



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE QUÍMICA

**Estudio comparativo, identificación y cuantificación de  
aflatoxinas, en nuez de Castilla (*Juglans regia* L.), nuez  
pecana (*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch) y  
marañón (*Anacardium occidentale* L.)  
de la Ciudad de México.**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO DE ALIMENTOS**

**PRESENTA**

**JOSÉ ADAYA GONZÁLEZ**



**MÉXICO, D.F.**

**2013**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**JURADO ASIGNADO**

**PRESIDENTE:** Dr. PEDRO VALLE VEGA  
**VOCAL:** Q.F.B. AUROA IRMA ORTEGON AVILA  
**SECRETARIO:** Dra. MAGDA CARVAJAL MORENO  
**1er. SUPLENTE:** Q.F.B. GLORIA GARCÍA RAMÍREZ  
**2° SUPLENTE:** M. en C. SILVIA CITLALLI GAMA GONZÁLEZ

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

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

**ASESOR DEL TEMA:**

DRA. MAGDA CARVAJAL MORENO

**SUSTENTANTE:**

JOSÉ ADAYA GONZÁLEZ

## DEDICATORIA

A mis padres, Dora y Abel.

“Dos buenos padres valen por mil maestros”.

A mi hermano, Abel, aunque no la quiera leer.

“No permitas que nadie diga que eres incapaz de hacer algo. Si tienes un sueño, debes conservarlo. Si quieres algo, sal a buscarlo, y punto. ¿Sabes? la gente que no logra conseguir sus sueños suele decirles a los demás que tampoco cumplirán los suyos”.

A mis tíos.

“Un buen ejemplo es mejor que un buen precepto”.

A mis amigos.

“¡Qué raro y maravilloso es ese fugaz instante en el que nos damos cuenta de que hemos descubierto un amigo!”

A mis profesores.

“Enseñar es un ejercicio de inmortalidad”

## AGRADECIMIENTOS

### **A las personas**

A mi asesora, la Dra. Magda Carvajal Moreno por permitirme trabajar en un proyecto a su lado, por su apoyo y enseñanzas.

Al M. en C. Francisco Rojo, por su apoyo con la cromatografía de líquidos.

A la Dra. Silvia Ruiz, del Instituto de Investigaciones en Matemáticas Aplicadas y en Sistemas (IIMAS) por los análisis estadísticos.

A Georgina Ortega Leite por su apoyo en la búsqueda de bases de datos.

A Carmen Loyola por apoyo en fotografía.

### **A las Instituciones**

Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por el apoyo de laboratorio, reactivos y equipo.

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

Al Instituto de Investigaciones en Matemáticas Aplicadas y en Sistemas (IIMAS) por los análisis estadísticos.

A la Biblioteca del Instituto de Biología por la enseñanza en búsqueda de bases de datos.

# ÍNDICE

Página

Jurado.....	ii
Dedicatoria.....	iii
Agradecimientos.....	iv
Lista de Tablas.....	vi
Lista de Figuras .....	vii
Resumen.....	viii
Abstract.....	ix
I. Introducción.....	1
I.1. Generalidades del cultivo de la nuez.....	1
I.1.1. Nuez de Castilla.....	1
I.1.2. Nuez pecana.....	2
I.1.3. Marañón.....	3
I.2. Importancia económica, producción y consumo.....	4
I.2.1. Producción y consumo mundial.....	4
I.2.2. Producción y consumo en México.....	6
I.3. Valor nutrimental de las tres nueces.....	8
I.4. Generalidades de las Aflatoxinas.....	9
I.4.1. Estructura química.....	12
I.4.2. Propiedades fisicoquímicas.....	12
I.4.3. Efectos en la salud humana.....	13
I.4.4. Aflatoxinas en nueces.....	15
I.4.5. Métodos de control, descontaminación y detoxificación.....	17
I.5. Determinación de AF por métodos analíticos.....	19
II. Hipótesis.....	21
III. Objetivos.....	22
III.1. General.....	22
III.2. Particulares.....	22
IV. Materiales y métodos.....	23
IV.1. Muestreo.....	23
IV.2. Análisis químico.....	24
IV.2.1. Determinación de solución base de 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ .....	24
IV.2.2. Derivatización.....	25
IV.2.3. Extracción de AF de las muestras.....	25
IV.3. Cuantificación de AF por HPLC.....	26
IV.4. Validación del método para cuantificación de AF en nueces.....	26
IV.5. Análisis estadístico.....	27
V. Resultados y discusión.....	28
V.1. Validación del método para cuantificación de AF en nueces.....	28
V.1.1. Selectividad.....	28
V.1.2. Linealidad.....	29
V.1.3. Cálculo de LOD y LOQ.....	34
V.1.4. Recuperación del método.....	35
V.2. Cuantificación de AF en las muestras por HPLC.....	35
V.3. Análisis estadístico.....	41
VI. Conclusiones.....	45
VII. Bibliografía.....	46

## LISTA DE TABLAS

Nº	Descripción	Pág.
1	Principales productores de nueces en el mundo en 2010 (FAO, 2012).....	5
2	Principales países consumidores de nuez en 2009 (FAOSTAT, 2012).....	5
3	Producción de nuez en México durante 2011 (SIAP, 2012).....	6
4	Producción de nuez de Castilla en México durante 2011 (SIAP, 2012).....	7
5	Producción de nuez pecana en México durante 2011 (SIAP, 2012).....	7
6	Producción de marañón en México durante 2011 (SIAP, 2012).....	7
7	Valor nutrimental de las nueces estudiadas por 100 g (Kendall <i>et al.</i> , 2010).....	8
8	Micotoxinas producidas por especies de <i>Aspergillus spp.</i> (Cabañes <i>et al.</i> , 2007)	10
9	Límites máximos para AF en varios países (Creppy, 2002).....	11
10	Muestreo de nueces en la Ciudad de México.....	23
11	Constantes de cada AF para obtener la concentración de Aflatoxinas totales.....	25
12	Puntos graficados para obtener la curva de calibración de AFB <sub>1</sub> ; n = 28.....	30
13	Puntos graficados para obtener la curva de calibración de AFB <sub>2</sub> ; n = 38.....	31
14	Puntos graficados para obtener la curva de calibración de AFG <sub>1</sub> ; n = 26.....	32
15	Puntos graficados para obtener la curva de calibración de AFG <sub>2</sub> ; n = 38.....	33
16	Parámetros de las curvas de calibración para cada aflatoxina.....	34
17	LOQ y LOD para las cuatro AF.....	34
18	Recuperación de AF en cada matriz.....	35
19	Concentración promedio de AF en las muestras ajustadas al porcentaje de recuperación (en ng g <sup>-1</sup> de muestra).....	36
20	Cálculo de consumo de AFt en diferentes presentaciones comerciales de nueces.....	40
21	Resultados de la prueba Kruskal-Wallis aplicada para encontrar diferencia significativa entre la Delegación de origen de las muestras.....	41
22	Resultados de la prueba Kruskal-Wallis aplicada para encontrar diferencia significativa entre los tipos de nuez.....	41

## LISTA DE FIGURAS

Nº	Descripción	Pág.
1	Nuez de Castilla, drupa en el árbol y semilla.....	1
2	Nuez pecana, drupa en el árbol y semilla.....	2
3	Marañón, fruto falso y drupa en el árbol y semilla.....	4
4	Estados productores de nueces en México.....	6
5	Colonia y conidióforos típicos del género <i>Aspergillus</i> .....	9
6	Aflatoxinas B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> y G <sub>2</sub> (Sweeney y Dobson, 1999).....	12
7	Las nueces como ingredientes de varios alimentos.....	16
8	Reacción de derivatización con TFA.....	20
9	Cromatogramas obtenidos del experimento de selectividad; 1. Blanco; 2. Nuez de Castilla; 3. Nuez pecana y 4. Marañón.....	28
10	Curva de calibración de AFB <sub>1</sub> . Pendiente (m) de 2.8299; coeficiente de correlación (R <sup>2</sup> ) de 0.9973.....	30
11	Curva de calibración de AFB <sub>2</sub> . Pendiente (m) de 1.7786; coeficiente de correlación (R <sup>2</sup> ) de 0.9908.....	31
12	Curva de calibración de AFG <sub>1</sub> . Pendiente (m) de 1.7607; coeficiente de correlación (R <sup>2</sup> ) de 0.9969.....	32
13	Curva de calibración de AFG <sub>2</sub> . Pendiente (m) de 1.247; coeficiente de correlación (R <sup>2</sup> ) de 0.9988.....	33
14	Concentración promedio de AFB <sub>1</sub> presente en las muestras estudiadas. Se graficó 0.01 ng g <sup>-1</sup> para las muestras con <LOD.....	37
15	Concentración promedio de AFt presente en las muestras estudiadas.....	38
16	Concentración promedio de las cuatro AF y AFt en nuez de Castilla, nuez pecana y marañón de la Ciudad de México.....	39
17	Contenido promedio de AFB <sub>1</sub> para muestras de nuez de Castilla. Los grupos con una letra (A, B, C, D) en común no presentan diferencia significativa, aquellos con letras diferentes sí presentan diferencia significativa (p<0.05).....	42
18	Contenido promedio de AF en las matrices estudiadas. Los grupos con una letra (A, B, C) en común no presentan diferencia significativa, aquellos con letras diferentes sí presentan diferencia significativa (p<0.05).....	43



## RESUMEN

Las aflatoxinas (AF) son un grupo de metabolitos secundarios tóxicos y cancerígenos producidos por cepas de mohos del género *Aspergillus*, el almacenamiento inadecuado de los alimentos proporcionan las condiciones favorables para la producción de AF, especialmente en oleaginosas como nuez, pistache, almendra, etc.

Los objetivos de esta investigación fueron identificar y cuantificar por un método validado las AF AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub> y AF totales (AFB<sub>1</sub> + AFB<sub>2</sub> + AFG<sub>1</sub> + AFG<sub>2</sub>) presentes en los tres tipos de nueces (nuez de Castilla, nuez pecana y marañón) más consumidos en México.

La presente investigación consistió en la obtención de muestras de nuez de Castilla, pecana y marañón de los tres principales mercados de cada una de las 16 Delegaciones de la Ciudad de México. Las muestras de nueces se homogenizaron y posteriormente se extrajeron las 4 AF por medio de columnas de inmunoafinidad. La identificación y cuantificación de las AF se llevó a cabo por medio de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). Mediante un análisis estadístico con la prueba no paramétrica de Wilcoxon/Kruskal-Wallis se compararon los factores de variación de origen de las muestras (Delegación donde se realizó el muestreo), tipo de AF y tipo de nuez.

Se validó el método de extracción y cuantificación de AF en nueces. Se comprobó que el método es selectivo y lineal, los porcentajes de recuperación de AF variaron de 75% a 95%. Los límites de detección de las AF (ng g<sup>-1</sup>), basados en las curvas de calibración fueron: AFB<sub>1</sub> (0.1), AFB<sub>2</sub> (0.01), AFG<sub>1</sub> (0.01) y AFG<sub>2</sub> (0.05).

Los resultados indican que de 50 muestras analizadas, el 22% presentan contaminación por AFB<sub>1</sub>, y el 100% está contaminado con AF totales (AFt). Las concentraciones promedio de AF en nuez de Castilla fueron 0.05 ng g<sup>-1</sup> de AFB<sub>1</sub>, 0.13 ng g<sup>-1</sup> de AFB<sub>2</sub>, 0.39 ng g<sup>-1</sup> de AFG<sub>1</sub>, 2.12 ng g<sup>-1</sup> de AFG<sub>2</sub> y 2.10 ng g<sup>-1</sup> de AFt. Para nuez pecana 0.09 ng g<sup>-1</sup>, 0.08 ng g<sup>-1</sup>, 0.12 ng g<sup>-1</sup>, 0.23 ng g<sup>-1</sup> y 0.44 ng g<sup>-1</sup> respectivamente; y para marañón 0.02 ng g<sup>-1</sup>, 0.05 ng g<sup>-1</sup>, 0.06 ng g<sup>-1</sup>, 1.23 ng g<sup>-1</sup> y 1.36 ng g<sup>-1</sup> respectivamente.

El análisis estadístico arrojó que la nuez de Castilla es significativamente ( $p < 0.05$ ) la más contaminada por AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> y AFG<sub>2</sub> y AFt. Las muestras de nueces de Castilla procedentes de las Delegaciones Tlalpan (0.23 ng g<sup>-1</sup>) y Coyoacán (0.26 ng g<sup>-1</sup>) son significativamente ( $p < 0.05$ ) las más contaminadas por AFB<sub>1</sub>. Para nuez pecana y marañón no se halló diferencia estadística entre Delegaciones para la contaminación por AFB<sub>1</sub> y AFt.

## ABSTRACT

Aflatoxins (AF) are a group of toxic and carcinogenic secondary metabolites produced by strains of *Aspergillus* molds, improper storage of foods provide favorable conditions for the production of AF, especially in oilseeds such as walnut, pistachio, almond etc.

The objectives of this research were to identify and quantify, by a validated method, AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub> and total aflatoxins (AFB<sub>1</sub> + AFB<sub>2</sub> + AFG<sub>1</sub> + AFG<sub>2</sub>) present in all three types of nuts (walnuts, pecans and cashews) that are the most consumed in Mexico.

This research involved sampling of walnut, pecan and cashew of the three main markets of each one of the 16 boroughs of Mexico City. Nuts samples were homogenized and then the 4 AF were extracted by immunoaffinity columns. The identification and quantification of the AF was conducted by high performance liquid chromatography (HPLC). Through a statistical analysis with the non-parametric Wilcoxon / Kruskal-Wallis test comparing the variation factors of the origin of samples (sampled borough), type of AF and type of nut.

Method of extraction and quantification of AF in nuts was validated. It was found that the method is selective and linear; the recovery percentages of AF varied from 75% to 95%. The detection limits of the AF (ng g<sup>-1</sup>), based on the calibration curves were: AFB<sub>1</sub> (0.1), AFB<sub>2</sub> (0.01) AFG<sub>1</sub> (0.01) and AFG<sub>2</sub> (0.05).

The results indicate that 50 samples analyzed, 22% are contaminated with AFB<sub>1</sub>, and 100% is contaminated with total aflatoxins (AFt). Average concentrations of AF in walnut were 0.05 ng g<sup>-1</sup> of AFB<sub>1</sub>, 0.13 ng g<sup>-1</sup> AFB<sub>2</sub>, 0.39 ng g<sup>-1</sup> AFG<sub>1</sub>, 2.12 ng g<sup>-1</sup> AFG<sub>2</sub> and 2.10 ng g<sup>-1</sup> of AFt. For pecan 0.09 ng g<sup>-1</sup>, 0.08 ng g<sup>-1</sup>, 0.12 ng g<sup>-1</sup>, 0.23 ng g<sup>-1</sup> and 0.44 ng g<sup>-1</sup> respectively, and for cashews 0.02 ng g<sup>-1</sup>, 0.05 ng g<sup>-1</sup>, 0.06 ng g<sup>-1</sup>, 1.23 ng g<sup>-1</sup> and 1.36 ng g<sup>-1</sup> respectively.

The statistical analysis showed that walnut is significantly (p <0.05) the most contaminated by AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub> and AFt. The walnut samples from the Tlalpan (0.23 ng g<sup>-1</sup>) and Coyoacan (0.26 ng g<sup>-1</sup>) boroughs are significantly (p <0.05) the most contaminated by AFB<sub>1</sub>. For pecans and cashews no statistical difference was found between boroughs for AFB<sub>1</sub> and AFt contamination.

## I. INTRODUCCIÓN

### I.1. Generalidades del cultivo de la nuez.

#### I.1.1. Nuez de Castilla

La nuez de Castilla (*Juglans regia* L.) pertenece a la familia Juglandaceae, que es nativa de Asia Menor al sureste de Europa, del Cáucaso a Turquía e Irán (Tsamouris *et al.*, 2002; Ciarmiello *et al.*, 2011) es un cultivo milenario que fue introducido en Europa antes de la época romana y en América hacia el siglo XVII, se cultiva por su madera, las hojas aromáticas y su fruto comestible.

Es un árbol caducifolio, de entre 25 a 35 metros de altura, el tronco puede superar los 2 m de diámetro y posee grandes hojas pinnadas (20 a 40 cm) compuestas de 5 a 9 folíolos rojizos al brotar y que se tornan verde oscuro. El tronco corto y robusto es blanquecino o gris claro, con gruesas ramas que forman una copa grande y redondeada. (Martínez *et al.*, 2010). Las flores femeninas forman un fruto globular de cáscara verde semi carnosa llamado popularmente "nuez", al estar rodeado de una envoltura carnosa y otra capa interior dura se le considera una drupa (**Figura 1**). Contiene en su interior a una semilla corrugada de color marrón que es la parte comestible y que los romanos llamaban "bellotas de Júpiter", (*Jovis glans*), de este término deriva el nombre genérico *Juglans*.



**Figura 1.** Nuez de castilla, drupa en el árbol (izquierda) y semilla (derecha).

La nuez de Castilla es un cultivo importante para la industria alimentaria: la semilla es consumida, fresca o tostada, sola o en otros productos comestibles. Es globalmente popular por su valor nutrimental, beneficios a la salud y atributos sensoriales, es un alimento denso en nutrientes, debido a su contenido de grasa, proteínas y su perfil de vitaminas y minerales (Martínez *et al.*, 2010). Asimismo, tiene una amplia variedad de

flavonoides, ácidos fenólicos y polifenoles. Aunque los compuestos fenólicos no tienen ninguna función nutricional conocida, son importantes para la salud humana debido a su función antioxidante, impiden la formación de nódulos de grasa (ateromas) en las arterias, son anti-inflamatorios y antimutágenos (Davis *et al.*, 2007).

### I.1.2. Nuez pecana.

La nuez pecana, nuez de la isla o nuez encarcelada, es una especie del género *Carya*, nativa del noreste de México (Chihuahua, Coahuila, Tamaulipas y Nuevo León) y sureste de Estados Unidos (Indiana, Iowa, Mississippi y Texas).

Es un árbol caducifolio, de la familia de las Juglandáceas. Crece de 30 a 42 m de altura. Las hojas son alternas, de 30-45 cm de largo, y pinnadas con 9-17 folíolos, cada folíolo de 5-12 cm de largo y 2-6 cm de grosor; las flores son unisexuales, ambos sexos nacen en racimos separados en el mismo árbol (Science Press & Missouri Botanical Garden Press, 1999).

El fruto es una drupa, de 2.5 a 4.5 cm de longitud. La nuez es de forma oblonga, lisa, de cáscara delgada y puntiaguda (**Figura 2**). Su periodo de desarrollo es de alrededor de siete meses (Gobierno de Chile, Ministerio de Agricultura, 2004).



**Figura 2.** Nuez pecana, drupa en el árbol (izquierda) y semilla (derecha).

La nuez pecana es fuente de ácidos grasos monoinsaturados y compuestos cardioprotectores, incluyendo esteroides vegetales, vitamina E, ácido fólico, calcio, magnesio, fósforo, zinc, vitaminas A y varias B. Además una porción aporta alrededor del 10% de la ingesta diaria recomendada de zinc y fibra (Griel *et al.*, 2006). Es un alimento libre de colesterol, con altos contenidos de proteínas, su contenido de ácido oleico es similar al

que poseen las mejores variedades de olivo para aceite (Gobierno de Chile, Ministerio de Agricultura, 2004).

### **I.1.3. Marañón.**

Su origen es la zona tropical de Brasil, pero se extiende por todos los trópicos de clima cálido y seco con temperaturas entre 21 y 28° C, desde el sur de México hasta Perú y Brasil, de Cuba a Trinidad. En Asia se le cultiva en la India y Malasia y prospera en lugares bajos cercanos a la costa (CONABIO, 2000).

Su fruto es muy apreciado y recibe distintos nombres según la región: anacardo en España; castaña de cajú en Uruguay, Argentina y Chile; cajuil en República Dominicana; cashew derivado del brasileño cajú en inglés Estados Unidos y Reino Unido; marañón en Perú, sureste de México, Colombia, Ecuador, Panamá, Nicaragua, Cuba y Centroamérica; merey en Venezuela; nuez de la India en el norte y centro de México no confundir con la verdadera "nuez de la India"; pajuil en Puerto Rico; jocote marañón en Guatemala, y le llaman pepas a las semillas ya secas en El Salvador.

Es un árbol perennifolio de 1.5 a 15 m de altura en su hábitat natural, y entre 12 y 20 m en plantaciones comerciales, con un diámetro de hasta 40 cm medido a la altura del pecho. Tiene hojas simples y alternas, obovadas o elípticas; lámina de 7 a 20 cm de largo por 4 a 12 cm de ancho, color verde azulado mate. Drupa de 2 a 4 cm de largo por 1 a 2.5 cm de ancho, gris o café, suspendida por pedicelo alargado y carnoso en forma de pera "fruto falso" (Mahecha *et al.*, 2004).

