras analizadas por el método de aflatest, en columnas de anticuerpos monoclonales, se obtuvo que el 25% de las muestras tuvieron presencia de aflatoxinas con concentraciones de entre 0.536 µg/kg y 2 µg/kg (Tabla 6).

Tabla 6. Concentración de aflatoxinas en las muestras que resultaron positivas para AF. y sus concentraciones.

			Aflatoxinas
Tipo de muestra		Producto	$(\mu g. Kg^{-1})$
	М3	Arroz inflado sabor chocolate	1.16
	M5	Hojuelas de maíz azucaradas	0.53
		Bolitas de maíz y arroz sabor	
Muestras de	M6	chocolate	0.93
productos de		Avena instantánea integral	
marcas registradas	M19	con sabor miel con nuez	0.70
	T2A	Aros de cereal	1
	T4C	Aros de cereal	1
	T6A	Aros de cereal	2
	T6B	Hojuelas de maíz	2
Muestras de venta	T6C	Arroz inflado sabor chocolate	2
a granel	T6D	Hojuela sabor chocolate	2

Fuente: Elaboración propia

Los resultados encontrados en este trabajo indican que las muestras presentaron bajos niveles de contaminación con AF, a diferencia de otros reportes como el de Rojas y Wilches (2009) realizado en Colombia, quienes reportaron que la incidencia de aflatoxinas en alimentos de mayor consumo infantil comercializados en Pamplona fue del 10%, presentando niveles detectables que oscilaron entre 18.42 μg/kg y 71.25 μg/kg. Por lo tanto, los niveles de contaminación con aflatoxinas se encontraban superando el nivel máximo permisible por la legislación colombiana (10 μg/kg) y por la legislación establecida por la Unión Europea (0,10 μg/kg) para alimentos infantiles y alimentos elaborados a base de cereales para lactantes y niños de corta edad.



En este trabajo de Rojas y Wilches, el 6.67% de las muestras analizadas no cumplió con los requisitos estipulados por la FDA (20 μg/kg).

#### Determinación de AF en cereales de marcas registradas

De las 20 muestras de marcas comerciales analizadas en el trabajo de investigación, el 90% estuvieron libres de aflatoxinas, mientras que 4 de las muestras sí presentaron bajas concentraciones de aflatoxinas las cuales representan el 10% restante. Se registró como concentración mínima 0.357 µg. Kg<sup>-1</sup> y como máximo 1.16 µg. Kg<sup>-1</sup>.

En la tabla 7 y 8 se reportó la diferencia significativa entre muestras y sus concentraciones de AF. En ella se observa que la muestra 3 fue la reportada con mayor concentración de aflatoxinas para los cereales de marca comercial, seguido por la muestra 19 y 6 respectivamente; estas muestras son catalogadas por tener una concentración media, la cual indica que no hubo diferencia significativa entre las concentraciones. Sin embargo, la muestra 5 indica la concentración mínima reportada.

Como resultado de la concentración de AF en cereales de marcas registradas, se pudo observar que, a pesar de llevar a cabo las medidas necesarias y el cumplimiento de normas de calidad, la presencia de AF en algunos de los productos es de bajas concentraciones más no nula, aun siendo un riesgo potencial a largo plazo para la salud de los principales consumidores de dichos productos.

De acuerdo a un trabajo de investigación realizado por Ortega (2011), titulado "Cuantificación de aflatoxinas y fumonisinas en cereales para desayuno de los centros de distribución del Estado de México en el área de Cuautitlán Izcalli" se tuvo como resultado que la totalidad de sus productos obtenidos de venta bajo marcas registradas, tuvieron nula concentración de AF lo que es atribuido a que éstos productos, dadas sus características de empaque, no tienen contacto directo con el ambiente y de este modo se previene su contaminación.



Tanto en el trabajo de Ortega (2011) como en este trabajo de tesis, puede determinarse que la presencia de AF en los cereales comercializados bajo una marca registrada, al estar comprometidos al cumplimiento de las NOM y procesos de calidad, las concentraciones de AF suelen ser muy bajas e inclusive nulas, esto debido al cuidado estricto desde la recepción de materia prima para la elaboración de los productos, hasta la entrega del mismo para su posterior comercialización al público en general.

Tabla 7. Concentración de aflatoxinas en los productos registrados bajo marca comercial que son distribuidos en empaque en los supermercados \*\*

			Aflatoxinas
Muestra	Descripción	Marca	$(\mu g. Kg^{-1})$
1	Hojuelas de maíz azucaradas	A	0c*
2	Trigo inflado y endulzado sabor vainilla	В	0c
3	Arroz inflado sabor chocolate	C	1.16b
4	Aritos de maíz, trigo y avena	C	Ос
5	Hojuelas de maíz con azúcar	C	0.35bc
6	Bolitas de maíz y arroz sabor chocolate	C	0.62b
7	Arroz inflado sabor chocolate	C	0c
8	Aritos de maíz, trigo y avena	C	0c
9	Bolitas de maíz y arroz sabor chocolate	C	0c
10	Hojuelas de maíz con azúcar	C	0c
11	Hojuelas de maíz	D	0c
12	Hojuelas de maíz con azúcar	Е	0c
13	Hojuelas de maíz	E	0c



Tabla 7. Continuación

14	Hojuelas de maíz sabor chocolate	E	0c
15	Hojuelas de maíz azucaradas	A	0c
	Hojuelas de avena con trigo, pasas y		
16	manzana deshidratada	F	0c
17	Cereal de maíz y miel	G	0c
18	Hojuelas de avena	Н	0c
	Avena instantánea integral con sabor miel		
19	con nuez	I	0.70b
20	Avena instantánea integral con manzana	I	0c

<sup>\*</sup>Letras diferentes en la columna corresponden a medias con diferencias estadísticas significativas (Tukey, alfa=0.05).

