

UNIVERSIDA MICHOACANA DE SAN NICOLAS DE HIDALGO

ESCUELA DE QUIMICO FARMACOBIOLOGIA

**DETERMINACION DE MICOTOXINAS EN CACAHUATES, PISTACHES Y
PIMIENTA**

TESIS PROFESIONAL

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACOBIOLOGO**

**PRESENTA:
JOSE ANGEL JORDAN MARTINEZ**

ASESOR: D.C. VIRGINIA A. ROBINSON FUENTES

MORELIA, MICHOACÁN, AGOSTO 2007

INDICE

1.-INTRODUCCION	1
2.-GENERALIDADES	4
2.1.-MICOTOXINAS	4
2.1.1.-OCRATOXINA A	7
2.1.1.a.-Definicion	7
2.1.1.b.-Caracteristicas Fisicas y Quimicas	8
2.1.1.c.-Efectos en la Salud	9
2.1.1.d.-Niveles Permicibles	9
2.1.2.- AFLATOXINAS	10
2.1.2.a.-Definicion	10
2.1.2.b.-Caracteristicas Fisicas y Quimicas	10
2.1.2.c.-Efectos en la Salud	12
2.1.2.d.-Contaminacion	13
2.1.2.e.-Niveles Permicibles	14
2.1.3. ZEARALENONA	15
2.1.3.a.-Definicion	15
2.1.3.b.-Caracteristicas Fisicas y Quimicas	15
2.1.3.c.-Efectos en la Salud	16
2.1.3.d.-Niveles Permicibles	16
2.2.-PISTACHO	17
2.2.1.-Descripcion	18
2.2.2.-Produccion	18
2.2.3.-Propiedades	18
2.2.4.-Contaminacion	19
2.3.-PIMIENTA	19
2.3.1.-Descripcion	19
2.3.2.-Produccion	20
2.3.3.-Propiedades	20
2.3.4.-Contaminacion	21
2.4.-CACAHUATE	21
2.4.1.-Descripcion	22
2.4.2.-Produccion	22
2.4.3.-Propiedades	22
2.4.4.-Contaminacion	24

2.5.-CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA	24
2.6.-EXTRACCION EN FASE SOLIDA	25
3.-JUSTIFICACION	27
4.-OBJETIVOS	28
4.1-Objetivos Generales	28
4.2-Objetivos Específicos	28
5.-PARTE EXPERIMENTAL	29
5.1.-Materiales	29
5.2.-Equipo	29
5.3.-Muestreo	29
5.4.-Molienda	30
5.5.-Preparación de la Muestra	30
5.6.-Extracción en Fase Sólida	30
5.7.-Cromatografía en Capa Fina	31
6.-RESULTADOS	32
7.-DISCUSION	33
8.-CONCLUSIONES	37
9.-BIBLIOGRAFIA	38

ABREVIATURAS

ADN.	Acido desoxiribonucleico.
ARN.	-Acido ribonucleico.
AFB1	Aflatoxina B1
CCF.-	Cromatografia en Capa Fina.
EFS.-	Extracion en Fase Solida.
FAO-.	Food Agricultura Organization
FDA.-	Food and Drug Administration
JECFA.	Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Aditives
OMS	Organisacion Mundial de la Salud
OTA	Ocratoxina.
TLC	Thin Layer Chromatography
UE	Union Europra
UNICEF	Fondo de Naciones Unidas para la Infancia
USDA	Unid States Department of Agriculture
ZON	Zearalenona

RESUMEN

Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos por algunos hongos que son patógenos para humanos y animales al ser ingeridos. Existen diversos estudios sobre el contenido de micotoxinas en alimentos tanto para consumo humano como para el animal pero pocos son los que se han realizado en México para conocer la calidad de diversos alimentos.

Actualmente se recomienda el consumo de pistaches y cacahuates pues se sabe que tienen beneficios en la salud. La pimienta es un condimento de alto consumo pues forma parte de la comida tradicional mexicana. Sabiendo esto, es necesario saber la calidad de estos productos, en el Estado de Michoacán.