El pseudo fruto conocido como fruto del marañón, se forma del pedúnculo o receptáculo que es engrosado y jugoso, amarillo o rojo, y en el extremo se ubica la semilla que es una nuez en forma de riñón, gris y dura, conocida como marañón (**Figura 3**). El pedúnculo, usado como fruta fresca, es un cuerpo en forma de pera o esférico, de 4 a 8 cm de largo. El parénquima es amarillo y contiene un líquido azucarado y astringente rico en vitamina C. La nuez, de 2 a 3 cm de largo, tiene un pericarpio liso y brillante y el mesocarpio tiene espacios que contienen masas de aceites o gomas con cardol, sustancia cáustica y venenosa que se evapora calentando las nueces (FAO, 2006).

La nuez posee un contenido de ácido ascórbico superior al de las naranjas, pero es pobre en carotenos (0.32 ng/100 g) y vitamina A (0.37 – 1.07 UI/100 g), los ácidos grasos insaturados como el oleico y linoleico se encuentran por sobre el 80% de los otros ácidos

grasos presentes. Esta nuez es rica en vitaminas B1, B2, ácido pantoténico y minerales como magnesio (Sudzuki, 1996).



**Figura 3.** Marañón, fruto falso y drupa en el árbol (izquierda) y semilla (derecha).

En estudios bromatológicos del marañón se ha encontrado que sus niveles de proteína cruda son comparables con los de cacahuates y soya, y que el contenido de aminoácidos azufrados es mayor en el marañón. Los niveles de lisina y treonina son menores que los de la soya pero comparables a los niveles del cacahuete (Babatunde *et al.*, 1974).

## **I.2. Importancia económica, producción y consumo**

### **I.2.1. Producción y consumo mundial.**

La producción mundial de nueces con cáscara durante el 2010 fue de 2,545,388 ton y los principales países productores de nuez (**Tabla 1**) fueron China (1,060,600 ton), Estados Unidos (458,000 ton), Irán (270,300 ton), Turquía (178,142 ton), Ucrania (87,400 ton), México (76,627 ton), Rumania (34,359 ton), India (33,400 ton), Francia (30,460 ton) y Chile (30,000 ton).

Los países con mayor consumo de nueces por persona durante el año 2009 (**Tabla 2**) fueron: Líbano (15.9 kg), Maldivas (13.7 kg), Grecia (11.1 kg), Irán (10.2 kg), Siria (10.1 kg), Países Bajos (8.7 kg), España (8.6 kg), Suiza (8.4 kg), Italia (7.4 kg) y Austria (7 kg); México tuvo un consumo de 1.8 kg (FAO, 2012).

**Tabla 1.** Principales productores de nueces en el mundo en 2010 (FAO, 2012)

<b>País</b>	<b>Valor de la producción (USD)</b>	<b>Producción (Ton)</b>
China	1 646 714 000	1 060 600
Estados Unidos	7 11 102 000	458 000
Irán	419 674 000	270 300
Turquía	276 587 000	178 142
Ucrania	135 699 000	87 400
México	118 973 000	76 627
Rumania	53 346 000	34 359
India	51 857 000	33 400
Francia	47 292 000	30 460
Chile	46 578 000	30 000
Grecia	34 468 000	22 200
Serbia	33 255 000	21 419
Egipto	32 395 000	20 865
Uzbekistán	21 736 000	14 000
España	21 115 000	13 600
Belarús	20 960 000	13 500
Italia	20 494 000	13 200
Polonia	19 097 000	12 300
Alemania	18 942 000	12 200
República de Moldova	17 984 000	11 583

**Tabla 2.** Principales países consumidores de nuez en 2009 (FAO, 2012).

<b>País</b>	<b>kg/persona</b>
Líbano	15.9
Maldivas	13.7
Grecia	11.1
Irán	10.2
República Árabe Siria	10.1
Países Bajos	8.7
España	8.6
Suiza	8.4
Italia	7.4
Austria	7.0
Turquía	7.0
Bolivia	6.6
Israel	6.5
Alemania	6.4
Bélgica	6.1
Viet Nam	6.1
Túnez	5.6
Australia	5.5
Emiratos Árabes Unidos	5.4
México	1.8



### I.2.2. Producción y consumo en México

En 2011 se sembraron en México 97,411 Ha de las tres nueces estudiadas (**Tabla 3, Figura 4**) con una producción de 1,262 ton de nuez de Castilla con un valor de \$26,787,000 MN. La producción de nuez pecana fue de 95,078 ton con un valor de \$5,999,502,000 MN y la producción de marañón fue de 1,207 ton con valor de \$17,174,000 MN (SIAP, 2012).

**Tabla 3.** Producción de nuez en México durante 2011 (SIAP, 2012)

Variedad	Superficie sembrada (Ha)	Superficie cosechada (Ha)	Producción (Ton)	Rendimiento (Ton/Ha)	Precio medio rural por ton (pesos MN)	Valor producción (miles de pesos)
De Castilla	511.75	453.75	1,262.29	2.78	21,221.31	26,787.44
Pecana	95,667.52	67,458.16	95,078.08	1.41	63,100.79	5,999,502.08
Marañón	1,231.75	1,206.95	4,259.61	3.53	4,031.94	17,174.50



**Figura 4.** Estados productores de nueces en México

En 2009, México consumió 1.8 kg de nueces por persona y exportó 10,022 ton de nueces sin cáscara por \$ 58,787,000.00 MN y de nueces con cáscara fueron 38,031 ton con un precio de \$ 94,460,000.00 MN (FAO, 2012).



En las siguientes **Tablas (4, 5 y 6)** se muestran los principales Estados productores de nuez de Castilla, nuez pecana y marañón en México durante el 2011.

**Tabla 4.** Producción de nuez de Castilla en México durante 2011 (SIAP, 2012).

Ubicación	Superficie sembrada (Ha)	Superficie cosechada (Ha)	Producción (Ton)	Rendimiento (Ton/Ha)	Precio medio rural por ton (pesos MN)	Valor producción (miles de pesos)
Jalisco	219.0	204.0	680.0	3.3	20,214.6	13,745.3
Estado de México	52.0	52.0	222.1	4.3	28,968.3	6,433.9
Puebla	46.0	43.0	190.0	4.4	10,100.0	1,919.0
Guanajuato	34.0	30.0	68.4	2.3	34,491.2	2,359.2
Tamaulipas	59.5	59.5	43.7	0.7	8,076.9	352.8
Zacatecas	42.0	12.0	20.4	1.7	55,000.0	1,122.0
Oaxaca	30.0	30.0	14.8	0.5	7,006.5	104.0
Distrito Federal	3.3	3.3	14.0	4.3	24,620.5	344.7
Baja California	20.0	20.0	8.9	0.4	45,674.2	406.5
Nuevo León	6.0	0	0	0	0	0
<b>Total</b>	<b>511.75</b>	<b>453.75</b>	<b>1,262.29</b>	<b>2.78</b>	<b>21,221.3</b>	<b>26,787.44</b>

**Tabla 5.** Producción de nuez pecana en México durante 2011(SIAP, 2012).

Ubicación	Superficie sembrada (Ha)	Superficie cosechada (Ha)	Producción (ton)	Rendimiento (ton/Ha)	Precio medio rural por ton (pesos MN)	Valor producción (miles de pesos)
Chihuahua	58,811.0	38,284.3	56,539.6	1.5	71,689.1	4,053,271.8
Coahuila	16,251.1	12,691.6	14,030.0	1.1	59,864.7	839,903.8
Sonora	9,219.0	7,364.0	11,999.6	1.6	44,503.1	534,017.9
Durango	5,347.0	4,812.0	5,433.5	1.1	65,448.4	355,615.2
Hidalgo	1,026.2	901.7	3,314.5	3.7	24,408.6	80,902.4
Nuevo León	4,223.3	2,690.5	2,208.6	0.8	45,637.9	100,795.4
San Luis Potosí	101.0	100.0	472.0	4.7	19,533.9	9,220.0
Oaxaca	227.0	213.0	8426.0	2.0	14,210.0	6,053.4
Aguascalientes	232.0	177.0	378.0	2.1	41,823.4	15,808.4
Querétaro	133.0	133.0	186.2	1.4	12,493.7	2,326.3
Zacatecas	34.0	31.0	45.1	1.5	21,228.4	957.4
Guanajuato	60.0	60.0	45.0	0.8	14,000.0	630.0
Jalisco	3.0	0	0	0.0	0	0
<b>Total</b>	<b>95,667.52</b>	<b>67,458.16</b>	<b>95,078.08</b>	<b>1.41</b>	<b>63,100.8</b>	<b>5,999,502.08</b>

**Tabla 6.** Producción de marañón en México durante 2011 (SIAP, 2012).

Ubicación	Superficie sembrada (Ha)	Superficie cosechada (Ha)	Producción (ton)	Rendimiento (ton/Ha)	Precio medio rural por ton (pesos MN)	Valor producción (miles de pesos)
Campeche	839.8	815.0	3,884.0	4.8	3,956.8	15,368.0
Chiapas	349.0	349.0	221.8	0.6	5,036.8	1,117.1
Veracruz	30.0	30.0	89.5	3.0	5,366.7	480.3
Guerrero	13.0	13.0	64.3	5.0	3,250.3	209.1
<b>Total</b>	<b>1,231.75</b>	<b>1,206.95</b>	<b>4,259.61</b>	<b>3.53</b>	<b>4,031.9</b>	<b>17,174.50</b>

### I.3 Valor nutrimental de las tres nueces

En la siguiente tabla se muestra el valor nutrimental para los tres tipos de nueces estudiadas (**Tabla 7**).

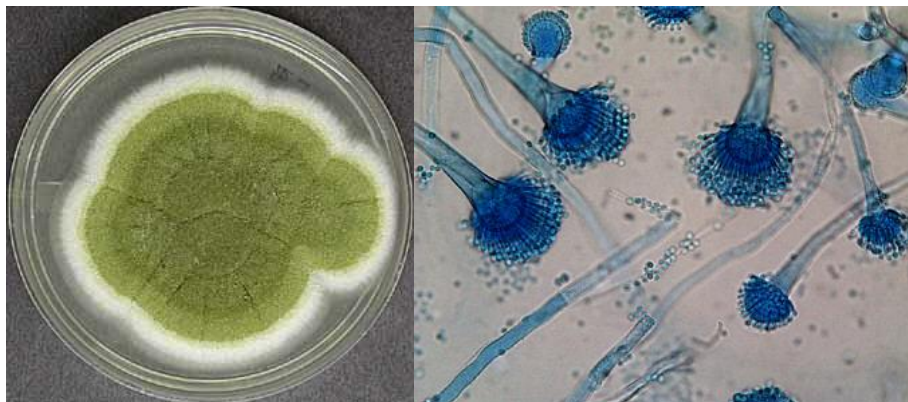
**Tabla 7.** Valor nutrimental de las nueces estudiadas por 100 g (Kendall *et al.*, 2010).

Nutrimento	Nuez de Castilla	Nuez pecana	Marañón
Aporte energético (kJ)	2725.4	2887.7	2313.0
Proteína (g)	15.1	9.2	18.3
Carbohidratos (g)	13.7	13.7	30.3
Fibra dietética total (g)	6.7	9.5	3.2
Azúcares totales (g)	2.5	3.9	6.0
Lípidos totales (g)	65.1	71.8	43.7
Ácidos grasos saturados (g)	6.0	6.3	7.7
Ácidos grasos monoinsaturados (g)	8.8	40.8	23.6
Ácidos grasos polinsaturados (g)	47.2	21.5	7.7
Fitoesteroles (mg)	71.8	101.8	157.7
Minerales (mg)			
Ca	98.6	70.4	35.2
Fe	2.8	2.5	6.7
Na	3.5	0.0	10.6
K	440.1	408.5	658.5
Mg	158.5	119.7	292.3
P	345.1	278.2	591.5
Zn	3.2	4.6	5.6
Cu	1.8	1.1	2.1
Mn	3.5	4.6	1.8
Se	4.9	3.9	19.7
Vitaminas (mg)			
Vitamina C	1.4	1.1	0.4
Tiamina	0.4	0.7	0.4
Niacina	1.1	1.1	1.1
Ácido pantoteico	0.7	0.7	0.7
Vitamina B <sub>6</sub> (µg)	0.7	0.4	0.4
Folatos totales (µg)	98.6	21.1	24.6
Vitamina A (IU)	21.1	56.3	0.0
Vitamina E (tocoferoles totales)	23.6	26.8	6.7
Aminoácidos esenciales (g)			
Isoleucina	0.7	0.4	0.7
Leucina	1.1	0.7	1.4
Lisina	0.4	0.4	1.1
Metionina	0.4	0.4	0.4
Fenilalanina	0.7	0.4	1.1
Treonina	0.7	0.4	0.7
Triptofano	0.0	0.0	0.4
Valina	0.7	0.4	1.1

#### I.4. Generalidades de las Aflatoxinas

Las micotoxinas son metabolitos secundarios de bajo peso molecular producidos por ciertas cepas de hongos filamentosos como *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*, que invaden cultivos en el campo y pueden crecer sobre alimentos durante el almacenamiento. Ninguna región del mundo escapa al problema de las micotoxinas y de acuerdo con Lawlor & Lynch (2005) y Okoli *et al.* (2006) se estima que las micotoxinas afectan anualmente más del 25% de los cultivos del mundo.

Los mohos del género *Aspergillus* spp (**Figura 5**). (*A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius* y *A. pseudotamarii*) se clasifican como microbiota fúngica de almacén, son capaces de crecer con contenidos de humedad bajos y alta presión osmótica (Sanchis *et al.*, 2007), se desarrollan en el suelo, vegetación en descomposición, heno y granos sometidos a deterioro microbiológico e invaden todos los tipos de sustratos orgánicos siempre que las condiciones de humedad y temperatura sean favorables.



**Figura 5.** Colonia y conidióforos típicos del género *Aspergillus*.

*A. flavus* y *A. parasiticus* crecen desde 10 a 43° C, con un óptimo entre 32 y 33° C y una actividad de agua ( $a_w$ ) de 0.99, estando la  $a_w$  mínima para su crecimiento entre 0.80 y 0.83 (ICMSF, 1996). Las especies de *Aspergillus* toleran mal los pH muy ácidos (2 a 3) y su crecimiento se ve menos afectado a valores de pH alcalinos (Sanchis *et al.*, 2007).

Las aflatoxinas (AF) son un grupo de metabolitos secundarios tóxicos y cancerígenos producidos por las cepas *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius*, *A. pseudotamarii* (Cheraghali *et al.*, 2007; Cortyl, 2008; Feizy *et al.*, 2010) y *A. bombycis* (Cabañes *et al.*, 2007) (**Tabla 8**). Las AF se forman al final de la fase exponencial o al principio de la fase estacionaria del crecimiento del moho (Soriano, 2007).

**Tabla 8.** Micotoxinas producidas por especies de *Aspergillus spp.* (Cabañes *et al.*, 2007).

<b>Especies</b>	<b>AFB<sub>1</sub></b>	<b>AFB<sub>2</sub></b>	<b>AFG<sub>1</sub></b>	<b>AFG<sub>2</sub></b>
<i>A. flavus</i>	+	+	-	-
<i>A. parasiticus</i>	+	+	+	+
<i>A. nomius</i>	+	+	+	+
<i>A. pseudotamarii</i>	+	+	-	-
<i>A. bombycis</i>	+	+	+	+

Las AF se producen a temperaturas entre 12 y 40° C y en el intervalo 0.95-0.99 de  $a_w$ , aunque se ha detallado un mínimo de 0.82 para *A. flavus* (Sanchis *et al.*, 2007), a una humedad relativa de 80-85% y un sustrato con humedad de 17% (Leeson *et al.*, 1995). El nivel más alto de AF producidas por *A. flavus* en caldo de cultivo se ha observado entre 25 y 30° C tras dos semanas de incubación (Sanchis *et al.*, 2007).

Los cultivos susceptibles de contaminación de mohos productores de AF son oleaginosas como nueces, semillas de algodón y pistache (Cheraghali *et al.*, 2007), cereales como maíz y arroz (Feizy *et al.*, 2010) y especias entre otros.

Las AF son compuestos fluorescentes, se clasifican químicamente como bisdihydro-furanocumarinas y su síntesis es por medio de la vía del policétido (Akande *et al.*, 2006). Dieciocho AF han sido identificadas, pero sólo cuatro de ellas han sido encontradas en alimentos y piensos: B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub> (Decastelli *et al.*, 2007); las otras AF (M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>, P<sub>1</sub>, Q<sub>1</sub>, G<sub>2a</sub>, B<sub>2a</sub>, aflatoxicol, etc.) son productos del metabolismo microbiano o de animales (Lindner, 1995). La Aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) es la más tóxica y ha sido clasificada como un cancerígeno del grupo 1 por IARC (2002) y con base en estudios epidemiológicos fue asociada con cáncer de hígado y hepatitis aguda (Park *et al.*, 2004).

Las AF son reguladas en más de 75 países. En la reglamentación mundial el rango de límites de tolerancia para AFB<sub>1</sub> es 1 a 20 µg kg<sup>-1</sup>, y para AF totales (AFt) de 0 a 35 µg kg<sup>-1</sup> (FAO, 2004). La Organización Mundial de la Salud (OMS), estableció el límite máximo permisible de 5 µg kg<sup>-1</sup> para la AFB<sub>1</sub> y de 10 µg kg<sup>-1</sup> para AFt (B<sub>1</sub>+B<sub>2</sub>+G<sub>1</sub>+G<sub>2</sub>), en varios géneros de alimentos (Papp *et al.*, 2002). El reglamento de la Comisión Europea establece límites de AFB<sub>1</sub> y AFt de 2 y 4 µg kg<sup>-1</sup> respectivamente en nueces, frutos secos y cereales desde 1998 (Comisión Directiva, 1998; Comisión Europea, 2010).

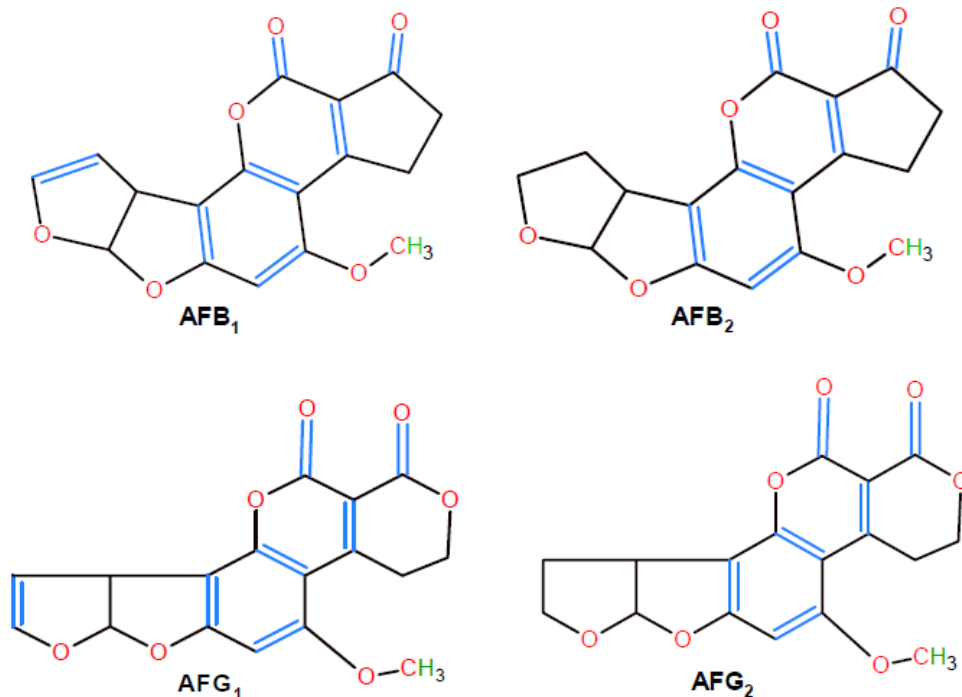
En México, la Norma Oficial Mexicana NOM-188-SSA1-2002, establece que los cereales para consumo humano no excederán los  $20 \mu\text{g kg}^{-1}$  de AFt. La norma NMX-FF-093-SCFI-2011, de carácter no obligatorio establece un límite máximo permisible para AFt de  $10 \mu\text{g kg}^{-1}$  en nuez pecana. La **Tabla 9** muestra los límites máximos permitidos para AF en diferentes países para varios alimentos.