Tabla 8. Concentración de aflatoxinas en los productos de venta a granel en Cuautitlán Izcalli, Edo. de México. \*\*

Producto	Tipo de establecimiento	Tipo de producto	Aflatoxinas (μg. Kg <sup>-1</sup> )
Arroz inflado sabor chocolate	I	A	0c*
Aros de cereal	I	В	0c
Aros de cereal	II	В	1b
Hojuelas de maíz	III	C	0c
	Arroz inflado sabor chocolate  Aros de cereal  Aros de cereal	Producto establecimiento  Arroz inflado sabor chocolate I  Aros de cereal I  Aros de cereal II	ProductoestablecimientoproductoArroz inflado sabor chocolateIAAros de cerealIBAros de cerealIIB

<sup>\*\*</sup> La comparación de medias de Tukey se realizó para el conjunto de datos de las tablas 7 y 8.

Tabla 8. Continuación

25	Arroz inflado sabor chocolate	III	A	0c
26	Arroz inflado sabor chocolate	IV	A	0c
27	Hojuelas de maíz azucaradas	IV	D	0c
28	Aros de cereal	IV	В	1b
29	Hojuelas de maíz azucaradas	V	D	0c
30	Hojuela de cereal con chocolate	V	Е	0c
31	Estrella	V	F	0c
	Bolitas de cereal sabor			
32	chocolate	V	G	0c
33	Aros de cereal	VI	В	2a
34	Hojuelas de maíz	VI	C	2a
35	Arroz inflado sabor chocolate	VI	A	2a
36	Hojuela de cereal con chocolate	VI	Е	2a
37	Estrella	VII	F	0c
38	Hojuela de cereal con chocolate	VII	E	0c
	Bolitas de cereal sabor			
39	chocolate	VII	G	0c
40	Hojuelas de maíz azucaradas	VII	D	0c

<sup>\*</sup>Letras diferentes en la columna corresponden a medias con diferencias estadísticas significativas (Tukey, alfa=0.05).

<sup>\*\*</sup> La comparación de medias de Tukey se realizó para el conjunto de datos de las tablas 7 y 8.



# Concentración de AF en las muestras por marca comercial

En la tabla 9 se muestran las marcas comerciales que se reportaron como positivas a la presencia de AF junto con sus concentraciones. De las 9 marcas analizadas solo 2 de ellas, (22.2% de las marcas totales), presentaron concentraciones positivas a AF. En la tabla se puede observar que la marca C está representada por 8 productos de los cuales 3 de ellos (37.5%) presentaron concentración de aflatoxinas. Este resultado se pudiera atribuir a un mal manejo en el almacenamiento de la materia prima o en el proceso de elaboración. Así mismo, con el apoyo de los datos recabados por producto, se determinó que estas muestras contaminadas son pertenecientes al mismo número de lote. La segunda marca con presencia de AF fue la mostrada con la letra I, la cual tiene una representación del 50% de muestras contaminadas por AF.

Tabla 9. Muestras de cereales de desayuno clasificadas de acuerdo a su marca comercial.

	N° de muestras	N° de muestras positivas a la		Concentración de AF en la muestra
Marca	analizadas	presencia de AF	%	$(\mu g. Kg^{-1})$
A	2	0	0	0
В	1	0	0	0
C	8	3	37.5	1.16, 0.62 y 0.35
D	1	0	0	0
E	3	0	0	0
F	1	0	0	0
G	1	0	0	0
Н	1	0	0	0
I	2	1	50	0.70



## Determinación de AF en cereales de venta a granel

De las muestras obtenidas de venta a granel, 6 de ellas (15%) reportaron presencia de AF, las cuales estuvieron en el rango de 1 a 2 µg. Kg<sup>-1</sup>, siendo estas mayores a las reportadas en los cereales de marcas registradas. Las muestras restantes con representación del 85%, se encontraron libres de aflatoxinas.

En la tabla 8 se muestran 3 variables de análisis para este tipo de productos; el tipo de establecimiento donde fueron obtenidas las muestras, el tipo de producto (dado por el nombre común con que se comercializa el producto) y la concentración de AF reportadas.

En los resultados se obtuvo que 4 de las 6 muestras, mostraron la mayor concentración de AF, reportado en la tabla 8 con la letra "a" a la cual le es correspondiente una concentración de 2 µg. Kg-1, del mismo modo, se obtuvo que estas muestras son pertenecientes a un mismo sitio de compra, descrito por el número romano VI; siendo este uno de los tres locales muestreados dentro del mercado del Carmen. Los productos al ser diferentes entre sí se esperaría hubiera diferencia entre las concentraciones reportadas dados los diferentes cereales de elaboración, sin embargo, la contaminación por AF también puede ser atribuida a un mal almacenamiento del producto inclusive antes de ser distribuido a los comercios finales para la venta al público.

Las concentraciones de aflatoxinas halladas en las muestras de cereales de venta a granel fueron de las mayores reportadas a comparación de las encontradas en las muestras de venta comercial; sin embargo, no superaron los límites máximos permitidos por las diferentes legislaciones que regulan las AF en los alimentos. La diferencia entre las concentraciones de AF, puede ser debido a la falta de inocuidad y de condiciones óptimas para el almacenamiento de los cereales a granel al momento de la venta, así como también, pudiera influir no estar bajo un registro o marca que ayude al control de la calidad del producto; el origen de la producción de estos cereales suele ser desconocido y al no contar con datos de registro se ignora la composición del cereal, fecha de elaboración y fecha de caducidad, por lo que se puede deducir que el producto no presenta la calidad ideal para el consumo humano.