**Tabla 9.** Límites máximos para AF en varios países (Creppy, 2002).

Aflatoxina	País	Límite máximo ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ o $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Alimentos	
B <sub>1</sub>	Finlandia	2	Todos	
	Alemania	2	Todos	
	Holanda	5	Todos	
	Bélgica	5	Todos	
	Portugal		25	Cacahuates
			5	Alimento para niños
			20	Otros
	Austria		1	Todos
			2	Cereales y nueces
	Suiza		1	Todos
			2	Maíz y cereales
	España	5	Todos	
	Luxemburgo	5	Todos	
	Irlanda	5	Todos	
Dinamarca	5	Todos		
Grecia	5	Todos		
B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> , G <sub>2</sub>	México	20	Cereales	
		10	Nuez pecana	
	Suecia	5	Todos	
	Noruega	5	Cacahuates, marañón	
	Finlandia	5	Todos	
	Alemania	4	Todos	
		0.05	Enzimas	
	Gran Bretaña	4	Nueces y frutos secos	
	Francia	10	Todos	
	Italia	50	Cacahuates	
	Austria	$5 (B_2+G_1+G_2)$	Todos	
		$0.02 (M_1+B_1+G_1+G_2)$	Alimento para niños	
	Suiza	$5 (B_2+G_1+G_2)$	Todos	
		0.01	Alimento para bebés	
	EUA	20	Todos	
	Bélgica	5	Cacahuates	
Bosnia	$1 (B_1+G_1)$	Cereales		
	5	Frijoles		

### I.4.1. Estructura química

Las AF son bis-dihidrofurano-cumarinas, y se les nombra B y G según los colores con que fluorescen, ya sea azul (Blue) o verde (Green) bajo la luz UV en cromatografía de capa fina (Sweeney & Dobson, 1999). La estructura química de las AF de tipo B se caracteriza por un anillo ciclopentanol y las AF de tipo G por un anillo de lactona. AFB<sub>1</sub> y AFG<sub>1</sub> presentan un doble enlace 8,9 en el anillo terminal de furano (Asao *et al.*, 1965; Büchi *et al.*, 1966), y AFB<sub>2</sub> y AFG<sub>2</sub> tienen un anillo bisfuranil saturado (Bhatnagar *et al.*, 2003) (**Figura 6**). Las AFB<sub>2</sub> y G<sub>2</sub> son derivados dihidroxi de AFB<sub>1</sub> y AFG<sub>1</sub> respectivamente, y son biológicamente inactivas hasta que son oxidadas a AFB<sub>1</sub> y AFG<sub>1</sub> *in vivo* (Baltaci *et al.*, 2012). Estas diferencias en la estructura química están asociadas con un cambio significativo en la actividad, AFB<sub>1</sub> y AFG<sub>1</sub> son cancerígenos probados y son considerablemente más tóxicas que las AFB<sub>2</sub> y AFG<sub>2</sub> (Van Egmond *et al.*, 1995).



**Figura 6.** Aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub> (Sweeney & Dobson, 1999).

### I.4.2. Propiedades fisicoquímicas

Como las AF exhiben una intensa fluorescencia al exponerse a luz UV de onda larga, se pueden detectar a concentraciones extremadamente bajas (alrededor de 0.5 ng o menos por mancha en cromatografías de capa fina). Las AF son solubles en disolventes no polares o medianamente polares como el cloroformo y metanol, especialmente en dimetil sulfóxido y son insolubles en agua (OPS,1983)

Las AF son termo-resistentes y estables a temperaturas elevadas, hasta 260° C la AFB<sub>1</sub> y llegando a 320° C la AFM<sub>1</sub>. Sin embargo, son inestables cuando se les expone a la luz, particularmente a la radiación UV. Las AF en cloroformo y en benceno son estables por muchos años si se mantienen en lugar oscuro y frío (OPS,1983).

Las AF resisten la cocción fermentación pasteurización, ultrapasteurización y la nixtamalización. Sin embargo pueden ser destruidas con un tratamiento drástico, como el calentamiento en autoclave en presencia de amoniacó ó hipoclorito.

La presencia del anillo de lactona en la estructura de las AF las hace susceptibles a la hidrólisis alcalina o nixtamalización (De longh *et al*, 1962). Cuando las AF se ponen en contacto con pH alcalino (8 a 12), el anillo de lactona se abre y se pierde la fluorescencia, esto hace pensar que no hay AF, sin embargo el anillo de lactona se recupera con un pH ácido (1 a 3) como el del ácido gástrico, y al regresar a un pH neutro, como sucede con el jugo pancreático en el intestino humano, fluorescen otra vez (Carvajal *et al.*, 2000). La presencia de proteínas, el pH y la duración de tratamiento pueden modificar los resultados (Beckwith *et al.*, 1975; Moctezuma, 2002). Si el tratamiento alcalino es leve, la acidificación invertirá la reacción, reconstruyendo la AF original.

#### **I.4.3. Efectos en la salud humana.**

Las micotoxinas están regularmente implicadas en síndromes tóxicos en animales y humanos (Charoenpornsook & Kavisarasai, 2006). Las micotoxinas son consideradas como riesgo para el consumidor de alimentos y piensos debido a la diversidad de sus efectos tóxicos y a sus propiedades sinérgicas (Okoli *et al.*, 2007; Omede, 2008). La AFB<sub>1</sub> es la toxina hepatotóxica y cancerígena más potente (Olsen *et al.*, 1988), es teratogénica causando malformaciones en fetos y es abortiva (Llewelyn *et al.*, 1977), es mutágena e inmunosupresora (McLean *et al.*, 1995; Pier & McLoughlin, 1985). Causan también debilitamiento de las paredes de venas y arterias y rompimiento de plaquetas lo que trae hemorragias internas (Eaton & Groopman, 1994). Las AF constituyen un peligro importante para la salud ya que han contaminado muchos productos básicos como cereales en todo el mundo (Yan *et al.*, 2004).

Las AF han sido implicadas en casos de envenenamiento, intoxicación aguda o aflatoxicosis (vómito, dolor abdominal, edema pulmonar, infiltración grasa e hígado graso y necrótico) (Shank, *et al.*, 1971), hasta enfermedades crónicas como cáncer de hígado en

humanos (Campbell & Salamat, 1971; Ross *et al.*, 1992; Wogan, 1992; Bottalico, 1999; Williams *et al.*, 2004; Azziz-Baumgartner *et al.*, 2005;).

Estudios llevados a cabo en África y Asia sobre la exposición humana a corto y a largo plazo a las AF, monitoreada por la contaminación de la dieta y la aparición de AF en fluidos biológicos (sangre, orina, leche), indica una correlación positiva entre la exposición y la incidencia de cáncer de hígado humano (Bottalico, 1999).

Otros síntomas crónicos producidos por AF son el síndrome de Reye que ocasiona encefalopatía y degeneración grasa del hígado (Reye *et al.*, 1963), marasmo y kwashiorkor (Apegyei *et al.*, 1982) y se asocian con desnutrición, hepatitis, cirrosis (Krishnamachari *et al.*, 1975) y fallas de crecimiento en niños (Gong *et al.*, 2004).

En 1970, al oeste de la India, se registraron envenenamientos por AF, por consumo de maíz contaminado con hongos y las personas murieron (Krishnamachari *et al.*, 1975). La histopatología de los hígados reveló una extensa proliferación de los conductos biliares, que es una lesión común en animales de laboratorio expuestos a AF (Bhat & Krishnamachari, 1977; Groopman & Kensler, 2005). En 1995, el consumo de fideos contaminados con AF ocasionó encefalopatía y daños hepáticos agudos en niños de Malasia (Lye *et al.*, 1995).

A principios de 1980 hubo 20 casos de aflatoxicosis aguda en Kenia, con 20% de mortalidad y se asoció al consumo de maíz contaminado con AF (Ngindu *et al.*, 1982). En una zona rural de Kenia, en 2005, hubo un brote de aflatoxicosis con 317 casos y 125 muertes, por ingestión de maíz contaminado con AF (Azziz-Baumgarther *et al.*, 2005).

Datos epidemiológicos han establecido que las AF son hepatotóxicas y potentes hepatocancerígenos para humanos (Ross *et al.*, 1992; IARC, 1993). El cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial. Más del 70% de todas las muertes por cáncer se producen en los países de ingresos medios y bajos, donde los recursos disponibles para la prevención, el diagnóstico y el tratamiento de la enfermedad son limitados o inexistentes (Schottenfield & Beebe-Dimmer, 2005). En 2005, de 58 millones de defunciones registradas en todo el mundo, 7.6 millones se debieron a cáncer (Coleman *et al.*, 1993; Tovar-Guzmán *et al.*, 2001; OMS, 2005; Schottenfield & Beebe-Dimmer, 2005). Entre los tipos de cáncer con mayor mortalidad están los de pulmón (17.8%), estómago (10.4%) e hígado (8.8%) (Ferlay *et al.*, 2004).

El hepatocarcinoma (HCC) primario es el quinto cáncer más común a nivel mundial, con un estimado de 473,000 nuevos casos anualmente, y ocasiona 600,000 muertes al



año (Groopman & Abbioni, 1991; Wogan, 1991; Wild & Hall, 2000; Kensler *et al.*, 2004). La incidencia de este cáncer varía en diferentes áreas del mundo, siendo los países de Asia y África los más afectados (Groopman & Abbioni, 1991; Wogan, 1991; Kirk *et al.*, 2006; Sommayura *et al.*, 2007). La edad media de diagnóstico y muerte por HCC está entre los 45 y 55 años (Kensler *et al.*, 2003). La mayoría de los pacientes sobrevive menos de un año después de la diagnosis (Wild & Hall, 2000).

Los tumores malignos de hígado representan el 1% del total de las defunciones en México y ocupan el lugar 19 en frecuencia dentro de las neoplasias malignas. Los tumores primarios malignos de hígado más frecuentes son el HCC y el colangiocarcinoma periférico que en conjunto ocupan más del 95% de los casos. La Organización Panamericana de la Salud (OPS, 2002) reporta que México es el primer lugar, en el continente Americano, en enfermedades hepáticas que van de hepatitis a cirrosis y HCC.

De las 64,000 muertes por cáncer en México, el HCC causa el 6.5% de defunciones en mujeres y el 7% de defunciones en hombres (OMS, 2005).

#### **I.4.4. Aflatoxinas en nueces**

La producción y el almacenamiento inadecuado de los alimentos brindan las condiciones favorables para la producción de AF, son consideradas contaminantes inevitables en arroz, trigo, pistache, nuez, almendra, etc. (Bottalico, 1999; Khoshpey *et al.*, 2011). Las nueces y sus productos son consumidos como bocadillo en sí mismos o como parte de los ingredientes de ciertos platillos en nuestra dieta diaria (**Figura 7**) (Leong *et al.*, 2010). De acuerdo a estudios previos, los niveles de AF no disminuyen por el cocimiento doméstico ya sea con horno de microondas u horno convencional de gas (Midio *et al.*, 2001), además, las nueces y sus productos están sujetos a temperaturas más bajas (Leong *et al.*, 2010).

Estudios realizados en frutos secos determinaron que las concentraciones máximas de AFB<sub>1</sub>, fueron detectadas bajo las condiciones de almacenamiento de 97% de humedad relativa (HR) y a temperaturas de 25 a 30° C. Sin embargo, en nueces almacenadas a 10° C con 97% de HR no se detectó presencia de AF, al igual que a 30° C y 75% de HR, en un lapso de 60 días (Arrus *et al.*, 2005).

Ocasionalmente se han detectado AF en nueces de Castilla, pecanas, marañón, almendras, pistaches y avellanas. La contaminación se produce cuando la nuez se encuentra todavía en el árbol y está dañada, sin embargo, pecanas aparentemente sanas

y sin daños pueden contener AF (Stoloff, 1976; McMeans, 1983). Koehler (1975) reporta a *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus* como hongos productores de AFB<sub>1</sub> y AFG<sub>1</sub> en nuez pecana.



**Figura 7.** Las nueces como ingrediente de varios alimentos.

En mercados de la ciudad santa de La Meca se encontró incidencia de AFt en nueces, 50% de las muestras de nuez de Castilla y 15% de muestras de marañón resultaron contaminadas con AFt (El tawila *et al.*, 2012).

En Malasia, 196 muestras de nueces y sus productos fueron evaluados, 16.3% presentaban contaminación con AFt de 17.2 a 350  $\mu\text{g kg}^{-1}$  (Leong *et al.*, 2010).

En Lodz, Polonia, se evaluaron 29 muestras de diferentes nueces obtenidas en el mercado local, 38% de las muestras resultaron contaminadas, la nuez de Castilla con 5.50  $\mu\text{g kg}^{-1}$  de AFt y 4.04  $\mu\text{g kg}^{-1}$  de AFB<sub>1</sub>; el marañón con 0.35  $\mu\text{g kg}^{-1}$  de AFB<sub>1</sub> (Leszczynska *et al.*, 2000).

El área de Rabat-Salé en Marruecos tuvo un 30% nuez de Castilla con AF, de las cuales una muestra con 2500  $\mu\text{g kg}^{-1}$  de AFB<sub>1</sub>. El 20% de las muestras de nuez de Castilla excedían el máximo límite tolerable (2  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) establecido para AFB<sub>1</sub> por regulaciones de EU (Juan *et al.*, 2008).

Luttfullah y Hussain (2011) de Pakistán, reportaron AFt en 40% de nueces de Castilla con cáscara y 70% en la nuez sin cáscara.

Se reportaron hongos micotoxigénicos en marañón (Pitt & Hocking, 1991; Pitt *et al.*, 1993) con AFG<sub>2</sub> detectada en las semillas (Freire *et al.*, 1999).

Aunque hay datos de la contaminación de AF en nueces en muchos países, se desconoce el aporte de AF que dan las nueces a la dieta del mexicano.

#### **I.4.5. Métodos de control, descontaminación y destoxificación**

Desde el punto de vista de prevención en campo existen varias opciones posibles, como la utilización de fungicidas, el empleo de variedades vegetales resistentes, la modificación genética de las plantas o la aplicación de estrategias biocompetitivas (Sanchis *et al.*, 2007).

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

El uso de conservadores sintéticos como el ácido acético, propiónico, sus sales y sus mezclas han demostrado ser efectivos en la prevención del crecimiento de *A. flavus* y *A. parasiticus* en estudios *in vitro* sobre maíz, trigo y otros sustratos (Sanchis *et al.*, 2007).

En arroz, el aceite esencial de pasto limón (con citral como componente mayoritario) presenta actividad fungistática y fungicida contra *A. flavus* a concentraciones

de 600 y 1000 ppm respectivamente, la síntesis de AF se anula a  $100 \text{ mg kg}^{-1}$  (Panagram *et al.*, 2003).

El aceite esencial de mostaza se ha utilizado con éxito en combinación con el uso de atmósferas modificadas en el envasado de pan de trigo y centeno para la inhibición del crecimiento de *A. flavus*, sin alteración evidente de las características sensoriales del producto (Suhr & Nielsen, 2005).

Se han identificado genotipos de maíz resistentes al ataque por *A. flavus*, como el denominado GT-MAS: gk que ha demostrado, en ensayos de campo, ser capaz de resistir la infección y producción de AF (Widstrom *et al.*, 1987). Del mismo modo se han caracterizado otros genotipos de cacahuete (Holbrook *et al.*, 1995) y almendras (Gradziel *et al.*, 1995) resistentes a la invasión por *A. flavus*.

Los hongos contaminantes de alimentos, al igual que la mayoría de los hongos filamentosos son aerobios estrictos (Pitt & Hocking, 1997), por lo anterior para evitar el crecimiento de los mohos, y por consiguiente, la producción de micotoxinas, se está implementando la utilización de atmósferas modificadas, logradas principalmente por el empleo de absorbentes de oxígeno, sustancias químicas introducidas en el envase con el fin de alterar la atmósfera en su interior al absorber el oxígeno existente y disminuir su concentración a menos de 0.01%. Así, se ha comprobado que la utilización de absorbentes de oxígeno ha sido capaz de inhibir, en medio sintético, tanto el crecimiento de *A. flavus* como la producción de AF, con independencia de los niveles de inóculo fúngico y temperaturas de almacenamiento ensayadas (Sanchis *et al.*, 2007).

Varios métodos de descontaminación han sido reportados, incluyendo métodos físicos, químicos o biológicos (Juan *et al.*, 2007). Los procesos físicos involucran la separación de las partes contaminadas, remoción de las aflatoxinas por extracción con disolventes o por el uso de adsorbentes como los aluminosilicatos de calcio y sodio hidratados (HSCAS) que presentan gran afinidad por AFB<sub>1</sub> permitiendo su eliminación en más de un 80% (Phillips *et al.*, 1988).

Dentro de los procesos físicos también se encuentra la inactivación por calor. El rango efectivo de temperaturas capaz de descomponer las AF se sitúa entre 237 y 306° C (Rastogi *et al.*, 2004), además influyen otros factores como humedad y pH del alimento (Juan *et al.*, 2007). Otro método de inactivación por calor es el calentamiento en horno de microondas (Herzallah *et al.*, 2008).

Otro de los procesos físicos de inactivación es la utilización de radiación. La luz UV es efectiva ya que las AF tienen un máximo de absorción a 362 nm, lo que permite obtener hasta 12 productos de fotodegradación que son menos tóxicos (Rodríguez *et al.*, 2003). Los rayos  $\gamma$  pueden reducir en un 75%, la presencia de AFB<sub>1</sub> en cacahuates (Juan *et al.*, 2007). Diversos estudios emplean radiación solar como fuente de luz UV, produciendo entre un 16 y 99% de destrucción de AF (El-Nezami *et al.*, 1995).

Dentro de los métodos químicos destacan la degradación de AFB<sub>1</sub> con cloro, peróxido de hidrógeno (Samarajeewa *et al.*, 1990), ozono, amoníaco, y ácidos (Herzallah *et al.*, 2008). El método químico más eficaz en piensos para animales es la amoniación, capaz de descomponer 95-98% de AFB<sub>1</sub>, este proceso es utilizado en varios países (Creppy, 2002). Otra alternativa es el uso de Oltipraz, un antiesquistosómico que bloquea la formación del epóxido e induce una mayor actividad en la enzima glutatión-S-transferasa (GST) que detoxifica las AF (Creppy, 2002).

Dentro de los métodos biológicos destaca el uso de la bacteria *Flavobacterium aurantiacum* B-184 que degrada irreversiblemente las AF en diversos alimentos como aceites, cacahuate, leche, maíz y verduras (Ciegler *et al.*, 1966; Lillehoj *et al.*, 1967).

### **I.5. Determinación de AF por métodos analíticos**

Para la identificación y cuantificación de las AF se han desarrollado diversos métodos inmunológicos (Groopman *et al.*, 1982; Fan & Chu, 1984; Groopman & Donahue, 1988; Hsieh *et al.*, 1988), químicos (Pestka, 1988; Horwitz *et al.*, 1975; Romer, 1975) y biológicos (Carnaghan *et al.*, 1963; Holzapfel *et al.*, 1966; Purchase, 1967).

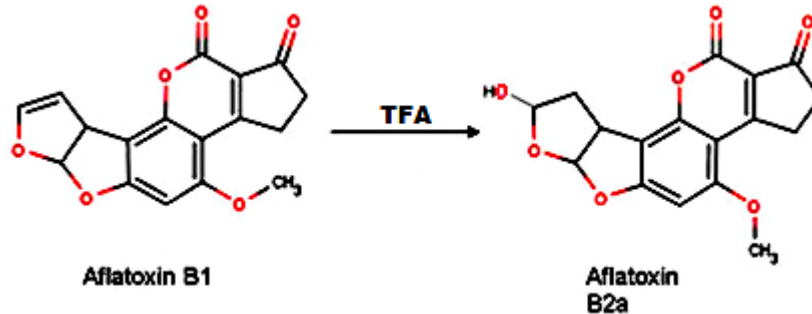
Dentro de los métodos químicos se encuentran los métodos analíticos que posibilitan la detección de las AF y su cuantificación. Los procedimientos analíticos para la determinación de AF han mejorado continuamente en los últimos años. Los métodos cromatográficos han sido utilizados ampliamente, así se tiene por ejemplo la cromatografía de capa fina (TLC), cromatografía de gases (GC), detección por captura de electrones (ECD) o detección selectiva de masa (MS), así como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Guattochi, 1992; Yen & Bidasee, 1993; Goda *et al.*, 2001; Sobolev & Dorner, 2002; Sobolev, 2007) con detección por UV, fluorescencia (Baltaci *et al.*, 2012) y también la espectrometría de masas (Binder, 2007; Frenich *et al.*, 2009).

El análisis cromatográfico de AF es precedido por una secuencia de operaciones complejas que incluyen el muestreo, la preparación de la muestra, extracción, purificación

y concentración del extracto obtenido después de la separación, cuantificación y validación (Jaimez *et al.*, 2000).

La columna empleada para analizar AF por HPLC es del tipo RP C<sub>18</sub> que es de gel de sílice (Garner *et al.*, 1993). Se emplea la cromatografía de partición o fase reversa (RP), y es importante el sistema de solventes que se usen. Para incrementar la fluorescencia de las AF, éstas se derivatizan con yodo, bromo o ácido trifluoroacético (TFA) (Kok, 1994).

La reacción que se lleva a cabo en la derivatización por TFA (**Figura 8**) es la transformación de AFB<sub>1</sub> y AFG<sub>1</sub> (no fluorescentes) en sus hemiacetales B<sub>2a</sub> y G<sub>2a</sub> (altamente fluorescentes). AFB<sub>2</sub> y AFG<sub>2</sub> no son afectadas por esta reacción debido a su estructura saturada (Takahashi, 1977).



**Figura 8.** Reacción de derivatización con TFA.

## II. HIPÓTESIS

Si se ha encontrado que las AF son contaminantes inevitables en nueces, y además estudios específicos en otros países han reportado niveles altos de dichas micotoxinas en nuez de Castilla, pecana y marañón, entonces las nueces que se consumen en la Ciudad de México presentarán contaminación con estas toxinas y será posible detectarlas y cuantificarlas.

### III. OBJETIVOS

#### III.1. General

Purificar, identificar y cuantificar las aflatoxinas (AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> y AFG<sub>2</sub>) en muestras de nuez de Castilla, nuez pecana y marañón de la Ciudad de México.