En el trabajo de investigación publicado por Ortega (2011), se reportaron resultados similares a los mencionados en el presente trabajo. En ambos casos la concentración de AF en cereales de venta a granel fue mayor a la reportada en los cereales de venta bajo marca de registro, sin embargo, en el trabajo realizado por Ortega, se obtuvo que el 100% de las muestras presentaron concentraciones de AF con concentraciones de entre 1.33  $\mu$ g/ Kg y 9  $\mu$ g/ Kg.

# Concentración de AF por tipo de cereal de elaboración

Las muestras analizadas para este trabajo de investigación, consistieron de las marcas y lotes disponibles en los puntos de venta en el municipio de Cuautitlán Izcalli, al momento de la recolección de muestras. Éstas estuvieron compuestas por 4 principales cereales de elaboración los cuales se muestran en la tabla 10, entre los cuales se encontraron Arroz, Maíz, Avena y Trigo. Así mismo, se analizaron productos en los cuales se menciona que su elaboración es a base de la combinación de harinas de estos diversos cereales; así como también 3 de las muestras fueron adicionadas con frutos secos o semillas (manzana deshidratada, nuez y pasas).

Los resultados de muestras contaminadas con AF, clasificadas por tipo de cereal de elaboración se presentan en la tabla 10 donde se observa que el 45% de las muestras analizadas fueron elaboradas a base de maíz, seguido por cereales con combinación de harinas (5%), avena (3%), arroz (10%) y trigo (5%). Puede observarse que no hubo contaminación predominante con AF en alguno de los cereales, si bien no se encontró contaminación en el cereal elaborado con trigo, esto posiblemente debido a la escasa cantidad de muestras analizadas con este cereal; sin embargo, dentro de los cereales combinados se encontraron mezclas como trigo, arroz y avena o trigo y arroz entre otras. El arroz presentó la mayor concentración de AF, aunque estadísticamente los valores de la tabla 10 no muestran diferencia significativa. Mahato *et al.*. (2019) señala que el arroz es un cereal con el cual se elaboran alimentos para la mitad de la población mundial por lo que la ingesta de este grano aún con bajas concentraciones de aflatoxinas representa un riesgo para la salud humana.

La presencia de estos metabolitos tóxicos en alimentos elaborados con arroz y destinados al consumo humano se ha estudiado en diferentes países del mundo en las últimas décadas. Se ha encontrado que el arroz contaminado con aflatoxinas se ubica principalmente en regiones de clima tropical y subtropical donde las lluvias favorecen el desarrollo de *Aspergillus flavus*, *A. nomius y A. parasiticus* durante la cosecha y el almacenamiento del arroz (Majeed *et al.* 2018). En Pakistán se realizó un estudio en 40 muestras de arroz cosechado en 2008 y 2009 reportando 70% de las muestras contaminadas con aflatoxinas totales en niveles promedio de 4.9 μg/Kg. En América se tienen reportes en Canadá, Brasil, Colombia, Ecuador, etc. de arroz importado de Asia contaminado con AF. Y también existen reportes de arroz contaminado procedente de México: Suárez-Bonnet et al. (2013) reportaron la presencia de AF en arroz en niveles de 16.9 μg/Kg.

En esta investigación se encontraron niveles de 1.16 µg/Kg en el alimento procesado, aunque se desconoce la procedencia del arroz utilizado en su fabricación. Por lo que se hace una contribución a la detección de aflatoxinas en alimentos elaborados a base de este cereal de consumo predominantemente infantil y sirve para no desestimar el potencial riesgo de enfermedad debido a la ingesta crónica de estas micotoxinas que se acumulan en el hígado. Majeed *et al.* (2018) mencionan que actualmente se extiende la preferencia de ingerir leches elaboradas con productos de origen vegetal como almendra, soya, coco, avena y arroz, entre otras, considerándolas más sanas que la leche de origen animal, que entre otras desventajas (para la población intolerante a la lactosa, alergias, hipercolesterolemia, etc.), implican el riesgo de ingerir AFM1. Sin embargo, es necesario considerar el riesgo de consumir bajos niveles de aflatoxinas provenientes de los granos en estos alimentos funcionales.

Tabla 10. Muestras de marcas comerciales analizadas por tipo de cereal y su concentración de AF.

	% de muestras	
% de muestras	positivas a la	Concentración de AF en la
analizadas	presencia de AF	muestra (µg. Kg <sup>-1</sup> )
10 %	5 %	1.16
15 %	5 %	0.70
45 %	5 %	0.35
5 %	0 %	0
25 %	5 %	0.62
	10 % 15 % 45 % 5 %	% de muestras analizadas         positivas a la presencia de AF           10 %         5 %           15 %         5 %           45 %         5 %           5 %         0 %

#### Determinación de micobiota

Debido a la presencia de hongos en las placas Petrifilm, se recurrió a realizar la identificación de micobiota en cajas de Petri con malta sal agar (MSA), obteniendo como resultado la presencia de hongos de los géneros: *Penicillium, Mucor, Cladosporium, Rhizopus y Aspergillus Secc. Nigri.* 

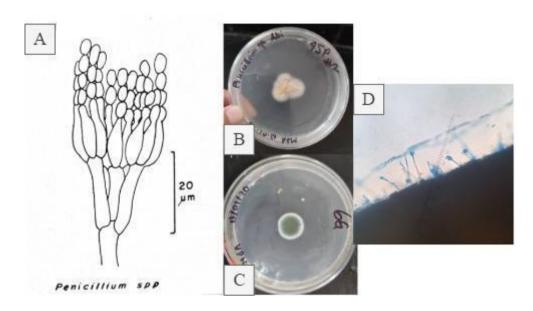


Figura 17.- Diferentes imágenes de Penicillium spp.,

A) Esquema representativo de los conidióforos característicos de *Penicillium spp.*, Fuente: (Moreno, 1988) B y C) Colonias fúngicas creciendo sobre MSA a 26°C durante 7 días. Fuente: Fotografías propias. D) Vista al microscopio de conidióforos característicos de *Penicillium spp.*, Fuente: Fotografía propia.



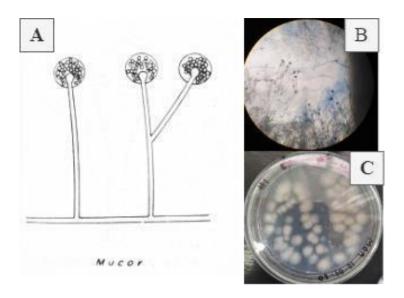


Figura 18.- Diferentes imágenes de Mucor spp.,

A) Esquema representativo de la estructura característica de *Mucor spp.*, Fuente: (Moreno, 1988) B) Vista al microscopio de esporangióforos individuales y esporangios esféricos. Fuente: Fotografía propia. C) Colonias fúngicas de *Mucor sp.*, creciendo sobre MSA a 26°C durante 7 días. Fuente: Fotografía propia.



Figura 19.- Diferentes imágenes de Cladosporium sp.,

A) Esquema representativo de la estructura característica de *Cladosporium sp.*, Fuente: (Moreno, 1988) B) Colonias fúngicas pertinentes a *Cladosporium sp.*, creciendo sobre MSA a 26°C durante 7 días. Fuente: Fotografías propias., C) Vista al microscopio de conidios color obscuro en forma de limón. Fuente: Fotografías propias. D) Vista al microscopio de conidióforos ramificados pertinentes a *Cladosporium sp.*, Fuente: Fotografías propias.



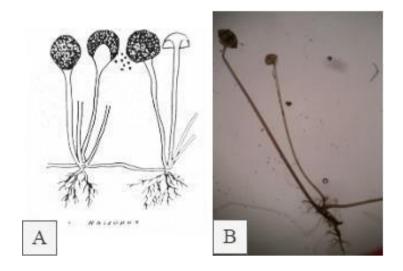


Figura 20.- Diferentes imágenes de Rhizopus sp.,

A) Esquema representativo de la estructura característica de Rhizopus sp., Fuente: (Moreno, 1988) B) Vista al microscopio de esporangióforos individuales con rizoides característicos de Rhizopus sp., Fuente: Fotografía propia.

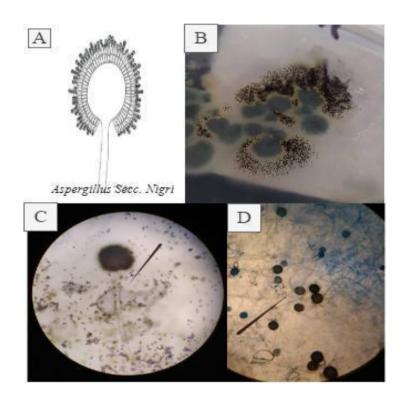


Figura 21.- Diferentes imágenes de Aspergillus Sec. Nigri.

A) Esquema representativo de la estructura característica de *Aspergillus Sec. Nigri*. Fuente: (Hamilton, 2014) *B*) Colonia de *Aspergillus Secc. Nigri* creciendo sobre medio de cultivo MSA junto a *Penicillium* a 26°C por 7 días. Fuente: Fotografías propias. C y D) Vistas al microscopio con el objetivo 10x de cabeza conidial teñida con azul de metileno, mostrando conidióforos obscuros. Fuente: Fotografías propias.

Dentro de los hongos reportados se sabe que *Cladosporium spp.*, puede ser catalogado como un hongo de campo; sin embargo, se ha encontrado en granos almacenados con altos niveles de humedad, así mismo es el caso de *Penicillium spp.*, donde este hongo requiere de humedades relativas de 85 - 90% y también puede encontrarse en campo o almacén. En el caso de los hongos de deterioro avanzado se reportaron colonias de *Mucor spp.*, *Rhizopus spp.*, y *Aspergillus Secc. Nigri.* Es pertinente llevar a cabo una mayor supervisión en la calidad del producto, ya que la presencia de estos hongos indica deterioro avanzado en los cereales, tal vez atribuible a un mal manejo poscosecha.

La presencia de *Aspergillus* Secc. *Nigri* nos alerta sobre la posible contaminación de los alimentos con ocratoxinas, otro tipo de Micotoxinas dañinas para la salud, ya que se ha reportado su nefrotoxicidad (Kunz et al., 2021). Las ocratoxinas pueden ser producidas por especies de *Penicillium, Aspergillus ochraceus, A. niger, A. carbonarius*, etc. en granos de cereales como trigo, avena y cebada, en pasas, vinos, cervezas, jugos de manzana, pasta de chícharo, etc.

Dentro de las cepas obtenidas no se detectaron colonias de Aspergillus flavus o A. parasiticus.

Debido a los diferentes procesos de elaboración de los cereales para el desayuno y las altas temperaturas que éstos implican, el hongo se ve erradicado; sin embargo, las aflatoxinas que éstos producen se caracterizan por ser altamente termoestables (Mahato *et al.*, 2019) soportando temperaturas de hasta 310°C (Arrúa, 2009), hecho por el cual permanecen dentro de la cadena alimentaria.

En la figura 22 se reporta el número de colonias por el total de muestras analizadas y sus respectivos porcentajes. De acuerdo a lo esperado, y debido a las condiciones de comercialización de los diferentes productos, los cereales de venta a granel reportaron un 55% de muestras con hongos, mientras que los comercializados bajo una marca registrada reportaron un 20%.