#### III.2. Particulares

- Validación del método de cuantificación de AF para las tres nueces.
- Elaborar la curva patrón para cada una de las AF estudiadas.
- Extraer y purificar las AF presentes en nuez de Castilla, nuez pecana y marañón.
- Cuantificar las AF (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub>) por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) en las tres nueces estudiadas.
- Comparar estadísticamente el contenido de AF de nuez de Castilla, nuez pecana y marañón.
- Cotejar el contenido de AF de las tres nueces con el límite permitido en la Norma Oficial Mexicana para alimentos en general.



## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

### IV.1. Muestreo

Se muestrearon 50 g de cada uno de los 3 tipos de nuez en 3 mercados de las 16 Delegaciones de la Ciudad de México, se escogieron los tres mercados más grandes e importantes de cada Delegación. Se hicieron muestras compuestas del mismo tipo de nuez por Delegación al mezclar 17 g de muestra molida y homogeneizada por mercado, para obtener 51 g.

**Tabla 10.** Muestreo de nueces de la Ciudad de México.

Fecha en 2012	Delegación	Mercado	Tipo de nueces
30/ago	Álvaro Obregón	Corpus Christi. La Paz esq. con San Luis. Col. Corpus Christi. CP. 01530.	De Castilla, pecana y marañón
		Olivar del Conde. Agustín Lara esq. con Callejón del Mercado. Col. Olivar del Conde 2da. Sección. CP. 01408.	
		Melchor Múzquiz. Av. Revolución esq. con Melchor Múzquiz. Col. San Ángel. CP. 01000.	
19/sep	Azcapotzalco	Azcapotzalco. Esperanza esq. con Av. Azcapotzalco. Col. Barrio San Simón. CP. 02009.	Pecana y marañón
		Prohogar. Calle 12 esq. con Calle 19. Col. Prohogar. CP. 02600.	
30/ago	Benito Juárez	Nueva Santa María. Vid esq. con Av. Clavelinas. Col. Nueva Santa María. CP. 02800.	De Castilla, pecana y marañón
		Portales. Libertad esq. con Juan Escutia. Col. Portales. CP. 03300.	
		Mixcoac. Av. Revolución esq. con Molinos. Col. Mixcoac. CP. 03910.	
		Independencia. Calle Zempoala esq. con Eje 6 Sur. Col. Independencia. CP. 03630.	
29/ago	Coyoacán	Coyoacán. Malitzin esq. con Ignacio Allende. Col. Del Carmen. CP. 04100.	De Castilla, pecana y marañón
		Ajusco-Moctezuma. Mixtecas 92. Col. Ajusco. CP. 04300. DF	
		Santo Domingo "Las Rosas". Papalotl s/n. Col. Pedregal Santo Domingo. CP. 04369.	
13/sep	Cuajimalpa	Rosas Torres. San José de los Cedros esq. con Sauce. Col. San José de los Cedros. CP. 05200.	Pecana.
		Cuajimalpa. Veracruz esq. con Ocampo. Col. Manzanito. CP. 05040.	
		Contadero. Av. 16 de septiembre esq. con Mariano Escobedo. Col. Loma de la papa. CP. 05088.	
6/sep	Cuauhtémoc	Arcos de Belén. Arcos de Belén esq. con Dr. Valenzuela. Col. Centro. CP. 06010.	De Castilla, pecana y marañón
		San Juan. Calle Ernesto Pugibet 71. Col. Centro. CP. 06010.	Pecana y marañón.
		Hidalgo. Av. Dr. Balmis esq. Dr. Barragán. Col. Obrera. CP. 06800.	
19/sep	Gustavo A. Madero	Río Blanco. Oriente 95 esq. con Av. H. Congreso de la Unión. Col. Mártires de Río Blanco. CP. 07880.	Pecana
		La Estrella. Obsidiana esq. con Escuela. Col. Estrella. CP. 07810.	De Castilla, pecana y marañón
		Martín Carrera. José J. Herrera esq. Gral. Vicente Guerrero. Col. Martín Carrera. CP. 07070.	Pecana y marañón
26/sep	Iztacalco	San Miguel Iztacalco. Eje 3 Ote. Francisco del Paso y Troncoso esq. con Julio García. Col. Barrio de San Miguel. CP. 08650	De Castilla, pecana y marañón
		Santa Anita. Eje 1 Ote esq. Av. Andrés Molina Enríquez. Col. Viaducto Piedad. CP. 08200	
		Tlacotal. Calle Ote 100 esq. Sur 123. Col. Gabriel Ramos Millán. CP. 08730	

Tabla 10: Continuación.

Fecha en 2012	Delegación	Mercado	Tipo de nueces
26/sep	Iztapalapa	Central de Abasto. Eje 6 Sur esq. Río Churubusco. Col. Central de Abasto. CP. 09040	De Castilla, pecana y marañón
		Santa Cruz Meyehualco. Calle 55 esq. Calle 4. Col. Santa Cruz Meyehualco. CP. 09290	
		Jacarandas. Calle Manlio Fabio Altamirano. Col. Jacarandas. CP. 09280	
12/sep	La Magdalena Contreras	Cerro del Judío. San Bernabé esq. Independencia. Col. Barros Sierra. CP. 10380	Pecana
		La Loma. José Moreno Salido esq. Fresno. Col. Pueblo Nuevo Bajo. CP. 10640	
		Turístico La Magdalena. Magdalena esq. con Emilio Carranza. Col. Rancho Totolapan. CP. 56580	
12/sep	Miguel Hidalgo	Tacubaya. Arquitecto Carlos Lazo esq. con Arq. Luis Ruiz. Col. Observatorio. CP. 11860	De Castilla y nuez pecana
		Plutarco Elías Calles, "El Chorrillo". Melchor Muzquiz esq. con Parque Lira. Col. San Miguel Chapultepec. CP. 11850	De Castilla, pecana y marañón
		Argentina. Lago Atitlán esq. con Lago Viedma. Col. México Nuevo. CP. 11260	
5/sep	Milpa Alta	San Antonio Tecómitl. Calle 5 mayo Col. San Antonio Tecómitl. CP. 12100	Pecana y marañón
		Benito Juárez. Yucatán sur. Col. Villa Milpa Alta. CP. 12000	
		San Pedro Atocpan. Francisco I. Madero. Col. San Pedro Atocpan. CP. 12200	
27/sep	Tláhuac	Colonia del Mar. Calle Camarón. Col. del Mar. CP. 13270	De Castilla, pecana y marañón
		La Nopalera. Calle Falsta. Col. La Nopalera. CP. 13220	
		Tláhuac. General Severino Cisneros. Col. La Magdalena. CP. 13070	
6/sep	Tlalpan	Torres de Padierna. Calle Tixpehual Torres de Padierna CP. 14209	De Castilla, pecana y marañón
		Tlalcoligía. Cristóbal Colón. Col. Tlalcoligía. CP. 14430	
		De la luz. Calle Francisco I. Madero. Col. Tlalpan Centro. CP. 14000	
20/sep	Venustiano Carranza	San Ciprián. Av. Gral. Anaya esq. San Ciprián. El Parque. CP. 15960	De Castilla, pecana y marañón
		Jamaica. Av. H. Congreso de la Unión esq. con Av. Morelos. Col. Jamaica. CP. 15800.	
		La Merced. Eje 1 Ote. Anillo de Circunvalación esq. con Av. Adolfo Gurrión. Col. Merced Balbuena. CP. 15810.	
5/sep	Xochimilco	Xochimilco. Av. José María Morelos esq. con Vicente Guerrero. Col. Barrio El Rosario. CP. 16070	De Castilla, pecana y marañón
		San Gregorio Atlapulco. Calle Belisario Domínguez. Col. San Gregorio Atlapulco. CP. 16600	
		Tulyehualco. Av. División del Norte. Col. Santiago Tulyehualco. CP. 16700	

## IV.2. Análisis químico

### IV.2.1. Determinación de una solución base de AFB<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub> de un µg mL<sup>-1</sup>

A un vial con una cantidad desconocida de patrón de cada AF se le agregó 1 mL de metanol (MeOH), (si el patrón de AF era nuevo se le agregaba una disolución de benceno:acetonitrilo 98:2 v/v), se midió su absorbancia en un espectrofotómetro (Thermo modelo Genesys 10 UV) a una longitud de onda de 362 nm con una celda de cuarzo utilizando metanol como blanco, una vez obtenida la absorbancia se calculó su concentración con la siguiente ecuación:

$$\text{Concentración } (\mu\text{g mL}^{-1}) = \frac{\text{Absorbancia a 362 nm} \times \text{Peso molecular}}{\text{Coeficiente de extinción}}$$

**Tabla 11.** Constantes de cada AF para obtener la concentración de Aflatoxinas totales.

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

A partir de estas disoluciones de concentración conocida se preparó 1 mL de solución base a una concentración de 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de cada AF.

#### IV.2.2. Derivatización

Los estándares de cada AF secos se resuspendieron con 200  $\mu\text{L}$  de acetonitrilo (ACN), y con objeto de aumentar su fluorescencia se les adicionaron 800  $\mu\text{L}$  de solución derivatizante. La solución derivatizante consistió en 5 mL de ácido trifluoroacético (TFA) (Sigma-Aldrich, St. Louis MO, USA) más 2.5 mL ácido acético glacial (Merck, Naucalpan, Edo. Mex., México) y 17.5 mL de agua desionizada para obtener una concentración final de TFA de 20% (v/v), se agitó la mezcla en un agitador orbital (Vortex G-560, Bohemia, N.Y., EEUU) por 30 segundos.

Los viales se mantuvieron en un baño María a 65 °C por 10 minutos según describen Akiyama *et al.* (2001) y Kok (1994). Posteriormente se llevaron a temperatura ambiente y se inyectaron en el HPLC para su análisis.

#### IV.2.3. Extracción de AF de las muestras

Las muestras de nuez de Castilla, nuez pecana y marañón se molieron en una licuadora (Black & Decker Crush Master, mod. V2350BP), se pesaron 17 g de cada muestra y las del mismo tipo de nuez y misma Delegación se juntaron en una muestra compuesta para obtener un peso de 51 g. Las muestras compuestas se molieron en la licuadora a máxima potencia con 100 mL de una solución al 80% metanol/agua (80:20 v/v) y 1 g de NaCl por 2 minutos.

Las muestras se filtraron con un embudo Büchner adaptado a una bomba de vacío, se recuperó el filtrado. Se tomaron 2 mL del filtrado y se diluyeron con 14 mL de solución

salina de buffer de fosfatos (PBS) a un pH de 7.4. La solución resultante se inyectó a una columna de inmunoafinidad (Easi-Extract Aflatoxin R-Biopharm Rhône Ltd) para AF totales previamente activada. Se lavó la columna con 20 mL de agua destilada a un flujo de 5 mL por minuto. Se secó al pasar aire por el gel de agarosa de la columna. Se recibió el eluido en un vial al pasar 1.5 mL de metanol HPLC en forma lenta a un flujo de una gota por segundo. Se jala el émbolo de la jeringa tres veces para romper y desnaturalizar todo el gel de agarosa con los anticuerpos contra Aft, y que pasen al eluido todas las AF unidas a él. Finalmente se pasan 1.5 mL de agua destilada por la columna de inmunoafinidad para dar un volumen total del eluido de 3 mL. El eluido se secó a 40°C, y se derivatizó como se indicó anteriormente.

#### **IV.3. Cuantificación de AF por HPLC**

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

Las condiciones de análisis fueron:

- a) Fase móvil H<sub>2</sub>O/ACN/MeOH (65:15:20 v/v/v).
- b) Inyección de 60 µL
- c) Flujo 1 mL min<sup>-1</sup>
- d) Tiempo de análisis 20 min
- e) Longitud de onda de excitación 362 nm
- f) Longitud de onda de emisión 425 para AFB<sub>1</sub> y AFB<sub>2</sub> y 450 nm para AFG<sub>1</sub> y AFG<sub>2</sub>

#### **IV.4. Validación del método para cuantificación de AF en nueces.**

Validación es la confirmación mediante el suministro de evidencia objetiva de que se han cumplido los requisitos para una utilización o aplicación específica prevista de un método analítico (IRAM 32, 1997). El procedimiento de validación se realizó de acuerdo con la Comisión de Regulación 2004/882 EC y consta de las siguientes etapas:

1. **Selectividad.** Es el grado al cual el método puede determinar al analito, sin interferencia de la matriz. Este parámetro estudia la capacidad del método de distinguir el analito de cualquier otra interferencia presente en las muestras que se analizan. Para verificar que ninguna interferencia coincide en la región de elución del analito de interés se analizaron un blanco (mezcla de las cuatro AF) y los extractos obtenidos de las tres matrices después de enriquecerlas con las mismas AF, las cuatro determinaciones se sometieron al proceso de extracción de AF descrito anteriormente y se compararon los cromatogramas resultantes.
2. **Linealidad.** Es la aptitud para obtener resultados proporcionales a la concentración de analito. Se checó analizando soluciones estándar de cada AF a diferentes concentraciones (0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 200, 600, 800 y 1000 ng mL<sup>-1</sup>) con objeto de conocer el siguiente punto de la validación correspondiente a los límites de detección y de cuantificación. Las curvas de calibración se construyeron graficando las áreas de los picos contra las concentraciones de cada solución estándar de AF.
3. **Límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ).** El límite de detección se determinó visualmente identificando la mínima concentración a la cual se detecta una señal en el análisis por HPLC. El LOQ se calcula con base en los resultados de las curvas de calibración y es de alrededor de 5 veces el LOD (MSCR, 2002).
4. **Porcentaje de recuperación.** Es la eficiencia del método para detectar todo el analito presente en una muestra. Se fortificó cada matriz con 100 ng g<sup>-1</sup> de analito antes del análisis, se siguió el procedimiento de extracción descrito anteriormente y se calculó el porcentaje recuperado para ajustar las concentraciones de AF obtenidas en las muestras. Este parámetro de validación del método es muy importante para realizar los ajustes en las cantidades de AF de las diferentes muestras y así obtener los resultados reales de las mismas.

#### IV.5. Análisis estadístico.

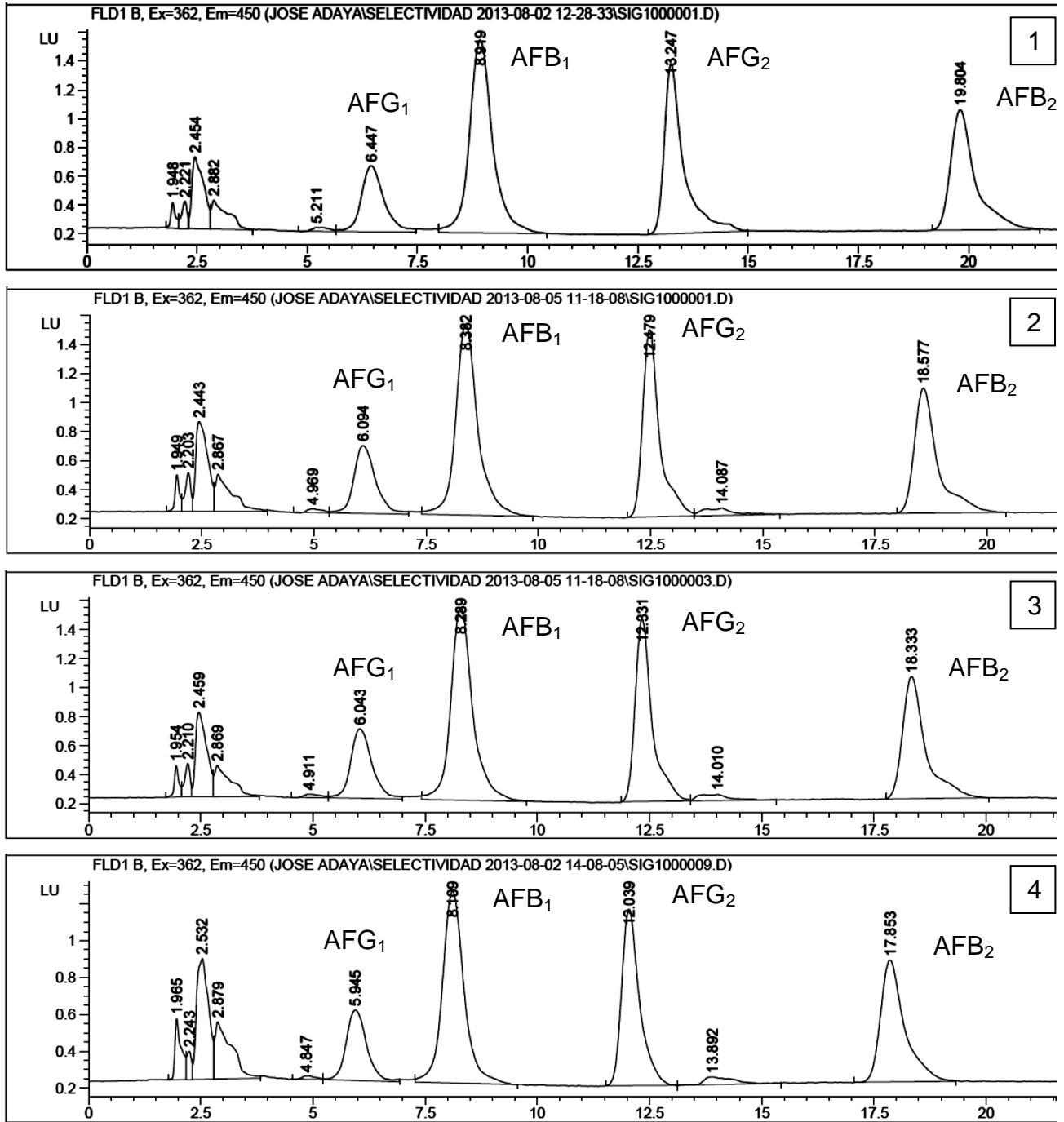
Se compararon los resultados ajustados con el porcentaje de recuperación con la finalidad de hallar diferencias significativas en la cantidad y tipo de AF entre las muestras de las Delegaciones de la Ciudad de México y entre los tres tipos de nuez estudiados; para ello se realizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y posteriormente la prueba de rangos de Wilcoxon para encontrar entre qué grupos estaban las diferencias.

## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### V.1. Validación del método para cuantificación de AF en nueces.

#### V.1.1. Selectividad

A continuación se muestran los cromatogramas obtenidos después de enriquecer las tres matrices con las cuatro AF y el blanco. El experimento se realizó por triplicado.



**Figura 9.** Cromatogramas obtenidos del experimento de selectividad; 1. Blanco; 2. Nuez de Castilla; 3. Nuez pecana y 4. Marañón.

En la **Figura 9** se observa que el orden de elución de los analitos no se modifica por acción de las diferentes matrices. El tiempo de retención ( $t_r$ ) tampoco se modifica significativamente. Se observa también que entre los cuatro analitos no hay solapamiento ni con ningún compuesto de la matriz.

### V.1.2. Linealidad

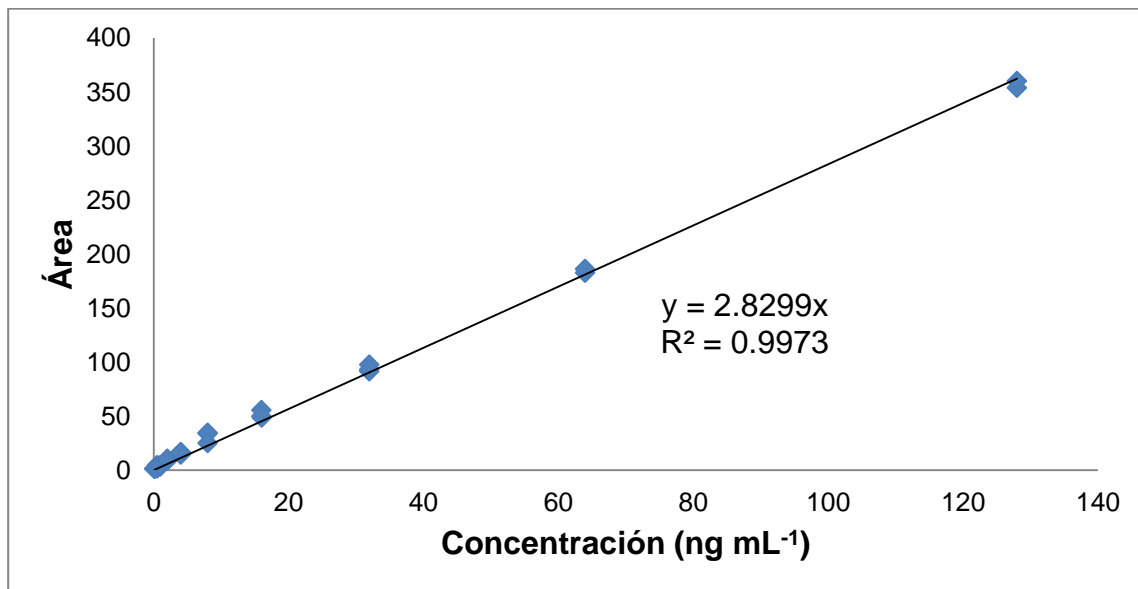
Las soluciones estándar que presentaron resultados positivos fueron: de AFB<sub>1</sub> (0.1, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 y 128 ng mL<sup>-1</sup>), AFB<sub>2</sub> (0.01, 0.05, 1, 5, 10, 20, 40, 70, 100 y 200 ng mL<sup>-1</sup>), AFG<sub>1</sub> (0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 4, 16, 100 y 128 ng mL<sup>-1</sup>) y AFG<sub>2</sub> (0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 600, 800 y 100 ng mL<sup>-1</sup>). En las siguientes **Tablas (12 a 15)** y **Figuras (10 a 13)** se presentan las curvas de calibración para cada AF y se reportan los parámetros de la recta obtenida.