En los cereales de venta a granel, es alta la probabilidad de tener presencia de hongos ya que al ser productos que se encuentran mayormente expuestos al ambiente, se espera ésta sea la fuente principal de contaminación fúngica, aunado a las malas condiciones de almacén de los alimentos donde no se cuida la temperatura e inclusive la humedad del medio donde se alojan.

Este tipo de productos suelen ser comercializados en mercados fijos y ambulantes, donde frecuentemente están expuestos al tacto de los transeúntes que visitan el lugar. Otros puntos de venta son las tiendas de materias primas, dulcerías e inclusive locales de venta de semillas; estos lugares suelen carecer de una limpieza continua y de espacio suficiente para el acomodo de los productos, por lo que pudiera haber una contaminación cruzada por la cercanía entre productos de diferente índole y por la carencia de un empaque propio que proteja la inocuidad del producto. En un estudio sobre alimento balanceado para perro de venta a granel en mercados de Perú (Vizcarra *et al.*, 2014) se encontró AF en el 100% de las muestras en niveles entre 0.2 y 8 ppb; las diferencias en contaminación con AF se atribuyeron a las medidas de conservación del alimento en cada mercado, al tiempo de exposición del alimento al ambiente, y principalmente a las condiciones de humedad (80-90% HR) y temperatura del ambiente.

Si se pretende evitar el consumo de aflatoxinas en la medida de lo posible, es necesario hacer un monitoreo constante en muestras de alimentos elaborados con granos de cereales, nueces y frutos secos para conocer la situación actual del consumo de aflatoxinas en México. Conocer qué alimentos procesados implican un riesgo para la salud de la población en general, permitirá hacer recomendaciones y regulaciones más acordes a nuestra realidad.

Nazhand *et al.* (2020) mencionan que en general, todas las personas involucradas en las cadenas de valor de los productos básicos deben considerar medidas de control de AF para promover la seguridad alimentaria, aumentar la conciencia sobre la salud pública y prevención, aumentar los beneficios económicos y reducir los costos.



# Porcentaje y muestras con presencia de hongos por grupo de productos analizados



Figura 22.- Porcentaje y número de muestras contaminadas con hongos en cada grupo de productos analizados.

Fuente: Elaboración propia.

#### **CONCLUSIONES**

Como conclusiones del trabajo de investigación se obtuvo que:

- En ambos tipos de muestras, comercializados en empaque con marca registrada y comercializados a granel, se reportó presencia de aflatoxinas.
- Las muestras de venta a granel reportaron mayor concentración de aflatoxinas que las de venta comercial.
- Las muestras elaboradas a base de arroz reportaron mayor contaminación por aflatoxinas.
- En las muestras se hallaron hongos de deterioro avanzado y de almacén (A. Secc. Nigri, Penicillium spp, Rhizopus spp y Mucor spp.)
- En la prueba de micobiota no se reportaron hongos productores de aflatoxinas: *A. flavus* y *A. parasiticus*.
- Dichos resultados conllevan a la confirmación de que las aflatoxinas pueden encontrarse en el producto aun cuando el hongo está ausente.



Con el presente trabajo de investigación se logra determinar que los cereales que son comercializados en las diferentes cadenas comerciales y de venta a granel se encuentran dentro de los parámetros exigidos por las normas de referencia. Sin embargo, en cuanto a aflatoxinas se refiere, para el consumidor vulnerable como son los niños hay riesgo a la salud a largo plazo debido a la característica de las AF de ser acumulables.

# **BIBLIOGRAFÍA**

- Abrunhosa. L. Morales, H. Soares, C. Calado, T. Vila-Chã, A. S. Pereira, M. y Venancio A. (2014). A review of mycotoxins in food and feed products in Portugal and estimation of probable daily intakes. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. DOI: 10.1080/10408398.2012.720619.
- 2. Ali. N. Aflatoxins in rice: worldwide occurrence and public health perspectives. Toxicol. Rep., 6 (2019), pp. 1188-1197, https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2019.11.007
- 3. Arrúa A. A. A, (2009), Caracterización morfológica y toxigénica de cepas Aspergillus flavus Link Fr. y de Aspergillus parasiticus Speare, aisladas de grano de maíz proveniente de 14 estados de la República Mexicana, (Tesis de maestría) Universidad Autónoma Agraria "Antonio Narro", Buenavista, Saltillo, Coah, 8-22.
- 4. ASERCA. (1995). La avena en México. Claridades agropecuarias, 14, pp. 4 11.

https://www.asociacioncereales.es/uploads/notas/Libro\_Cereales.pdf

- 6. Benz, B. F. (1997). Diversidad y distribución prehispánica del maíz mexicano. Arqueología mexicana 5(25):17-23.
- 7. Blount, W. P. (1961). Turkey "x" disease. Journal of British Turkey Federation. 9(52), 52-61.
- 8. Bogantes, L. P. Bogantes, L. D., Bogantes, L. S., (2004) Aflatoxinas. Acta Médica Costarricense [en línea]., 46(4), 174-178 Recuperado el 28 de mayo de 2019. ISSN: 0001-6002. Disponible en: https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=43446404
- 9. Bolivar M. B. (2007). Manejo de granos en almacenamiento, causas de deterioro y prevención. Archivo latinoamericano de producción, 15, 180-184.
- Brase, S. Encinas, A., Keck, J. and Nising, C. F. (2009). Chemistry and biology of mycotoxins and related fungal metabolites. Chemical Reviews. 109(9), 3903-3990.
- 11. Bryden, W. L. (2012). Mycotoxin contamination of the feed supply chain: implications for animal productivity and feed security. Animal Feed Science and Technology. 173(1-2), 134-158.
- 12. Christensen, C. M. and Kaufmann. (1974). Storage of cereal grains and their producís. St. Paul, Minnesota, U.S.A., American Association of Cereal Chemists. 2nd. ed. 549 p.