### Curva de AFB<sub>1</sub>.

Los puntos graficados (**Tabla 12**) y la curva de calibración (**Figura 10**) se presentan a continuación.

**Tabla 12.** Puntos graficados para obtener la curva de calibración de AFB<sub>1</sub>; n = 28.

Concentración (ng mL <sup>-1</sup> )	Área	tr (min)	Área	tr (min)	Área	tr (min)
0.1	1.3	8.263	1.3	8.51	1.3	8.448
0.5	4.5	8.158	1.9	7.977	1.7	8.117
1	3.4	9.478	3.7	7.985	4.5	7.886
2	10.6	7.894	8.6	7.827	9.7	7.804
4	16.7	7.781	14.4	7.769	15.7	7.709
8	34	7.774	34.4	7.758	25.1	7.808
16	48.7	7.759	55.6	7.759	49.9	7.747
32	91.3	7.74	97.5	7.741	93.1	7.746
64	182.6	7.75	186.2	7.75	-	-
128	353.9	7.739	360.2	7.745	-	-



**Figura 10.** Curva de calibración de AFB<sub>1</sub>. Pendiente (m) de 2.8299; coeficiente de correlación ( $R^2$ ) de 0.9973.

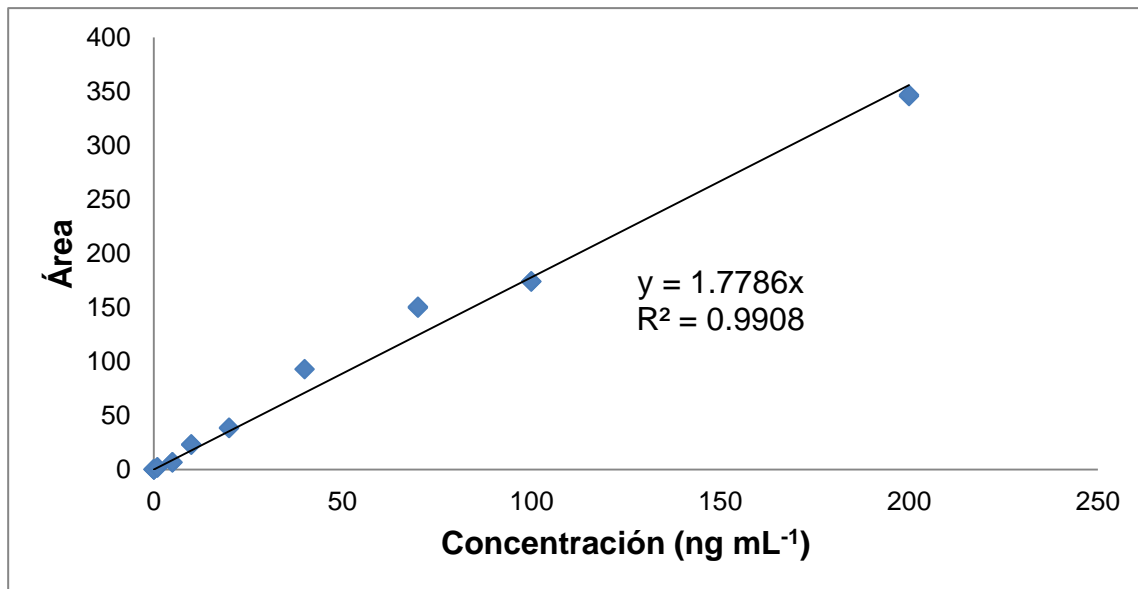


### Curva de AFB<sub>2</sub>.

Los puntos graficados (**Tabla 13**) y la curva de calibración (**Figura 11**) se presentan a continuación.

**Tabla 13.** Puntos graficados para obtener la curva de calibración de AFB<sub>2</sub>; n = 38.

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



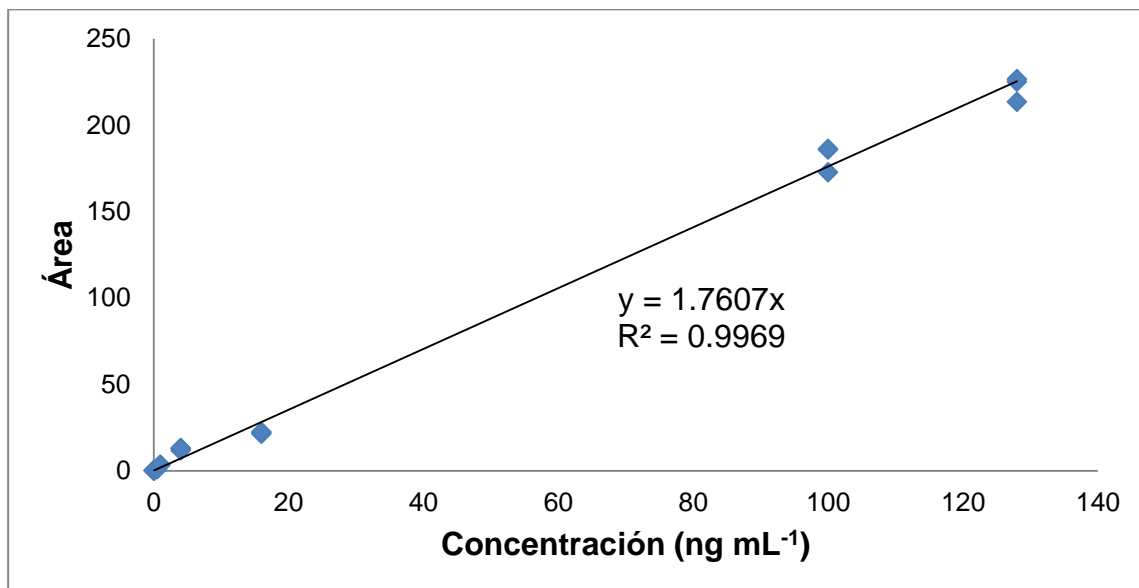
**Figura 11.** Curva de calibración de AFB<sub>2</sub>. Pendiente (m) de 1.7786; coeficiente de correlación ( $R^2$ ) de 0.9908.

### Curva de AFG<sub>1</sub>.

Los puntos graficados (**Tabla 14**) y la curva de calibración (**Figura 12**) se presentan a continuación.

**Tabla 14.** Puntos graficados para obtener la curva de calibración de AFG<sub>1</sub>; n = 26.

Concentración (ng mL <sup>-1</sup> )	Área	tr (min)	Área	tr (min)	Área	tr (min)
0.01	0.07	5.930	0.03	5.870	0.05	5.795
0.05	0.16	5.868	0.13	5.883	-	-
0.1	0.2	5.833	0.22	5.863	0.27	5.794
0.5	0.89	5.753	1	5.642	0.98	5.772
1	3.1	5.784	3.3	5.690	3.3	5.732
4	11.6	5.797	12.9	5.720	12.9	5.710
16	22.2	5.778	21.3	5.795	22.3	5.818
100	172.7	5.865	185.7	5.852	186.2	5.830
128	213.4	5.864	225.1	5.835	226.6	5.831



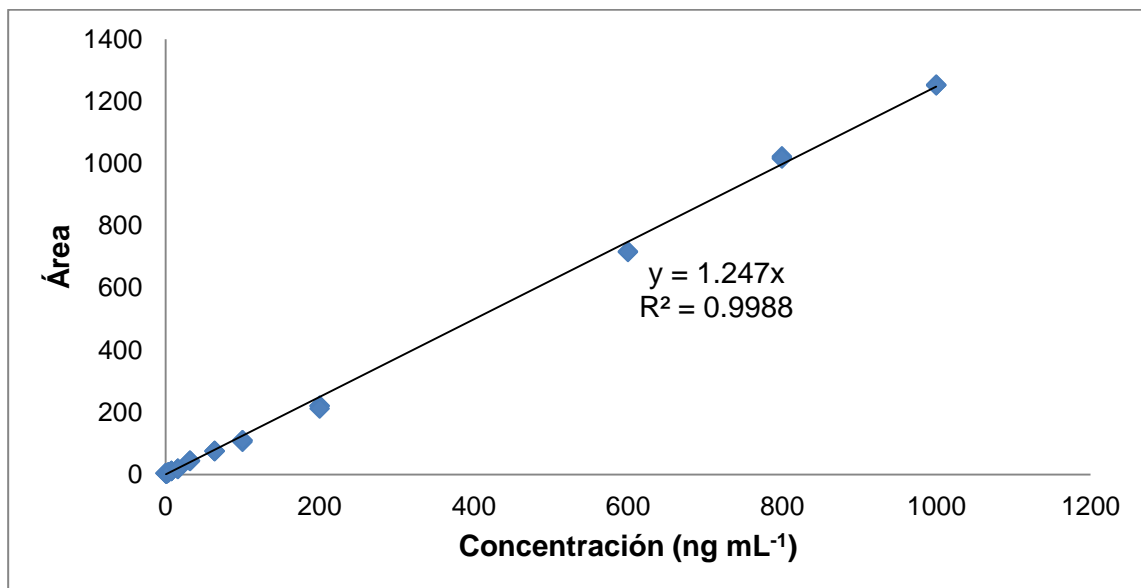
**Figura 12.** Curva de calibración de AFG<sub>1</sub>. Pendiente (m) de 1.7607; coeficiente de correlación ( $R^2$ ) de 0.9969.

### Curva de AFG<sub>2</sub>.

Los puntos graficados (**Tabla 15**) y la curva de calibración (**Figura 13**) se presentan a continuación.

**Tabla 15.** Puntos graficados para obtener la curva de calibración de AFG<sub>2</sub>; n = 38.

Concentración (ng mL <sup>-1</sup> )	Área	tr (min)	Área	tr (min)	Área	tr (min)
0.5	2.7	11.353	2.9	11.371	2.9	11.391
1	1.8	11.407	1.8	11.390	1.8	11.401
2	3.3	11.404	3.4	11.432	3.5	11.431
4	6	11.478	6	11.473	6	11.475
8	10.5	11.472	10.4	11.477	10.4	11.486
16	17.7	11.513	17.3	11.523	16.5	11.534
32	42.1	11.525	43.1	11.519	43.5	11.520
64	74.5	11.511	74.5	11.532	75.1	11.527
100	109.1	11.568	104.3	11.557	108.7	11.533
200	220	11.554	219.5	11.526	211.4	11.551
600	716.4	11.494	714.16	11.473	-	-
800	1017.8	11.416	1015.6	11.384	1022.8	11.480
1000	1253	11.355	1251	11.319	1251.3	11.352



**Figura 13.** Curva de calibración de AFG<sub>2</sub>. Pendiente (m) de 1.247; coeficiente de correlación ( $R^2$ ) de 0.9988.

Las pendientes y coeficientes de correlación de las curvas de calibración para cada AF se presentan en la **Tabla 16**.

**Tabla 16.** Parámetros de las curvas de calibración para cada aflatoxina.

Aflatoxina	Pendiente (m)	Coefficiente de correlación ( $R^2$ )
AFB <sub>1</sub>	2.8299	0.9973
AFB <sub>2</sub>	1.7786	0.9908
AFG <sub>1</sub>	1.7607	0.9969
AFG <sub>2</sub>	1.247	0.9988

### V.1.3 Cálculo de LOD y LOQ

A partir de los datos mostrados anteriormente se obtuvieron los siguientes LOD y LOQ para las diferentes AF (**Tabla 17**).

**Tabla 17.** LOQ y LOD para las cuatro AF.

Aflatoxina	LOD (ng mL <sup>-1</sup> )	LOQ (ng mL <sup>-1</sup> )
B <sub>1</sub>	0.1	0.5
B <sub>2</sub>	0.01	0.05
G <sub>1</sub>	0.01	0.05
G <sub>2</sub>	0.5	2.5

#### V.1.4. Recuperación del método

En la **Tabla 18** se muestran los resultados obtenidos para el experimento de recuperación. El procedimiento se realizó por triplicado

**Tabla 18.** Recuperación de AF en cada matriz.

Tipo de nuez	AF (rango de tr en minutos)	Porcentaje de recuperación
De Castilla	B <sub>1</sub> (8.522-8.925)	88.12 ± 2.31
	B <sub>2</sub> (18.373-18.627)	95.16 ± 0.59
	G <sub>1</sub> (6.051-6.066)	82.92 ± 2.58
	G <sub>2</sub> (12.552-12.712)	82.01 ± 3.13
Pecana	B <sub>1</sub> (8.341-8.425)	85.17 ± 1.85
	B <sub>2</sub> (18.013-18.202)	86.89 ± 13.66
	G <sub>1</sub> (6.032-6.075)	75.24 ± 9.35
	G <sub>2</sub> (12.418-12.507)	85.92 ± 3.49
Marañón	B <sub>1</sub> (8.264-8.281)	84.15 ± 0.90
	B <sub>2</sub> (17.967-17.975)	87.31 ± 6.03
	G <sub>1</sub> (6.008 - 6.024)	86.11 ± 3.55
	G <sub>2</sub> (12.339-12.363)	86.33 ± 4.75

#### V.2. Cuantificación de AF en las muestras por HPLC

Para identificar las señales correspondientes a las cuatro AF en las muestras se tomaron en cuenta los tiempos de retención que coincidieran con los rangos obtenidos para las diferentes matrices (**Tabla 18**).

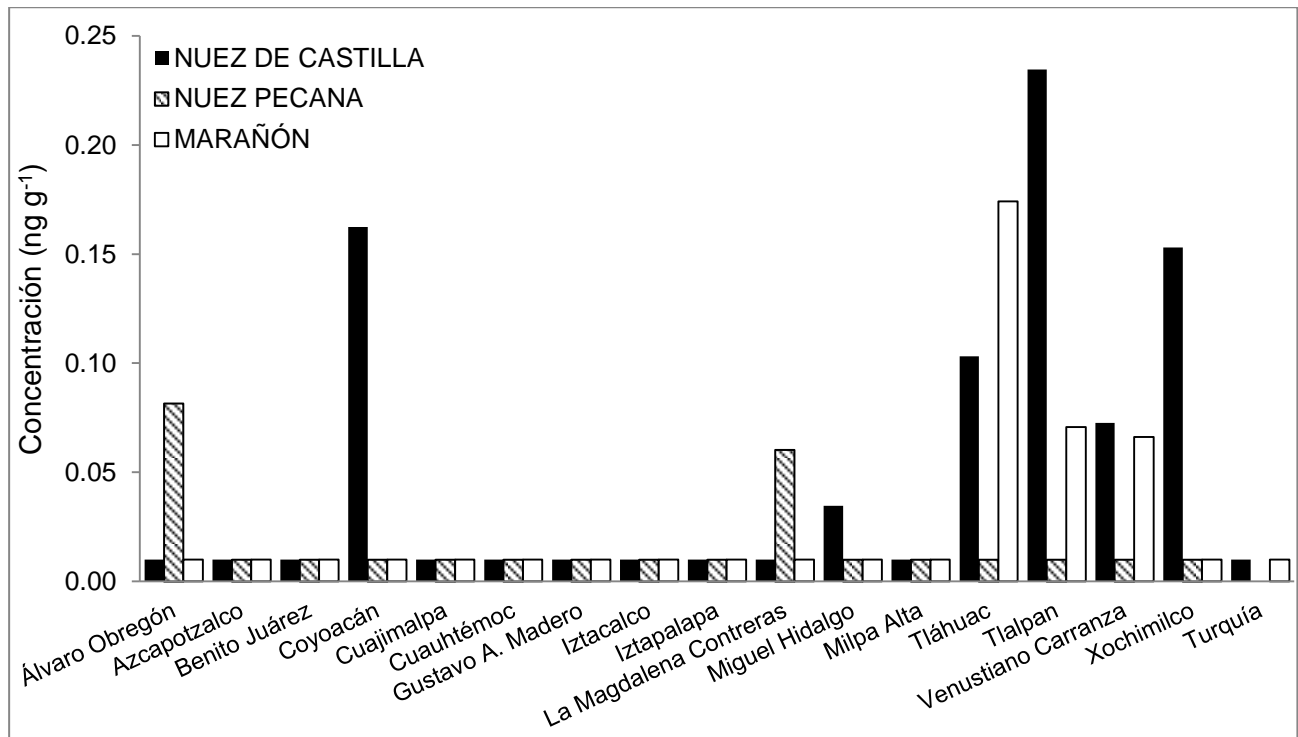
En la **Tabla 19** y **Figuras 14** y **15** se muestran las concentraciones promedio (de tres repeticiones) y ajustadas por el porcentaje de recuperación de AF obtenidas para las muestras de las nueces analizadas.

En la **Tabla 19** se colocó <LOD en aquellas muestras en las que las tres determinaciones resultaron por debajo del LOD. Pueden observarse valores menores al LOD en aquellos casos en los que de las tres determinaciones solamente una o dos superaron éste valor.

**Tabla 19.** Concentraciones promedio de AF en las muestras ajustadas al porcentaje de recuperación (en ng g<sup>-1</sup> de muestra).

Tipo de nuez	Delegación	AFB <sub>1</sub>		AFB <sub>2</sub>		AFG <sub>1</sub>		AFG <sub>2</sub>		AF <sub>T</sub>	
		Ø	DS	Ø	DS	Ø	DS	Ø	DS	Ø	DS
Nuez de Castilla	Álvaro Obregón	<LOD	0.00	0.04	0.01	0.14	0.05	<LOD	0.00	0.18	0.04
	Azcapotzalco	<LOD	0.00	0.03	0.02	0.26	0.17	2.04	1.77	2.33	1.65
	Benito Juárez	<LOD	0.00	0.16	0.06	0.10	0.02	1.75	1.01	2.01	0.98
	Coyoacán	0.16	0.02	0.62	0.79	0.29	0.26	1.08	1.05	2.15	1.05
	Cuajimalpa	<LOD	0.00	0.07	0.07	0.19	0.10	0.63	0.05	0.89	0.13
	Cuauhtémoc	<LOD	0.00	0.04	0.01	0.05	0.03	0.70	0.61	0.80	0.62
	G. A. Madero	<LOD	0.00	0.04	0.02	0.32	0.07	1.31	1.15	1.67	1.20
	Iztacalco	<LOD	0.00	0.05	0.01	0.22	0.05	7.65	6.63	7.92	6.67
	Iztapalapa	<LOD	0.00	0.04	0.01	0.26	0.01	2.13	1.92	2.43	1.92
	La M. Contreras	<LOD	0.00	0.03	0.00	0.28	0.07	0.36	0.63	0.67	0.58
	Miguel Hidalgo	0.03	0.06	0.04	0.01	0.38	0.03	0.86	0.99	1.32	0.94
	Milpa Alta	<LOD	0.00	0.28	0.36	0.13	0.02	<LOD	0.00	0.41	0.37
	Tláhuac	0.10	0.18	0.07	0.00	0.61	0.12	0.79	0.68	1.46	0.57
	Tlalpan	0.23	0.25	0.06	0.02	2.20	0.67	<LOD	0.00	2.50	0.80
	V. Carranza	0.07	0.06	0.08	0.04	0.35	0.05	0.84	0.73	1.34	0.79
Xochimilco	0.15	0.05	0.55	0.05	0.51	0.11	4.29	2.56	5.50	2.55	
Turquía	<LOD	0.00	0.04	0.01	0.37	0.06	11.69	10.29	12.10	10.36	
Nuez Pecana	Álvaro Obregón	0.08	0.07	0.16	0.19	0.92	0.04	0.13	0.12	1.30	0.32
	Azcapotzalco	<LOD	0.00	0.03	0.01	0.04	0.00	0.23	0.20	0.30	0.20
	Benito Juárez	<LOD	0.00	0.05	0.02	0.05	0.02	0.17	0.17	0.27	0.17
	Coyoacán	<LOD	0.00	0.03	0.00	0.03	0.01	0.17	0.14	0.23	0.15
	Cuajimalpa	<LOD	0.00	0.18	0.14	0.02	0.00	0.12	0.12	0.32	0.19
	Cuauhtémoc	<LOD	0.00	0.06	0.02	0.03	0.01	0.23	0.21	0.32	0.22
	G. A. Madero	<LOD	0.00	0.09	0.04	0.06	0.02	0.18	0.15	0.33	0.13
	Iztacalco	<LOD	0.00	0.12	0.04	0.04	0.01	0.72	0.16	0.88	0.19
	Iztapalapa	<LOD	0.00	0.04	0.01	0.02	0.00	0.25	0.22	0.31	0.22
	La M. Contreras	0.06	0.10	0.12	0.16	0.18	0.25	0.28	0.36	0.64	0.87
	Miguel Hidalgo	<LOD	0.00	0.07	0.03	0.07	0.03	0.17	0.17	0.32	0.18
	Milpa Alta	<LOD	0.00	0.02	0.00	0.13	0.03	0.22	0.19	0.37	0.17
	Tláhuac	<LOD	0.00	0.09	0.04	0.07	0.02	0.20	0.17	0.35	0.20
	Tlalpan	<LOD	0.00	0.08	0.02	0.09	0.01	0.20	0.18	0.37	0.16
V. Carranza	<LOD	0.00	0.12	0.02	0.10	0.02	0.16	0.14	0.38	0.11	
Xochimilco	<LOD	0.00	0.11	0.05	0.12	0.01	0.19	0.16	0.42	0.21	
Marañón	Álvaro Obregón	<LOD	0.00	0.05	0.02	0.03	0.01	0.16	0.28	0.23	0.27
	Azcapotzalco	<LOD	0.00	0.02	0.00	0.04	0.01	1.50	2.60	1.56	2.59
	Benito Juárez	<LOD	0.00	0.03	0.02	0.05	0.02	1.51	2.62	1.59	2.60
	Coyoacán	<LOD	0.00	0.03	0.01	0.02	0.01	<LOD	0.00	0.05	0.01
	Cuajimalpa	<LOD	0.00	0.06	0.02	0.06	0.01	0.46	0.80	0.58	0.81
	Cuauhtémoc	<LOD	0.00	0.05	0.02	0.02	0.00	0.72	1.25	0.79	1.23
	G. A. Madero	<LOD	0.00	0.05	0.01	0.03	0.02	3.99	6.92	4.08	6.93
	Iztacalco	<LOD	0.00	0.04	0.00	0.04	0.01	<LOD	0.00	0.08	0.01
	Iztapalapa	<LOD	0.00	0.03	0.00	0.05	0.01	0.28	0.49	0.36	0.49
	La M. Contreras	<LOD	0.00	0.04	0.02	0.09	0.02	1.18	2.04	1.31	2.05
	Miguel Hidalgo	<LOD	0.00	0.08	0.10	0.08	0.03	<LOD	0.00	0.16	0.07
	Milpa Alta	<LOD	0.00	0.03	0.01	0.11	0.02	6.75	11.69	6.89	11.71
	Tláhuac	0.17	0.30	0.08	0.03	0.10	0.01	<LOD	0.00	0.35	0.29
	Tlalpan	0.07	0.12	0.04	0.00	0.09	0.02	<LOD	0.00	0.20	0.12
	V. Carranza	0.07	0.11	0.09	0.03	0.06	0.01	3.30	5.72	3.51	5.82
Xochimilco	<LOD	0.00	0.09	0.04	0.06	0.00	1.10	1.91	1.25	1.88	
Turquía	<LOD	0.00	0.02	0.01	0.12	0.02	<LOD	0.00	0.14	0.03	

Ø: Promedio; DS: Desviación estándar; <LOD: Menor al límite de detección



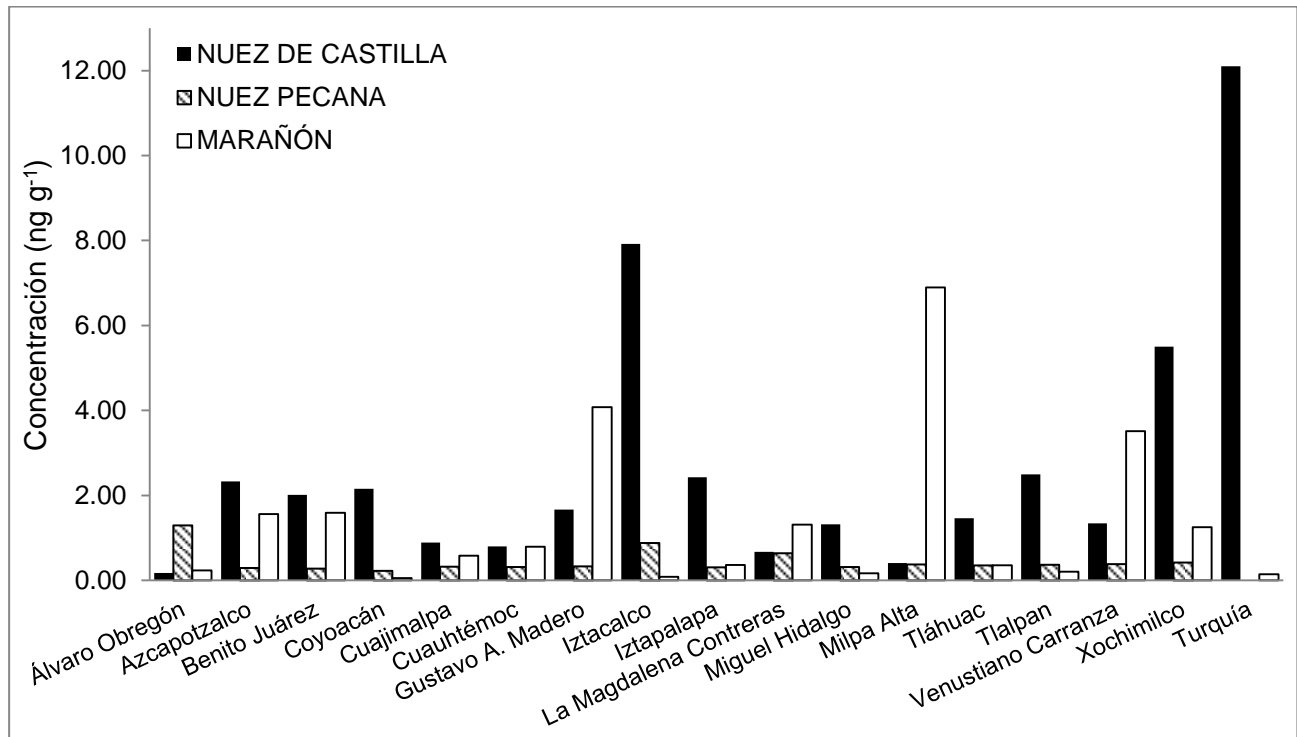
**Figura 14.** Concentración promedio de AFB<sub>1</sub> presente en las muestras estudiadas. Se graficó 0.01 ng g<sup>-1</sup> para las muestras con <LOD.

Un total de 50 muestras fueron analizadas, de las cuales el 22% (11/50) están contaminadas con AFB<sub>1</sub> y el 100% con AFt. En general la cantidad de AFB<sub>1</sub> y AFt encontradas en las muestras de la Ciudad de México son menores a las reportadas en otros lugares como en La Meca (El tawila *et al.*, 2012), Malasia (Leong *et al.*, 2010), Polonia (Leszczynska *et al.*, 2000), Marruecos (Juan *et al.*, 2008) y Pakistán (Luttfullah y Hussain, 2011). Este resultado puede deberse a que las muestras obtenidas en la Ciudad de México eran frescas con poco tiempo de almacenamiento al ser México un país productor de los tres tipos de nueces.

En la **Figura 14** se observa que el 35.30% de muestras de nuez de Castilla (6/17) presentan contaminación con AFB<sub>1</sub>, seguida del marañón con el 17.65% de las muestras contaminadas (3/17) y de la nuez pecana con 12.50% contaminadas (2/16); cuatro de las cinco muestras con mayor contaminación de AFB<sub>1</sub> son nueces de Castilla procedentes de las Delegaciones de la zona centro-sur como Coyoacán (0.16 ng g<sup>-1</sup>), Tlalpan (0.23 ng g<sup>-1</sup>), Tláhuac (0.10 ng g<sup>-1</sup>) y Xochimilco (0.15 ng g<sup>-1</sup>).

Las muestras de nuez pecana contaminadas con AFB<sub>1</sub> provienen de las Delegaciones Álvaro Obregón (0.08 ng g<sup>-1</sup>) y La Magdalena Contreras (0.06 ng g<sup>-1</sup>) que

colindan geográficamente, pero ni la nuez de Castilla ni el marañón registraron contaminación en esta zona. En el caso de marañón no se observa relación geográfica entre las tres muestras contaminadas con AFB<sub>1</sub> que son Tláhuac (0.17 ng g<sup>-1</sup>), Tlalpan (0.07 ng g<sup>-1</sup>) y Venustiano Carranza (0.07 ng g<sup>-1</sup>), en estas Delegaciones también se observa una concentración elevada de AFB<sub>1</sub> en nuez de Castilla.



**Figura 15.** Concentración promedio de AFB<sub>1</sub> presente en las muestras estudiadas.

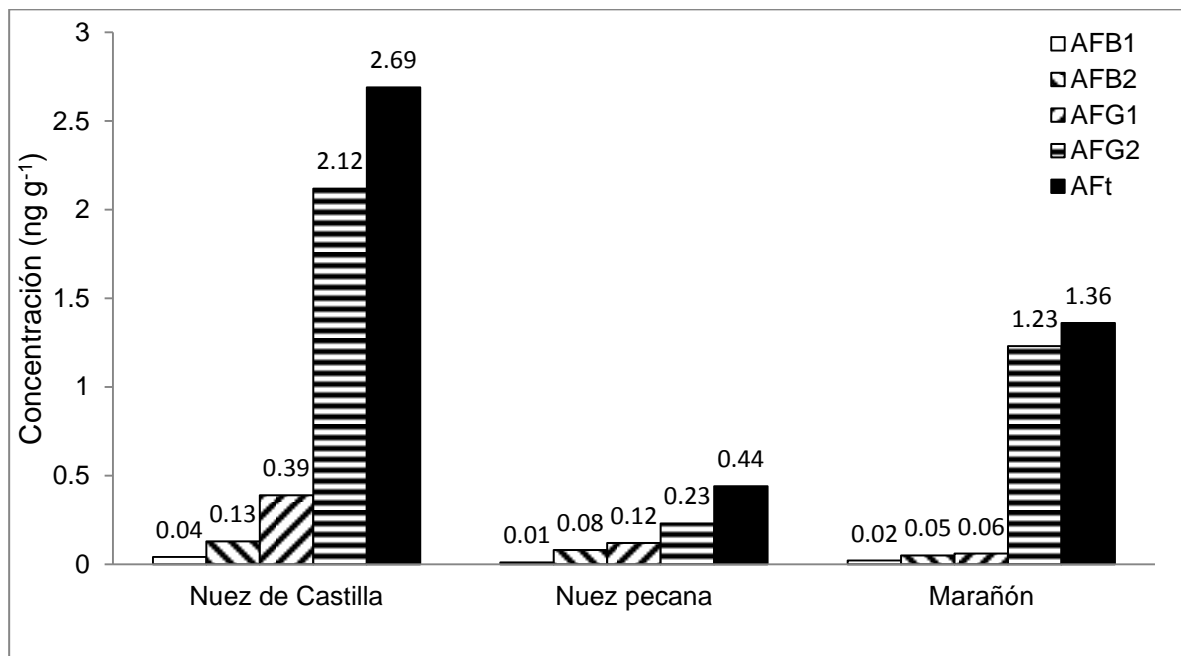
En la **Figura 15** se observa que todas las Delegaciones presentan contaminación por AFB<sub>1</sub> y una vez más la nuez de Castilla tiende a ser la más afectada siendo las muestras provenientes de Turquía (12.10 ng g<sup>-1</sup>) e Iztacalco (7.92 ng g<sup>-1</sup>) las más contaminadas, seguidas de la muestra de marañón de Milpa Alta (6.89 ng g<sup>-1</sup>). Las Delegaciones afectadas por contaminación de AFB<sub>1</sub> no son las que presentan la mayor contaminación con AFB<sub>1</sub> debido a los altos valores de AFB<sub>2</sub> registrados y que son los que determinan el valor de AFB<sub>1</sub>.

Hesseltine *et al.* (1970) y Davis *et al.* (1983) encontraron que las cepas toxigénicas de *A. flavus* producen sólo AFB<sub>1</sub> y AFB<sub>2</sub> y las de *A. parasiticus* producen AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> y AFG<sub>2</sub>. En las muestras estudiadas se identificaron las cuatro AF por lo que se



puede concluir que las nueces que se comercializan en la Ciudad de México son invadidas por *A. flavus* y *A. parasiticus*; además se sabe que el pH condiciona el tipo de metabolitos que sintetiza el moho, así a pH inferiores a 6 se favorece la síntesis de AF del grupo B, mientras que a valores de pH superiores a 6 (como en el caso de las nueces) se estimula la síntesis de AF del grupo G (Buchanan & Ayres, 1975) lo que explica el alto valor de AFG<sub>2</sub> presente en las muestras (**Figura 16**).

Aunque AFB<sub>1</sub> y AFG<sub>1</sub> son considerablemente más tóxicas que AFB<sub>2</sub> y AFG<sub>2</sub> (Van Egmond *et al.*, 1995) AFB<sub>2</sub> y AFG<sub>2</sub> pueden oxidarse *in vivo* a AFB<sub>1</sub> y AFG<sub>1</sub> respectivamente (Baltaci *et al.*, 2012).



**Figura 16.** Concentración promedio de las cuatro AF y AFt en nuez de Castilla, nuez pecana y marañón de la Ciudad de México.

Con relación a los promedios de AFt de nuez de Castilla ( $2.7 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), nuez pecana ( $0.4 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) y marañón ( $1.4 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) según el Reglamento de la Comisión Europea tenemos que están por abajo del rango de tolerancia y dentro de aceptación para exportar.

Según la Norma NMX-FF-093-SCFI-2011 que establece el límite legal de  $10 \mu\text{g kg}^{-1}$  en nuez pecana, los promedios de AFt encontrados para exportación son aceptables.

Se analizaron los microgramos de AF por kilogramo o sea los nanogramos de AF en 1 gramo de muestra, pero la cantidad que ingiere una persona en los alimentos

cocinados y en los postres excede los límites de tolerancia y dependiendo de la frecuencia de este consumo se considerarán los riesgos de daño crónico por estas toxinas. En la **Tabla 20** se hizo un cálculo del consumo de nueces en México según las presentaciones en bolsas de nuez y recetas frecuentes. Se puede apreciar que aunque el promedio de AFt en nueces no parece alto, ya al calcular el consumo habitual hay una aportación de cancerígenos importante. El total de AFt presentado en bolsas comerciales de nueces implica niveles que producen mutaciones a nivel celular pues exceden  $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ .

**Tabla 20:** Cálculo de consumo de AFt en diferentes presentaciones comerciales de nueces.

Alimento	Gramos de nuez	Promedio de AFt ( $\text{ng g}^{-1}$ )	Total de AFt (ng) por consumo
Nogada (nuez de Castilla) para chiles	46.25	2.7	125
Paquetes de nuez de Castilla	100		270
	1000		2700
Paquetes de marañón	40	1.4	56
	100		140
	250		350
Paquetes de nuez pecana	100	0.4	44
	250		110
Galletas (1 kg) de nuez pecana	250		110
Pastel (1 kg) de nuez pecana	375		150
Helado (1 L) de nuez pecana	50		20

### V.3. Análisis estadístico

En las **Tablas 21** y **22** se muestran los resultados obtenidos después de realizar la prueba de Kruskal-Wallis en el Programa Estadístico R.

**Tabla 21.** Resultados de la prueba Kruskal-Wallis aplicada para encontrar diferencia significativa entre la Delegación de origen de las muestras.

Tipo de nuez	Aflatoxina	Valor de estadístico Kruskal-Wallis	Significancia	Diferencia significativa
Nuez de Castilla	AFB <sub>1</sub>	34.90	<0.05	Si
	AFB <sub>2</sub>	27.41	<0.05	Si
	AFG <sub>1</sub>	39.34	<0.05	Si
	AFG <sub>2</sub>	21.50	0.16	No
	AFt	24.35	0.08	No
Nuez pecana	AFB <sub>1</sub>	24.24	0.06	No
	AFB <sub>2</sub>	31.84	<0.05	Si
	AFG <sub>1</sub>	38.48	<0.05	Si
	AFG <sub>2</sub>	12.61	0.63	No
	AFt	18.86	0.22	No
Marañón	AFB <sub>1</sub>	14.59	0.56	No
	AFB <sub>2</sub>	31.38	<0.05	Si
	AFG <sub>1</sub>	42.80	<0.05	Si
	AFG <sub>2</sub>	7.68	0.96	No
	AFt	17.97	0.33	No

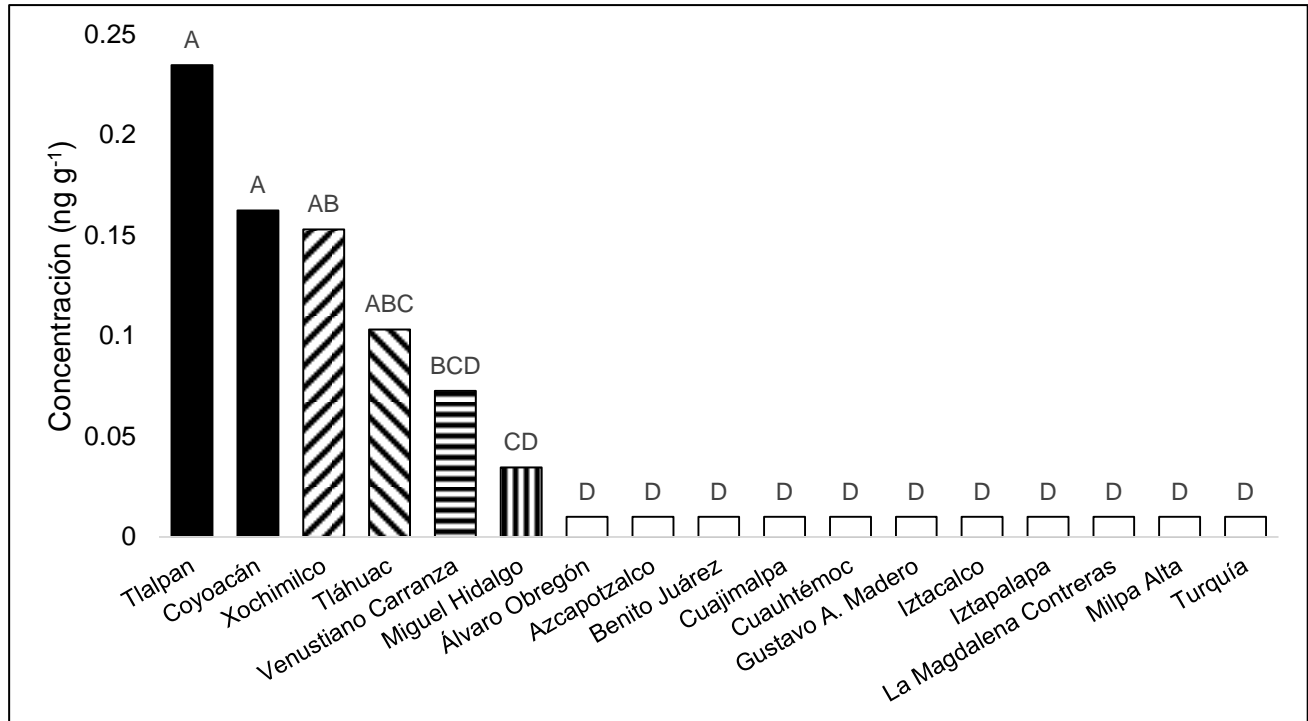
En la **Tabla 21** se observa que para la nuez de Castilla se halló diferencia significativa entre Delegaciones para el contenido de AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub> y AFG<sub>1</sub>; para nuez pecana y marañón se encontró diferencia significativa únicamente entre Delegaciones en el contenido de AFB<sub>2</sub> y AFG<sub>1</sub>; en ningún caso se halló diferencia para AFG<sub>2</sub> ni AFt.

Con respecto al tipo de nuez como fuente de variación, se observa en la **Tabla 22** que existe diferencia significativa para las cuatro AF y AFt.

**Tabla 22.** Resultados de la prueba Kruskal-Wallis aplicada para encontrar diferencia significativa entre los tipos de nuez.