- 13. Cuenca M. E. (2012). Diagnóstico de laboratorio de la enfermedad fúngica invasora. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica; 30 (5): 257-264. Recuperado de: <a href="https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0213005X1200064X">https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0213005X1200064X</a>
- 14. Devreese M, de Backer P, and Croubels S. (2013). Different methods to counteract mycotoxin production and its impact on animal health. Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift 82:181-190.
- 15. ELIKA. (2018). Riesgo de micotoxinas a través del consumo de alimentos. Las micotoxinas en alimentos. 8 de junio de 2019, de Fundación Vasca del para la Seguridad Agroalimentaria Sitio web: https://seguridadalimentaria.elika.eus/wp-content/uploads/2018/05/Articulo-micotoxinas-alimentos-2018.pdf
- 16. Ellis, W.O., Smith, J. P. Simpson, B, K. Oldmam J.H., (1991). Aflatoxins in food: occurrence, biosynthesis, effects on organisms, detention and methods of control. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 30: 403-439.
- 17. FAO. (2019). Inocuidad y calidad de los alimentos. Roma, Italia. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, Recuperado de http://www.fao.org/food/food-safety-quality/a-z-index/mycotoxins/es/
- 18. FAO. (1993). Manual de manejo poscosecha de granos a nivel rural. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, Recuperado de http://www.fao.org/3/x5027s/x5027S00.htm#Contents



- 19. FAO. (2003). Niveles máximos tolerados para las micotoxinas en los alimentos, en los productos lácteos y en las raciones animales (encuesta 2002/2003). Recuperado el 16 de Mayo de 2020, de Food and Agriculture Organization of the United Nations Sitio web: http://www.fao.org/3/y5499s/y5499s0g.htm
- 20. FAO, (2004), Reglamentos a nivel mundial para las micotoxinas en los alimentos y en las raciones en el año 2003.
- 21. Faustman, E. M, Ommenn, G. S., en: C. D Klassen (Ed.), Casarett y Doull, (2005) Fundamentos de Toxicología, McGraw Hill Interamericana, Madrid, pp. 50.
- Fellows, P. (1994). Tecnología del procesado de los alimentos. Principios y prácticas. Zaragoza, España, Acribia. 752 p.
- 23. Fernández, A., Belío, R., Ramos, J. J., Sanz, M. C. y Sáez, T. (1997). Aflatoxins and their metabolites in the tissues, faeces and urine from lambs feeding on an aflatoxin-contaminated diet. Journal of the Science of Food and Agriculture. 74(2), 161-168.
- 24. FONADE. (2013). Efecto del cambio climático en la producción y rendimientos de cultivos. Recuperado el 28 de marzo de 2020, de Fondo Financiero de Proyectos de Desarrollo Sitio web:http://www.ideam.gov.co/documents/21021/21138/Efectos+del+Cambio+C limatico+en+la+agricultura.pdf/3b209fae-f078-4823-afa0-1679224a5e85
- Galtier, P. (1999) Biotransformation and fate of micotoxinas. Journal of Toxicology Review 295-312.



- Guy, R. (2002). Extrusión de alimentos tecnología y aplicaciones. (Traducido de Dr. Alberto Ibarz Ribas). Zaragoza, España, Acribia
- 27. Hamilton N. (2014). *Aspergillus niger*. 10 de abril de 2021, de *Aspergillus* y aspergilosis

  Sitio

  web:

  https://www.aspergillus.org.uk/zcombined\_images/aspergillus-niger-7/
- 28. Hansen, J. T. (1990) Affinity column cleanup and direct fluorescence measurement of aflatoxin M1 in raw milk. J. of Food Prod. 53: 75-77.
- 29. Herrero D. J. (S/F). Práctica N° 2: Observación de móneras y protistas. 1 de abril de 2021, de Universitat d´Alacant Departamento de Biotecnología Sitio web: https://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/13098/1/Moneras%20y%20protistas.pd f
- 30. Hesseltine C, Sorrenson W, Smith M. (1970) Taxonomic studies of the aflatoxin producing strains in the *Aspergillus flavus* group. Micología: 123-32.
- 31. Hernández, D.S. Reyes L. A., Reyes, M. C. A., García, O. J. G. y Mayek, P. N. (2007). Incidencia de hongos potencialmente toxígenos en maíz (*Zea mays* L.) almacenado y cultivado en el norte de Tamaulipas, México. Revista Mexicana de Fitopatología 25:127-133.
- 32. International Agency for Research on Cancer (IARC) (2012). Disponible en: http://www.iarc.fr

- 33. Juárez J. A. (2019). El mercado nacional y mundial del trigo. 11 de enero de 2021, de El Economista Sitio web: https://www.eleconomista.com.mx/opinion/El-mercado-mundial-y-nacional-del-trigo-20190911-0094.html
- 34. Kebede H, Abbas HK, Fisher DK and Bellaloui N. (2012). Relationship between aflatoxin contamination and physiological responses of corn plants under drought and heat stress. Toxins 4:1385-1403.
- 35. Khlangwiset, P., Shephard, G. S. y Wu, F. (2011). Aflatoxins and growth impairment: a review. Critical Reviews in Toxicology. 41(9), 740-755.
- 36. Klich M, A. (2002). Identification of Common *Aspergillus* Species. First edition. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht. The Netherlands. 166p.
- 37. Kuiper-Goodman, T. (2004). Risk assessment and risk management of mycotoxins in food. En N. Magan, y M. Olsen (eds.), Mycotoxins in food. Detection and control (pp. 3-31). Reino Unido: Woodhead Publishing Limited, Cambridge.
- 38. Kunz, B.M., Voß, A., Dalichow, J. *et al.* Impact of experimental thermal processing of artificially contaminated pea products on ochratoxin A and phomopsin A. *Mycotoxin Res* **37**, 63–78 (2021). https://doi.org/10.1007/s12550-020-00413-9
- 39. LABIFIGRAS. (2013). ¿Qué son los cereales? Universidad Nacional Autónoma de México. Recuperado de http://olimpia.cuautitlan2.unam.mx/semillas/index.php?option=com\_content&vi ew=article&id=3&Itemid=4