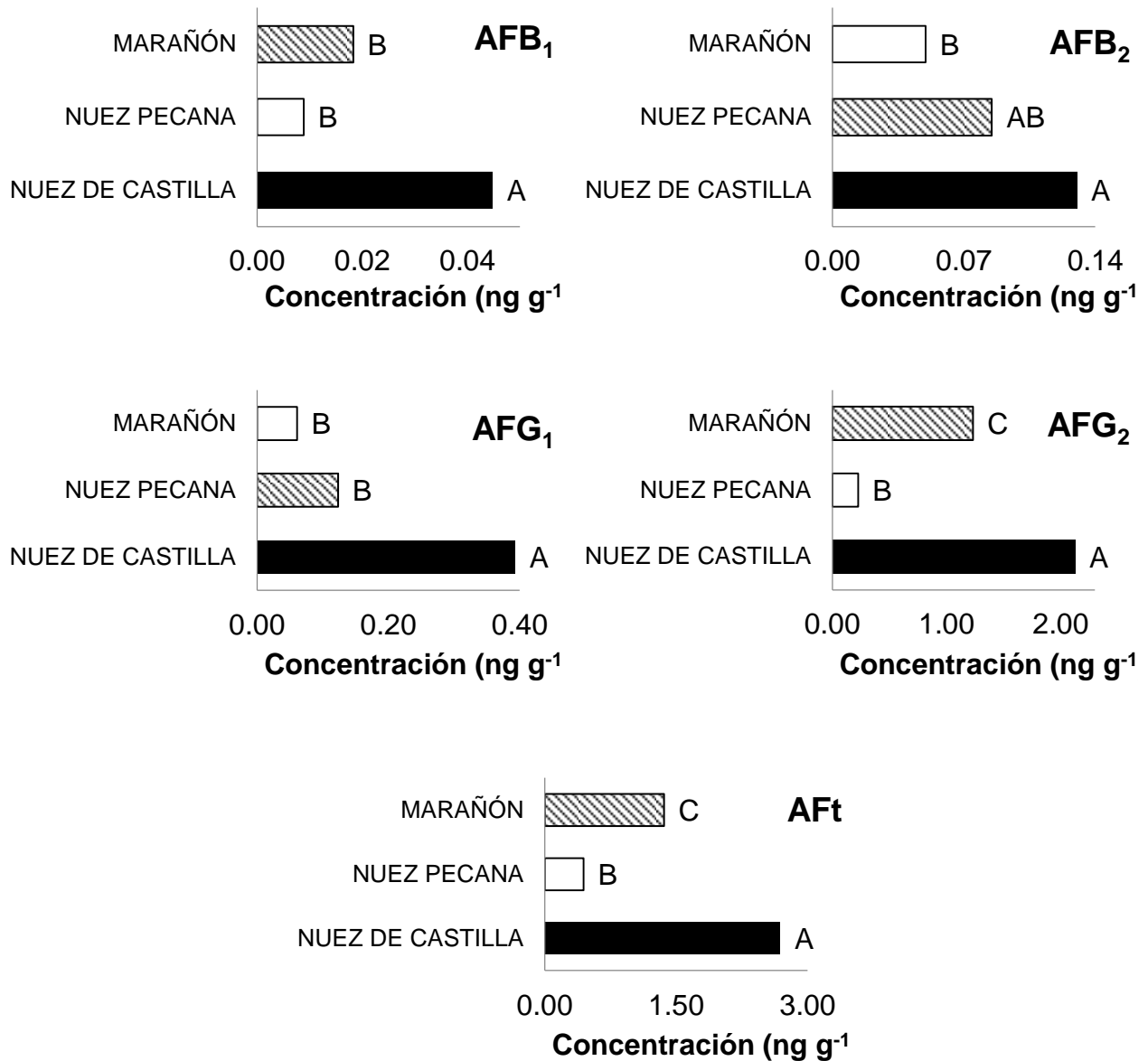
Aflatoxina	Valor de estadístico Kruskal-Wallis	Significancia	Diferencia significativa
AFB <sub>1</sub>	9.24	<0.05	Si
AFB <sub>2</sub>	8.03	<0.05	Si
AFG <sub>1</sub>	62.57	<0.05	Si
AFG <sub>2</sub>	17.24	<0.05	Si
AFt	40.31	<0.05	Si

Posteriormente, se aplicó la prueba de Wilcoxon para hallar las diferencias significativas entre grupos. Los resultados de ésta prueba se pueden apreciar en las **Figuras 17 y 18** que siguen.



**Figura 17.** Contenido promedio de AFB<sub>1</sub> para muestras de nuez de Castilla. Los grupos con una letra (A, B, C, D) en común no presentan diferencia significativa, aquellos con letras diferentes sí presentan diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).

En la **Figura 17** se observa que las muestras de nuez de Castilla provenientes de Tlalpan y Coyoacán son significativamente ( $p < 0.05$ ) las más contaminadas por AFB<sub>1</sub>, para nuez pecana y marañón no se halló diferencia significativa entre el origen de las muestras para AFB<sub>1</sub>. En el caso de AFt no se halló diferencia significativa tomando como factor de variación la Delegación de origen de la muestra.



**Figura 18.** Contenido promedio de AF en las matrices estudiadas. Los grupos con una letra (A, B, C) en común no presentan diferencia significativa, aquellos con letras diferentes sí presentan diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).

En la **Figura 18** se observa que la nuez de Castilla es significativamente la más contaminada por AFB<sub>1</sub> (0.04 ng g<sup>-1</sup>) seguida del marañón (0.02 ng g<sup>-1</sup>) y la nuez pecana (0.01 ng g<sup>-1</sup>) que no guardan diferencia estadística entre ellas. Con respecto a la contaminación por AF<sub>t</sub> se encontró diferencia significativa entre los tres tipos de nueces siendo la nuez de Castilla una vez más la más afectada (2.10 ng g<sup>-1</sup>), después el marañón (1.36 ng g<sup>-1</sup>) y finalmente la nuez pecana (0.44 ng g<sup>-1</sup>).

Existe evidencia considerable de que las nueces muestran resistencia a la contaminación por AF (Molyneux *et al.*, 2007). La represión de la formación de AF resulta de factores bioquímicos inherentes a cada especie de nuez (Mahoney *et al.*, 2003). Varios experimentos han demostrado que los compuestos asociados con la anti-aflatoxigenesis son taninos y los componentes resultantes de su hidrólisis presentes en la cubierta de la semilla (episperma) (Mahoney & Molyneux, 2004; Mahoney *et al.*, 2010). Venkatachalan & Sathe (2006) reportan un contenido de taninos para nuez de Castilla, nuez pecana y marañón de 0.34%, 0.84% y 0.03% respectivamente, lo que explica que la nuez pecana sea la menos afectada por AFt y AFB<sub>1</sub>; se observa que el contenido de taninos en nuez de Castilla es mayor al de marañón lo que implicaría una concentración mayor de AF en marañón que en nuez de Castilla, pero se encontró que la nuez de Castilla es más afectada que el marañón por contaminación por AF, este resultado coincide con lo reportado por El tawila *et al.* (2012) y Leszczynska *et al.* (2000) ya que sus investigaciones arrojaron una mayor incidencia de contaminación por AFB<sub>1</sub> y AFt en nuez de Castilla que en marañón.

El marañón posee un grupo de compuestos fenólicos conocidos como “cashew nut shell liquid” (CNSL) (Mazzetto *et al.*, 2009; Agostini-Costa *et al.*, 2005), entre los que se encuentran el ácido anacárdico, cardanol y cardol; de éste último se ha reportado que posee actividad antimicrobiana (Tocco *et al.*, 2009) lo que podría explicar que el marañón sea más resistente a la invasión de *Aspergillus* y por lo tanto presente una menor contaminación por AF.

En promedio la contaminación de AFB<sub>1</sub> en las tres nueces es 0.024 ng g<sup>-1</sup> y de AFt es 1.30 ng g<sup>-1</sup>, si tomamos en cuenta el consumo per cápita de 1.8 kg de nueces al año, los habitantes de la Ciudad de México consumen 24 ng de AFB<sub>1</sub> y 1,300 ng de AFt sólo por la ingesta de nueces durante un año. El cálculo anterior no contempla el consumo de platillos con nueces como ingredientes que evidentemente aumenta el consumo de AF.

## CONCLUSIONES

- Se validó el método.
- Ninguna muestra sobrepasa los límites establecidos por la NOM-188-SSA1-2002 para contaminación por AFt cuyo valor es de  $20 \mu\text{g kg}^{-1}$  de alimento.
- Las muestras de nuez de Castilla provenientes de las Delegaciones Tlalpan y Coyoacán son significativamente ( $p < 0.05$ ) las más contaminadas por  $\text{AFB}_1$  con valores de  $0.23$  y  $0.16 \text{ ng g}^{-1}$  respectivamente. Para nuez pecana y marañón no se hallaron diferencias significativas entre el origen de las muestras para el contenido de  $\text{AFB}_1$ .
- Para ninguna de las nueces estudiadas se encontró diferencia significativa en el contenido de AFt tomando como fuente de variación el origen de las muestras.
- La contaminación promedio de la nuez de Castilla por  $\text{AFB}_1$  ( $0.05 \text{ ng g}^{-1}$ ) es significativamente ( $p < 0.05$ ) mayor a la que presentan el marañón ( $0.02 \text{ ng g}^{-1}$ ) y la nuez pecana ( $0.01 \text{ ng g}^{-1}$ ).
- La contaminación promedio de la nuez de Castilla por AFt ( $2.10 \text{ ng g}^{-1}$ ) es significativamente ( $p < 0.05$ ) mayor a la que presentan el marañón ( $1.36 \text{ ng g}^{-1}$ ) y la nuez pecana ( $0.44 \text{ ng g}^{-1}$ ).
- El aporte de  $\text{AFB}_1$  y AFt a la dieta de un habitante de la Ciudad de México por el consumo de nueces es de  $24$  y  $1300 \text{ ng}$  respectivamente al año.

## VII. BIBLIOGRAFÍA

- Agostini-Costa, T.S., Jales, K.A., Oliveira, M.E.B., Garruti, D.S. 2005 Determinação espectrofotométrica de ácido anacárdico em amendoas de castanhas de caju. Comunicado Técnico 122, EMBRAPA, Brasília, Maio.
- Akande, K.E., Abubakar, M.M., Adegbola, T.A., Bongoro, S.E. 2006. Nutritional and health implications of mycotoxins in animal feeds: A review. *Pakistan Journal of Nutrition*, 5: 398-403.
- Akiyama, H., Goda, Y., Tanaka, T., Toyoda, M. 2001. Determination of aflatoxins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> and G<sub>2</sub> in spices using a multifunctional column clean-up. *Journal of Chromatography A*. 932 (1-2): 153-157.
- Apeageyi, F., Lamplugh, S., Hendrickse, R., Aframy, K. Lucas, S. 1982. Aflatoxins in the liver of children with kwashiorkor in Ghana. *Tropical and Geographical Medicine Home. Medical of Biology Environmental*, Sep-Dec: 9-12.
- Arrus, K., Blank, G., Abramsom, D., Clear, R., Holley, R. 2005. Aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in Brazil nuts. *Journal of Stored Products Research*. 41:513-527.
- Asao, T., Büchi, G., Abdel-Kader, M.M., Chang, S.B., Wick, E.L. y Wogan, G.N. 1965. The structures of aflatoxins B<sub>1</sub> and G<sub>1</sub>. *Journal of American Chemistry Society*, 87: 882-886.
- Azziz-Baumgartner, E., Lindblade, K., Giesecker, K., Rogers, H., Kieszak, S., Njapau, H., Schleicher, R., McCoy, L., Misore, A., De Cock, K., Rubín, C. 2005. Case-control study of an acute aflatoxicosis outbreak, Kenya, 2004. *Environmental Health Perspectives*, 113: 1779-1783.
- Babatunde, F., Babatunde, G., Oyenuga, V. 1974. Composition and nutritive value of cashew nut to the rat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 22(4): 278-282.
- Baltaci, C., Ilyasoğlu, H., Yüksel, F. 2012. Single-Laboratory validation for the determination of Aflatoxin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, and G<sub>2</sub> in foods base on Immunoaffinity column and Liquid Chromatography with postcolumn derivatization and fluorescence detection. *Food Analytical Methods*, 1-9. DOI 10.1007/s12161-012-9417-3.
- Beckwith, A.C., Vesonder, R.F., Ciegler, A. 1975. Action of weak bases upon aflatoxin B<sub>1</sub> in contact with macromolecular reactants. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 23: 582-587.
- Bhat, R., Krishnamachari, K., 1977. Follow-up study of aflatoxic hepatitis in parts of western India. *Indian Journal of Medical Research*, 66: 55-58.
- Bhatnagar, D., Ehrlich, K.C., Cleverl, T.E. 2003. Molecular genetics analysis and regulation of aflatoxin biosynthesis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 61: 83-93.



- Binder, E. 2007. Managing the risk of mycotoxin in modern feed production. *Animal Feed Science and Technology*, 133: 149-166.
- Bottalico, A. 1999. Mycotoxins in foods with possible human health implication. Part 1- Aflatoxins. *Igiene Moderna*, 111(2): 133-169.
- Buchanan, R.L., Ayres, J.C. 1975. Effect of initial pH on aflatoxin production. *Journal of Applied Microbiology*, 30(6): 1050-1051.
- Büchi G., Foulkes D. M., Kurono M., Mitchell G. F. 1966. The total synthesis of racemic Aflatoxin B<sub>1</sub>. *Journal of the American Chemical Society*, 88: 4534-4536.
- Cabañes, F.J., Abarca, M.L., Bragulat, M.R., Castellá, G. 2007. Especies productoras de micotoxinas. En: J.M. Ramos ed. *Micotoxinas en Alimentos*. España: Ediciones Díaz de Santos, pp. 29-61.
- Campbell, T., Salamat, L. 1971. Aflatoxin ingestion and excretion by humans. *In: Symposium on mycotoxins in human health*. Purchase, I.F.H. Ed. Mac Millan Press, London. 271-280.
- Carnaghan, R.B.A., Hartley, R.D., O'Kelly, J. 1963. Toxicity and fluorescence properties of the aflatoxins. *Nature*, 200: 1101.
- Carvajal, M., Moctezuma, G., Espinosa, J., Rojo, F., López-Ridaura, S., and López-Cruz, E.A. 2000. Aflatoxins in Mexican tortillas and the effects of lime treatment and digestive enzymes on their mutagenicity. *In: Mycotoxins and Phycotoxins in Perspective at the turn of the Millenium*. Chapter 5. Risk Assessment of mycotoxins. IUPAC/ AOAC International. Edited By W. J. de Koe, R.A. Samson.H.P. van Egmond, J. Gilbert and M. Sabino. Editorial Ponsen & Looijeven. The Netherlands. 133-141.
- Charoenpornsook, K., Kavisarasai, P. 2006. Mycotoxins in animal feedstuff of Thailand. *Journal of Science and Technology*, 6: 25-28.
- Cheraghali, A.M., Yazdanpanah , H., Doraki, N., Abouhossain, G., Hassibi, M., Ali-abadi, S., Aliakbarpoor, M., Amirahmadi, M., Askarian, A., Fallah, N., Hashemi, T., Jalali, M., Kalantari, N. Khodadadi, E., Maddah, B., Mohit, R., Mohseny, M., Phaghihy, Z., Rahmani, A., Setoodeh, L., Soleimany, E., Zamanian, F. 2007. Incidence of aflatoxins in Iran pistachio nuts. *Food and Chemical Toxicology*, 45: 812-816.
- Ciarmiello, L.F., Piccirillo, P., Pontecorvo, G., De Luca, A., Kafantaris, I., Woodrow, P. 2011. A PCR SNPs marker for specific characterization of English walnut (*Juglans regia* L.) cultivars. *Molecular Biology Reports*, 38(2): 1237-1249.
- Ciegler, A., Lillehoj, B., Peterson, R., Hall, H. 1966. Microbial detoxification of aflatoxin. *Applied Microbiology*, 14: 934-939.
- Coleman, M., Esteve, J., Damiacki, P., Renard, H. 1993. Trends in cancer incidence and mortality. Lyon, France: WHO, IARC. Scientific Publication N° 121: 68-74.

- Comisión Directiva. 1998. 98/53/EC of 16 July 1998 laying down the sampling methods and the methods of analysis for the official control of the levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal of the European Communities*, L201/93, Luxembourg.
- Comisión Europea. 2010. Documento de orientación para las autoridades competentes en materia de control del cumplimiento de la legislación de la UE sobre aflatoxinas. Disponible en:  
[http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/contaminants/guidance-2010\\_es.pdf](http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/contaminants/guidance-2010_es.pdf)  
 [Último acceso el 17 de septiembre de 2012].
- CONABIO, 2000. *Anacardium occidentale*. Disponible en:  
[http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info\\_especies/arboles/doctos/1-anaca1m.pdf](http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/1-anaca1m.pdf).  
 [Último acceso el 1 de agosto de 12]
- Cortyl, M. 2008. Mycotoxins in animal nutrition-problems and solutions. *In*: Iheshiolor, O.O.M., Esonu, B.O., Chuwuka, O.K., Omede, A.A., Okoli, I.C. and Ogbuewu I.P. 2011. Effects of Mycotoxins in Animal Nutrition: A Review. *Asian Journal of Animal Sciences*, 5: 19-33.
- Creppy, E.E. 2002. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicology Letters*, 127: 19-28.
- Davis, L., Stonehouse, W., Loots, D.T., Mukuddem-Petersen, J., Van der Westhuizen, F., Hanekom, S.J., Jerling, J. 2007. The effects of high walnut and cashew nut diets on the antioxidant status of subjects with metabolic syndrome. *European Journal of Nutrition*, 46: 155–164.
- Davis, N.D., Urban, L. 1983. Some characteristics of toxigenic and nontoxigenic isolates of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. En: Diener, U.L., Asquith, R.L., Dickens, J.W. eds. *Biology of A. flavus and A. parasiticus. Aflatoxins and Aspergillus flavus in corn*. Southern Cooperative Series Bulletin 279. Craftmaster Printers, Inc., Opelika, Alabama. p.p. 1-5.
- De longh, H., Beerthuis, R.K., Vles, R.O., Barret, C.B., Ord, W.O. 1962. Investigation of the factor in groundnut meal responsible for turkey X disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, 65: 548-551.
- Decastelli, L., Lai, J., Gramaglia, M., Monaco, A., Nachtman, C., Oldano, F., Ruffier, M., Sezian, A., Bandirola, C. 2007. Aflatoxins occurrence in milk and feed in Northern Italy during 2004-2005. *Food Control*, 18:1263-1266.
- Eaton, D.L., Groopman, J.D. 1994. The toxicology of aflatoxins. Human health, veterinary and agricultural significance. pp. 6-8 Academic press, San Diego, Ca.
- EI-Nezami, H.S., Nicoletti, G., Neal, G.E. Donohue, D.C., Ahokas, J.T. 1995. Aflatoxin M1 in human breast milk samples from Victoria, Australia and Thailand. *Food and Chemical Toxicology*, 33:173-179.

- El tawila, M., Neamatallah, A., Serdar, S. 2012. Incidence of aflatoxins in commercial nuts in holy city of Mekkah. *Food Control*, 29: 121-124.
- Fan, T.L., Chu, F. 1984. Indirect enzyme-linked immunosorbent assay for detection of aflatoxin B1 in corn and peanut butter. *Journal of Food Protection*, 47(4): 263-266.
- FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2004. Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003. *FAO Food and Nutrition Paper, No. 81*. Rome: FAO.
- FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2006. *Fichas técnicas. Productos frescos y procesados. Marañón*.  
 Disponible en:  
[http://www.fao.org/inpho\\_archive/content/documents/vlibrary/AE620s/Pfrescos/MARANON.HTM](http://www.fao.org/inpho_archive/content/documents/vlibrary/AE620s/Pfrescos/MARANON.HTM).  
 [Último acceso el 1 de agosto de 2012]
- FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2012. *FAOSTAT*. (Actualizado al 8 de agosto de 2013).  
 Disponible en: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>.  
 [Último acceso el 20 de agosto de 2013]
- Feizy, J., Beheshti, H.R., Khoshbakht Fahim, N., Fakoor Janati, S.S., Davari, G. 2010. Survey of aflatoxins in rice from Iran using immunoaffinity column clean-up and HPLC with fluorescence detection. *Food Additives and Contaminants*, 3: 263-267.
- Ferlay, J., Bray, F., Pisani, P., Parkin, D.M. 2004. GLOBOCAN 2002. Cancer incidence, mortality and prevalence Worldwide. IARC Cancer Base No. 5, Version 2.0. Lyon: IARC Press.
- Freire, F.C.O., Kozakiewicz, Z., Paterson, R.R.M. 1999. Mycoflora and mycotoxins of Brazilian cashew kernels. *Mycopathologia*, 145: 95-103
- Frenich, A.G., Vidal, J.L.M., Romero-González, R., Aguilera-Luiz, M.d.M. 2009. Simple and high-throughput method for the multimycotoxin analysis in cereals and related foods by ultra-high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of AOAC International*, 92(4): 1128-1135.
- Garner, R.C., Whattam, M.M., Taylor, P.J.L., Stow, M.W. 1993. Analysis of United Kingdom purchased spices for aflatoxins using an immunoaffinity column clean-up procedure followed by high-performance liquid chromatographic analysis and post-column derivatisation with pyridium bromide perbromide. *Journal of Chromatography*, 648: 485-490.
- Gobierno de Chile, Ministerio de Agricultura, 2004. El cultivo del pecano (*Carya illinoensis*). [Último acceso el 31 de Julio de 2012]. Disponible en:  
[http://www.indap.gob.cl/Docs/Documentos/Fruticultura/Pecano/Cultivo\\_del\\_Pecano\\_%20INIA%29.pdf](http://www.indap.gob.cl/Docs/Documentos/Fruticultura/Pecano/Cultivo_del_Pecano_%20INIA%29.pdf).