- 40. Lancaster, M. C., Jenkins, F. P. y Philp, J. M. (1961). Toxicity associated with certain samples of groundnuts. Nature. 192, 1095-1096.
- 41. Lequin, R. M, (2005) Enzyme Immunoassay (EIA) Enzyme-Lynked Immunosorbent Assay (ELISA). Clinical Chemistry, 2415-2418.
- 42. Lillehoj, E. B. (1983), Effect of environmental and cultural factors on aflatoxin contamination of developing corn kernels. In Aflatoxin and *Aspergillus flavus* in corn, Southern Cooperative Series Bulletin 279 for southern Regional Project S-132; Diener, U.L., Asquith, R, L. Auburn University, Alabama, USA, Opelika al. 27-34.
- 43. Londoño E. M, Martínez M. M. Aflatoxinas en alimentos y exposición dietaria como factor de riesgo para el carcinoma hepatocelular. Revista Biosalud 2017; 16(1): 53-66 https://doi.org/10.17151/biosa.2017.16.1.7
- 44. Llach, A, B. (2018). Anatomía de un grano de trigo. Recuperado el 4 de febrero de 2020, de Trigos Antiguos Sitio web: http://albertbrunollach.com/es/grano-2/
- 45. Larraín, D. J. (2018). Prospectivas del mercado mundial de la avena para consumo humano. Recuperado el 5 de febrero de 2020, de Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (ODEPA) Sitio web: https://www.odepa.gob.cl/wp-content/uploads/2018/12/estudioAvena2018.pdf
- 46. Mahato D. K, Lee K. E, Kamle M, Devi S, Dewangan K. N, Kumar P and Kang S. G (2019) Aflatoxins in Food and Feed: An Overview on Prevalence, Detection and Control Strategies. Front. Microbiol. 10:2266. https://doi:10.3389/fmicb.2019.02266

47. Majeed, S.M. De Boevre, S. De Saeger, W. Rauf, A. Tawab, Fazal-e-Habib, M. Rahman, M. Iqbal, Multiple mycotoxins in rice: occurrence and health risk assessment in children and adults of Punjab, Pakistan, Toxins 10 (2018) 77, https://doi.org/10.3390/toxins10020077



- 48. Maroto, J. (1998). "Horticultura herbácea especial". 4ta Edición. Ediciones Mundi Prensa. Madrid-España. 589-593 pp.
- 49. Martínez M, E. (2016) Cereales: técnicas de análisis, Cuautitlán Izcalli, Estado de México, Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán
- 50. Méndez, T. L. (2015). Aspergilosis. 5 de marzo de 2020, de Facultad de medicina, Departamento de microbiología y parasitología UNAM Sitio web: http://microypara.facmed.unam.mx/?page\_id=824
- 51. MERCOSUR/GMC/RES. N° 25/02. (2002). Reglamento técnico MERCOSUR sobre límites máximos de aflatoxinas admisibles en leche, maní y maíz.
- 52. Moreno, L. J. (2004), Estudio comparativo de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* en la producción de aflatoxinas bajo diferentes condiciones de humedad y temperatura. Tesis para obtener el grado de Maestría en Microbiología, Universidad Nacional Autónoma de México. Cuautitlán Izcalli.
- 53. Moreno, E.; Gil, M. (1991) La biología de *Aspergillus flavus* y la producción de aflatoxinas. UNAM. Programa universitario de alimentos. México, DF. 109 p.
- 54. Moreno. M. E. (1988). Manual para la identificación de hongos en granos y sus derivados. México: Universidad Nacional Autónoma de México.



- 55. Mycotoxin. (2019). Micotoxinas ¿Qué son y qué tipo de micotoxinas existen? Recuperado el 15 de marzo 2020, de Mycotoxinsite.com Sitio web: https://mycotoxinsite.com/home/?lang=en
- 56. Nazhand, A., Durazzo, A., Lucarini, M., Souto, E.B. and Santini, A. 2020. Characteristics, Occurrence, Detection and Detoxification of Aflatoxins in Foods and Feeds. Foods 2020, 9, 644; https://doi:10.3390/foods9050644
- 57. Norma Oficial Mexicana, NOM-188-SSA1-2002, Productos y Servicios. Control de aflatoxinas en cereales para consumo humano y animal, especificaciones sanitarias
- 58. Norma Oficial Mexicana, NOM-247-SSA1-2008, Productos y servicios. Cereales y sus productos
- 59. Official Journal of the European Union. (OJEU), (2004). "Amending regulation (EC) 466/2001 as regards aflatoxins and ochratoxin A in foods for infants and young children". 13 de abril 2020. Commision Regulation (EC) No. 683/2004. L106/3.
- 60. Organización Mundial de la Salud (OMS), (2018), Resumen sobre la inocuidad de los alimentos, REF. No.: WHO/NHM/FOS/RAM/18.1
- 61. Ortega N. M. E. (2011). Cuantificación de aflatoxinas y fumonisinas en cereales para desayuno de los centros de distribución del Estado de México en el área de Cuautitlán Izcalli. de Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM Sitio web: https://ru.dgb.unam.mx/handle/DGB\_UNAM/TES01000679188