- Goda, Y., Akiyama, H., Otsuki, T., Fujii, A., Toyoda, M. 2001. Application and improvement of aflatoxin analysis in foods using a multifunctional column and HPLC. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan*, 42(1): 56-62.
- Gong, Y., Hounsa, A., Egal, S., Turner, P., Sutcliffe, A., Hall, A., Cardwell, K., Wild, C. 2004. Postweaning exposure to aflatoxin results in impaired child growth: a longitudinal study in Benin, West Africa. *Environmental Health Perspectives*, 112: 1334-1338.
- Gradziel, T., Dandekar, A., Alhumada, M., Hirsh, N., Driver, J., Tang, A. 1995. Integrating fungal pathogen and insect vector resistance for comprehensive preharvest aflatoxin control in almond. USDA-ARS Aflatoxin Elimination Workshop, Atlanta, G.A., pág. 5.
- Griel, A.E., Kris-Etherton, P.M. 2006. Tree nuts and the lipid profile: a review of clinical studies. *The British Journal of Nutrition*, 96: 68-78.
- Groopman, J.D., Haugen, A., Goodrich, G.R., Wogan, G.N., Harris, C.C. 1982. Quantitation of aflatoxin B<sub>1</sub> modified DNA using monoclonal antibodies. *Cancer Research*, 42: 3120-3124.
- Groopman, J.D., Donahue, K.F. 1988. Aflatoxin, a human carcinogen: Determination in foods and biological samples by monoclonal antibody affinity chromatography. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 71(5): 861-867.
- Groopman, J.D., Abbioni, G. 1991. Detection of aflatoxin and its metabolites in human biological fluids. *Pennington Center Nutrition Series*, 1: 18-31.
- Groopman, J., Kensler, T. 2005. Role of metabolism and viruses in aflatoxin-induced liver cancer. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 206: 131-137.
- Guattochi, O.A. 1992. Introducción a la HPLC (Aplicación Práctica) Artes Gráficas Farro. Buenos Aires. 50-110.
- Herzallah, S., Alshawabkeh, K., Al Fataftah A. 2008. Aflatoxin decontamination of artificially contaminated feeds by sunlight,  $\gamma$ -radiation, and microwave heating. *Journal of Applied Poultry Research*, 17: 515-521.
- Hesseltine, C.W., Shotwell, O.L., Smith, M., Elis, J.J., Vandergraft, E., Shannon, G. 1970. Production of various aflatoxins by strains of *Aspergillus flavus* series. En: Herzberg, M. ed. Toxic Micro-organisms. UJNR and Dept. Interior, U.S. Gov. Printing Off., Washington, D.C. p.p. 490.
- Holbrook, C.C., Wilson, D.M., Matheron, M.E. 1995. An update on breeding peanut for resistance to preharvest aflatoxin contamination. USDA-ARS Aflatoxin Elimination Workshop, Atlanta, G.A., pág. 3.
- Holzappel, C.W., Steyn, P.S., Purchase, I.F.H. 1966. Isolation and structure of aflatoxins M1 and M2. *Tetrahedron Letters*, 25:2799-2803.

- Horwitz, W., Senzel, A., Reynolds, H., Park, D.L. 1975. Natural poisons. In: Chapter 26, Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Washington, D.C., AOAC, 24.
- Hsie, L.L., Hsu, S.W., Chen, D.S., Santella, R.M. 1988. Immunological detection of aflatoxin B<sub>1</sub>-DNA adducts formed "in vivo". *Cancer Research*, 48: 6328-6331.
- IARC, International Agency for Research on Cancer. 1993. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins, IARC, Science Publication, Vol. 56. Lyon, France.
- ICMSF, International Commission on Microbiological Specifications for Foods. 1996. Toxigenic Fungi: *Aspergillus*. En: *Microorganisms in food. Vol. 5. Characteristics of Food Pathogens*. London: Academic Press, pp. 347-381.
- Jaimez, J., Fente, C.A., Vázquez, B.I., Franco, C.M., Cepeda, A., Mahuzier, G., Prognon, P. 2000. Application of the assay of aflatoxins by liquid chromatography with fluorescence detection in food analysis. *Journal of Chromatography A*, 882(1-2): 1-10.
- Juan, C., Soriano, J.M., Burdaspal, P. 2007. Aflatoxinas del grupo B y G. En: J.M. Ramos ed. *Micotoxinas en Alimentos*. España: Ediciones Díaz de Santos, pp. 167-199.
- Juan, C., Zinedine, A., Moltó, J.C., Idrissi, L., Mañes, J. 2008. Aflatoxins levels in dried fruits and nuts from Rabat-Salé, Morocco. *Food Control*, 19(9): 849-853.
- Kendall, C., Josse, A., Esfahani, A., Jenkins, D. 2010. Nuts, metabolic syndrome and diabetes. *British Journal of Nutrition*, 104: 465-473.
- Kensler, T.W., Egner, P.A., Wang, J., Zhu, Y., Zhang, B., Lu, P., Chen, J., Qian, G., Kuang, S., Jackson, P.E., Gange, S.J., Jacobson, L.P., Muñoz, A. Groopman, J.D. 2004. Chemoprevention of hepatocellular carcinoma in aflatoxin endemic areas. *Gastroenterology*, 127: S310-S318.
- Kensler, T.W. Qian, G.S., Chen, J.G., Groopman, J.D. 2003. Translational strategies for cancer prevention in liver. *Nature Reviews*, 3: 321-329.
- Khoshpey, B., Farhud, D.D., Zaini, F. Aflatoxins in Iran: Nature, hazards and carcinogenicity. *Iran Journal of Public Health*, 40(4): 1-30.
- Koehler, P.E., Hanlin, R.T., Beraha, L. 1975. Production of aflatoxins B<sub>1</sub> and G<sub>1</sub> by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* isolated from market pecans. *Journal of Applied Microbiology*, 30(4): 581-583.
- Kirk, G.D., Bah, E., Montesano, R. 2006. Molecular epidemiology of human liver cancer: insights into etiology, pathogenesis and prevention from The Gambia, West Africa. *Carcinogenesis*, 27(10): 2070-2082.

- Kok, W. Th. 1994. Derivatization reactions for the determination of aflatoxins by liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography B*, 659: 127-137.
- Krishnamachari, K., Bhat, R., Nrangajan, V., Tilak, T. 1975. Hepatitis due to aflatoxicosis. An outbreak in Western India. *Lancet*, 1: 1061-1063.
- Lawlor, P.G., Lynch, P.B. 2005. Mycotoxin management. *Africa Farming Food Process*, 46: 12-13.
- Leong, Y. H., Ismail, N., Latif, A.A., Ahmad, R. 2010. Aflatoxin occurrence in nuts and commercial nutty products in Malaysia. *Food Control*, 21(3): 334-338.
- Leeson, S., Díaz, G., Summers, J. 1995. *Poultry Metabolic Disorders and Mycotoxins*. Ontario: University Books, pp. 249-297.
- Leszczynska, J., Kucharska, U., Zegota, H. 2000. Aflatoxins in nuts assayed by immunological methods. *European Food Research and Technology*, 210(3): 213-215.
- Lillehoj, E.B., Ciegler, A., Hall, H.H. 1967. Aflatoxin B<sub>1</sub> uptake by *Flavobacterium aurantiacum* and resulting toxic effects. *Journal of Bacteriology*, 93: 464-471.
- Lindner, E. 1995. Toxicología de alimentos. 2<sup>a</sup> Edición. Acribia S. A. Zaragoza, España. 117-123.
- Llewelyn, G., Stepheson, G. Hoffman, J. 1977. AFB<sub>1</sub> toxicity and teratogenecy in Japanese Medaka eggs (*Oryzias latipes*). *Toxicon*, 15: 582-587.
- Lutfullah, G., Hussain, A. 2011. Studies on contamination level of aflatoxins in some dried fruits and nuts of Pakistan. *Food Control*, 22(3-4): 426-429.
- Lye, M., Ghazali, A., Mohan, J., Alwin, N., Nair, R. 1995. An outbreak of acute hepatic encephalopathy due to severe aflatoxicosis in Malaysia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 53: 68-72.
- Mahecha, G., Ovalle, A., Camelo, D., Rozo, A., Barrero, D. 2004. Vegetación del territorio CAR. 450 especies de sus llanuras y montañas. Bogotá, Colombia. 871pp.
- Mahoney, N., Molyneux, R.J., McKenna, J., Leslie, C.A., McGranahan, G. 2003. Resistance of "Tulare" walnut (*Juglans regia* cv. Tulare) to aflatoxigenesis. *Journal of Food Science*, 68(2): 619-622.
- Mahoney, N., Molyneux, R.J. 2004. Phytochemical inhibition of Aflatoxigenicity in *Aspergillus flavus* by constitutens of walnut (*Juglans regia*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(7): 1882-1889.
- Mahoney, N., Molyneux, R.J. 2010. Rapid analytical method for the determination of aflatoxins in plant-derived dietary supplement and cosmetic oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(7): 4065-4070.

- Mahoney, N., Molyneux, R.J., Kim, J.H., Campbell, B.C., Waiss, A.C., Hagerman, A.E. 2010. Aflatoxigenesis induced in *Aspergillus flavus* by oxidative stress and reduction by phenolic antioxidants from tree nuts. *World Mycotoxin Journal*, 3(1): 49-57.
- Martínez, M., Labuckas, D., Lamarque, A., Maestri, D. 2010. Walnut (*Juglans regia* L.): genetic resources, chemistry, by-products. *Journal of the Science Food and Agriculture*, 90: 1959-1967.
- Mazzetto, S.E., Lomonaco, D., Mele, G. 2009. Óleo da castanha de caju: oportunidades e desafios no contexto do desenvolvimento e sustentabilidade industrial. *Química Nova*, 32: 732-741.
- McLean, M., Dutton, M.F. 1995. Cellular interactions and metabolism of aflatoxin: An update. *Pharmacology & Therapeutics*, 65(2): 163-192.
- McMeans, J.L. 1983. Influence of yield on *in vitro* accumulation of aflatoxins in pecan (*Carya illinoensis* (Wang.) K Koch) nutmeats. *Applied and Environmental Microbiology*, 45 (2): 714-715.
- Midio, A.F., Campos, R.R., Sabino, M. 2001. Occurrence of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in cooked food components of whole meals marketed in fast food outlets of the city of Sao Paulo, SP, Brazil. *Food Additives and Contaminants*, 18: 315–319.
- Moctezuma-Zárata, M.G. 2002. Mutagénesis por AFB<sub>1</sub> presente en maíz y tortillas, y la nixtamalización como posible control. Tesis de Doctorado en Ciencias (Biología). Universidad Nacional Autónoma de México. 99 pp.
- Molyneux, R.J., Mahoney, N., Kim, J.H., Campbell, B.C. 2007. Mycotoxins in edible tree nuts. *International Journal of Food Microbiology*, 119(1-2): 72-78.
- MSCR, Ministerio de Salud de Costa Rica, 2002. *Guía de validación de métodos analíticos*. Disponible en: <http://www.ministeriodesalud.go.cr/empresas/protocolos/guiavalidacionmetodosanaliticos.pdf> [Último acceso el 19 de septiembre de 2013]
- Ngindu, A., Johnson, B., Kenya, P., Ngira, J. Ocheng, D. Nandwa, H., Omondi, T., Jansen, A., Ngare, W., Kaviti, J. N., Gatei, D., Siongok, T.A. 1982. Outbreak of acute hepatitis caused by aflatoxin poisoning in Kenya. *Lancet*, 1: 1346-1348.
- IRAM 32, Norma del Instituto Argentino de Normalización y Certificación. 1997. Quantifying uncertainty in analytical measurement. Metrología. Vocabulario VIM. Guide Eurachem- Citac Guide: 2000.
- Okoli, I.C., Nweke, C.U., Okoli, C.G., Opara, M.N. 2006. Assessment of the mycoflora of commercial poultry feeds sold in the humid tropical environment of Imo State, Nigeria. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 3: 9-14.

- Okoli, I.C., Ogbuewu, I.P., Okorie, J.O., Okoli, G.C., Ucheghu, M.C., Opara M.N., Ibekwe, V.I. 2007. Assessment of the mycoflora of poultry feed raw materials in the humid tropical environment. *American Journal of Science*, 3: 5-9.
- Olsen, J., Dragsted, I., Autrup, H. 1988. Cancer risk and occupational exposure to aflatoxins in Denmark. *British Journal of Cancer*, 58: 236-250.
- Omede, A.A., 2008. Critical issues in poultry feed quality evaluation in Nigeria. Proceedings of the 23rd Worlds Poultry Congress, June 29-July 4, Brisbane, Australia, 455 pp.
- OPS, Organización Panamericana de la Salud. 1983. Criterios de salud ambiental 11. Publicación Científica N° 453. Organización Mundial de la Salud. 2-83.
- OPS, Organización Panamericana de la Salud. 2002. La Salud de las Américas. Vol. I. Publicación Científica y Técnica N° 587. Organización Panamericana de la Salud. 449 pp.
- OMS, Organización Mundial de la Salud,. 2005. *Cifras destacables: el impacto del cancer*. [En línea]. Disponible en: <http://www.who.int/research/es/>. [Último acceso el 3 de agosto de 2012]
- Panagram, P.A., Abeysekera, K.H.T., Abeywickrama, K., Nugaliyadde. 2003. Fungicidal and anti-aflatoxigenic effects of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. (lemongrass) against *Aspergillus flavus* Link. Isolated from stored rice. *Letters in Applied Microbiology*, 37: 86-90.
- Papp, E., H-Otta, K., Záray, G., Mincsovic, E. 2002. Liquid chromatography determination of aflatoxins. *Microchemical Journal*, 73: 39-46.
- Park, J.W., Kim, E.K., Kim, Y.B. 2004. Estimation of the daily exposure of Koreans to aflatoxins B1 through food consumption. *Food Additives and Contaminants*, 21: 70-75.
- Petska, J.J. 1988. Enhanced surveillance of foodborne mycotoxins by immunochemical assay. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 71: 1075-1081.
- Phillips, T.D., Kubena, L.F., Harvey, R.B., Taylor, D.S., Heidelbaugh, N.D. 1988. Hydrated sodium calcium aluminosilicate: a high affinity sorbent for aflatoxin. *Poultry Science*, 67: 243-247.
- Pier, A., McLoughlin, M. 1985. Mycotoxin suppression of immunity. In: Trichothecenes and other mycotoxins. Edited by J. Lancey, John Wiley and Sons Ltd. 507-519.
- Pitt, J.L., Hocking, A.D. 1991. Significance of fungi in stored products. En *Fungi and Mycotoxins in Stored Products*, Vol 36, ed. Cahmp, B.R., Highley, E., Hocking, A.D., Pitt, J.L. pp. 16-21. Canberra: ACIAR Proc.



- Pitt, J.L., Hocking, A.D. 1997. *Fungi and Food Spoilage*. London: Blackie Academic & Professional, pág. 88.
- Pitt, J.L., Rocking, A.D., Bhudhasamai, K., Miscamble, B.F., Wheeler, K.A., Tamboon, E.K.P. 1993. The normal mycoflora of commodities from Thailand. 1. Nuts and oilseeds. *International Journal of Food Microbiology*, 20: 211-226.
- Purchase, I.F.H. 1967. Acute toxicity of aflatoxins M1 and M2 in one-day-old ducklings. *Food Cosmetics and Toxicology*, 5: 339-342.
- Rastogi, S., Dwivedi, P.D., Khanna, S.K., Das, M. 2004. Detection of Aflatoxin M<sub>1</sub> contamination in milk and infant milk products from Indian markets by ELISA. *Food Control*, 15: 287-290.
- Reye, R., Morgan, G., Baral, J. 1963. Encephalopathy and fatty degeneration of the viscera: A disease entity in childhood. *Lancet*, 2: 749-752.
- Rodríguez, M.L., Calonge, M.M., Ordoñez, D. 2003. ELISA and HPLC determination of the occurrence of aflatoxin M1 in raw cow's milk. *Food Additives & Contaminants*, 20: 276-280.
- Romer, T.R. 1975. Screening method for the detection of aflatoxins in mixed feeds and other agricultural commodities with subsequent confirmation and quantitative measurement of aflatoxins in positive samples. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 58: 500-506.
- Ross, R., Yuan, J., Yu, M., Wogan, G., Qian, G., Tu, J., Groopman, J., Gao, Y., Henderson, B. 1992. Urinary aflatoxin biomarkers and risk of hepatocellular carcinoma. *Lancet*, 339: 943-946.
- Samarajeewa, U., Sen, A.C., Cohen, M.D., Wei, C.L. 1990. Detoxification of aflatoxins in food and feed by physical and chemical methods. *Journal of Food Protection*, 53:489-501.
- Sanchis, V., Marín, S., Ramos, A.J. 2007. Factores determinantes en la producción de micotoxinas. En: J.M. Ramos ed. *Micotoxinas en Alimentos*. España: Ediciones Díaz de Santos, pp. 63-89.
- Schottenfield, D., Beebe-Dimmer, J. 2005. Advances in Cancer Epidemiology: Understanding causal mechanisms and the evidence for implementing interventions. *Annual Review of Public Health*, 26:37-60.
- Science Press and Missouri Botanical Garden Press. 1999. *Flora of China* Vol. 4. Missouri: Committee. 987 pp.
- Shank, R., Bourgeois, C., Keschamras, N., Chandavimol, P. 1971. Aflatoxins in autopsy specimens from Thai children with an acute disease of unknown aetiology. *Food and Cosmetics Toxicology*, 9: 501-507.

- SIAP, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2012. Producción anual. SAGARPA.  
Disponible en:  
[http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com\\_content&view=article&id=10&Itemid=15](http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=10&Itemid=15).  
[Último acceso el 1 de agosto de 2012].
- Sobolev, V.S., Dorner, J.W. 2002. Cleanup procedure for determination of aflatoxins in major agricultural commodities by liquid chromatography. *Journal of AOAC International*, 85(3): 642-645.
- Sobolev, V.S. 2007. Simple, rapid, and inexpensive cleanup method for quantitation of aflatoxins in important agricultural products by HPLC. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(6): 2136-2141.
- Sommayura, P., Boonsakan, P., Sobhonslidsuk, A., Sriphojanart, S., Euanorasetr, C. Bunyaratvej, S. 2007. Dysplastic nodules and small primary carcinoma of the liver: A study detecting the early morphological changes during hepatocarcinogenesis. *Journal of the Medical association of Thailand*, 90(2): 352-362.
- Soriano, J.M. 2007. *Micotoxinas en alimentos*. España: Ediciones Díaz de Santos. 396 pp.
- Stoloff, L. 1976. Occurrence of mycotoxins in foods and feeds. En: Mycotoxins and other fungal related food problems. Rodricks, J.V. ed. Washington D.C: American Chemical Society. 23-50.
- Sudzuki, F. 1996. *Frutales subtropicales para Chile*. Universitaria. Santiago, Chile. 218 p.
- Suhr, K.I., Nielsen, P.V. 2005. Inhibition of fungal growth on wheat and rye bread by modified atmosphere packaging and active packaging using volatile mustard essential oil. *Journal of Food Science*, 70: 37-44.
- Sweeney, M.J., Dobson, A.D.W. 1999. Molecular biology of mycotoxin biosynthesis. *FEMS Microbiology Letters*, 175: 149-163.
- Takahashi, D.M. 1977. Reversed phase high performance liquid chromatographic analytical system for aflatoxins in wines with fluorescence detection. *Journal of Chromatography*, Vol. 131: 147-156.
- Tocco, G., Fais, A., Meli, G., Begala, M., Podda, G., Fadda, M.B., Corda, M., Attanasi, O.A., Filippone, P., Berretta, S. 2009. PEG-immobilization of cardol and soluble polymer-supported synthesis of some cardol-coumarin derivatives: preliminary evaluation of their inhibitory activity on mushroom tyrosinase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 19: 36-39.
- Tovar-Guzmán, V., Hernández-Girón, C., Barquera, S., Rodríguez-Salgado, N., López-Carrillo, L. 2001. Epidemiologic panorama of stomach cancer mortality in Mexico. *Archives of Medical Research*, 32:312-317.

- Tsamouris, G., Hatziantoniou, S., Demetzos, C., 2002. Lipid analysis of Greek walnut oil (*Juglans regia* L.). *Zeitschrift fur Naturforschung*, 57: 51–56.
- Van Egmond, H.P., Visconti, A., Boenke, A., Speijers, G.J.A. 1995. *Mycotoxins and Toxic Plant Components*. Nueva York: Wiley, pp. 204.
- Venkatachalan, M., Sathe, S.K. 2006. Chemical composition of selected edible nut seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (13): 4705-4714
- Widstrom, N.W., McMillan, W.W., Wilson, D. 1987. Segregation for resistance to aflatoxin contamination among seeds on an ear of hybrid maize. *Crop Science Society of America*, 27: 961-963.
- Wild, C.P., Hall, A.J. 2000. Primary prevention of hepatocellular cancer in developing countries. *Mutation Research*, 462: 381-393.
- Williams, J., Phillips, T., Jolly, P., Stiles, J., Jolly, C., Aggarwal, D. 2004. Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposures potential health consequences, and interventions. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 80: 1106-1122.
- Wogan, G.N. 1991. Aflatoxins as risk factors for primary hepatocellular carcinoma in humans. *Pennington Center Nutrition Series*, 1: 3-17.
- Wogan, G. 1992. Aflatoxins as risk factors for primary hepatocellular carcinoma in humans. *Cancer Research Supplement*, 52: 2114s-2118s.
- Yan, P., Song, Y., Sakuno, E., Nakajima, H., Yabe, K. 2004. Cyclo (L-Leucyl-L-Prolyl) produced by *Achromobacter xylosoxidans* inhibits aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *American Society For Microbiology*, 70(12): 7466-7473.
- Yen, I.C., Bidasee, K.R. 1993. Liquid chromatographic determination of aflatoxins in animal feeds and feed components. *Journal of AOAC International*, 76(2): 366-370.