- 62. Peraica, M, Radic, B. Lucic, A. Pavlovic, M. (1999) Efectos tóxicos de las micotoxinas en el ser humano. Bugarian. WHO. 754- 766.
- 63. Pérez, T. (2015). Diferencias entre trigo blando y trigo duro. Recuperado el 4 de febrero de 2020, de Grupo Borau Sitio web: http://borauhermanos.com/diferencias-entre-trigo-blando-y-trigo-duro/
- 64. QUAKER. (2015). La avena, fuente de energía y vitalidad. Recuperado el 3 de febrero de 2020, de PEPSICO Sitio web: https://quaker.es/avena-beneficios
- 65. Real Academia Española (RAE), (2019) Trigo, Diccionario de la lengua española. Recuperado el 3 de febrero de 2020 23. a ed., versión 23.3 en línea. <a href="https://dle.rae.es">https://dle.rae.es</a>.
- 66. Real Academia Española (RAE), (2020) Producto a granel. Diccionario de la lengua española. Recuperado el 3 de febrero de 2020, 23. ª ed., versión 23.3 en línea. https://dej.rae.es/lema/producto-a-granel
- 67. Richard, J. L. (2007). Some major mycotoxins and their mycotoxicose An overview. International Journal of Food Microbiology. 119(1-2), 3-10.
- 68. Rodríguez B. L. A. (1996). Impact of agronomic factor on aflatoxin contamination in preharvest field corn in Northeastern México. Plant Disease 80:988-993.
- 69. Rodríguez B. L. A, Cantú A. M. A, and Reyes M. C. A. (2010). Effect of planting date and hybrid selection on *Helicoverpa zea* and *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) damage on maize ears in Northeastern México. Southwestern Entomologist 35:157-164.

- 70. Rojas C. O. L. Wilches F. A. M. 2009 Determinación de aflatoxinas en alimentos de mayor consumo infantil comercializados en la ciudad de Pamplona, norte de Santander. bistua: revista de la Facultad de Ciencias Básicas. 2009, 7(1), [fecha de consulta 20 de mayo de 2021]. issn: 0120-4211. disponible en: https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=90312171015
- 71. Sánchez, J. (2019). Partes de la semilla y sus funciones. Recuperado el 4 de febrero de 2020, de Ecología verde Sitio web: https://www.ecologiaverde.com/partes-de-la-semilla-y-sus-funciones-1973.html
- 72. SIAP. (2019). Food & agricultural overview, Agricultural atlas 2019. Recuperado el 3 de febrero de 2020, de Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera Sitio web: https://nube.siap.gob.mx/gobmx\_publicaciones\_siap/pag/2019/Agricultural-Atlas-2019
- 73. Soriano, J, M. (2007). Micotoxinas en alimentos. Trazabilidad y descontaminación/detoxificación de las micotoxinas. Díaz de Santos. España. p 119 al 132.
- 74. Suárez-Bonnet, M. Carvajal, I. Méndez-Ramírez, P. Castillo-Urueta, J. Cortés Eslava, S. Gómez-Arroyo, J.M. Melero-Vara, Aflatoxin (B1, B2, G1, and G2) contamination in rice of México and Spain, from local sources or imported: aflatoxins in rice., J. Food Sci. 78 (2013) T1822–T1829, https://doi.org/10.1111/ 1750-3841.12291
- 75. Tracy D. (2020). Mycology. Microscopy Art. Recuperado el 10 de Junio de 2020, de @under.the.scope Sitio web: https://www.tracylovesfungi.com/



- 76. USDA. (2019) World Agricultural Supply and Demand Estimates (WASDE).
- 77. Vargas, J. Frisvad, J.C., Samson, R. A., (2011) Two new aflatoxin producing species, and an overview of *Aspergillus* section *flavi*. Study micol 69: 57-80.
- 78. Vasanthi, S. y Bhat, R. V. (1998). Mycotoxins in foods-occurrence, health & economic significance and food control measures. Indian Journal of Medical Research. 108, 212-224.
- 79. Vega, O. (2012). Hongos micotoxigénicos y aflatoxinas en granos de maíz de diferentes orígenes geográficos de la república mexicana. Tesis para obtener el título de Ingeniero Agrónomo Parasitólogo. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Coahuila-México.
- 80. Vicam (1999). Mycotoxin testing system. Aflatest Somerville, M. A.
- 81. Vizcarra M, P. Perales R. C., Siever M. C. (2014). Presencia de aflatoxinas en alimento balanceado para perros (*Canis lupus familiaris*) comercializado a granel en mercados del distrito de barranco, Perú. científica 11 (3):185-193. https://doi.org/10.21142/cient.v11i3.196
- 82. World Health Organization-International Agency for Research on Cancer (WHO-IARC) (1993). Toxins derived from *Fusarium moniliforme*: fumonisins B1 and B2 and fusarin C. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. 56, 445-462.
- 83. Wu, F., Groopman, J. D. y Pestka, J. J. (2014). Public health impacts of foodborne mycotoxins. Annual Review of Food Science and Technology. 5, 351-372.



- 84. Whyte, R.O. (1964). Las Gramíneas en la Agricultura. Editora Nacional de Cuba
- 85. Yu, J. Bhatnagar, D. Erlich, k. (2002) Aflatoxin biosynthesis. Revista Iberoamericana de Micología 19: 191-200.
- 86. Zain, M. E. (2011). Impact of mycotoxins on humans and animals. Journal of Saudi Chemical Society. 15(29), 129-144.
- 87. 3M Petrifilm. (2010). Instrucciones del producto Aqua, Placa para recuento de mohos y levaduras. México.