En este trabajo se recolectaron un total de 30 muestras de pistaches cacahuates y pimienta de diferentes municipios del estado de Michoacán, que se analizaron por medio de cromatografía de capa fina después de extracción en fase sólida en fase reversa con la finalidad de determinar la presencia de aflatoxinas B1, B2, G1 y G2, Ocratoxina A y Zearalenona.

Ninguna de las muestras presentó niveles detectables de las micotoxinas analizadas por lo que podrían considerarse seguras aunque se sugiere ampliar el muestreo para corroborar los resultados aquí obtenidos.

1 INTRODUCCION

Al menos el 25% de los cultivos alimentarios de todo el mundo están contaminados con micotoxinas. Esta contaminación se produce como resultado de las condiciones ambientales en el campo o de manipulaciones inadecuadas de recolección, almacenamiento y procesamiento de diferentes productos alimentarios (Park D, 1999).

Las micotoxinas fueron estudiadas más a fondo a partir de 1960, cuando se reportaron varios casos de micotoxicosis en animales. El primero involucró la muerte de pavos alimentados con harina de cacahuate contaminada con hongos. Debido a que la causa era desconocida en ese momento, los investigadores del Tropical Products Institute de Inglaterra la llamaron "Turkey X Disease" enfermedad X de pavos (Bennett J y Klich M, 2003).

Poco después, una enfermedad similar causó pérdidas severas de patos en Kenya. Al mismo tiempo se reportaron casos de carcinoma hepatocelular (CHC) en truchas arcoiris en criaderos de Estados Unidos y de Europa. Los análisis del alimento revelaron que la toxina era producida por *Aspergillus flavus* (Ledema B, 2004).

Las micotoxinas son metabolitos fúngicos tóxicos cuando son consumidos por animales o por humanos. Las toxinas pueden desarrollarse en almacenes bajo condiciones favorables para el crecimiento de hongos productores de estas (Jacobsen B, 1993).

Las micotoxinas son moléculas de bajo peso molecular y son metabolitos secundarios de algunos hongos. Las micotoxinas son contaminantes que son significativos, en los productos tanto agrícolas de alimentos para animales y humanos. Los hongos que producen estas toxinas pueden crecer durante el crecimiento de la planta o del fruto o durante su almacenamiento (Bhatnagar D y Ehrlich KC, 2002).

Las micotoxinas más importantes son: aflatoxinas, Ocratoxinas (OTA), fumonisina, tricocetenos y Zearalenona (ZON). Las aflatoxinas son potentes carcinógenos, y en asociación con hepatitis B, son responsables de miles de muertes anualmente en seres humanos (Pitt J y Miscamble A, 2000).

En todo el mundo hay un alto consumo de cacahuates, pistaches y pimienta, incluyendo a México. En nuestro país se siembran aproximadamente 100,000 hectáreas de cacahuete. Esta leguminosa es importante ya que contribuye a prevenir enfermedades del corazón y, además, son una fuente muy importante de energía. Los cacahuates son consumidos en diversas presentaciones, comúnmente en eventos de recreación (botana). Al igual que el cacahuete, el pistache es comúnmente consumido también como botana, estos dos productos son distribuidos al menudeo en la mayor parte del estado de Michoacán.

La pimienta es también muy utilizada en México ya que es indispensable para sazonar casi toda nuestra comida tradicional.

Estos productos se estudian porque son consumidos frecuentemente y no existen, en México, reportes que señalen su calidad microbiológica ni si se encuentran libres de micotoxinas.

Se han realizado trabajos para determinar la presencia de micotoxinas en cacahuates y pistaches en diversos países como: Venezuela, Egipto, Ecuador, Colombia, Brasil, Barcelona, Estados Unidos, Canadá, entre otros, y se han reportado cantidades considerables de micotoxinas. En México, se han hecho algunos trabajos sobre la contaminación en maíz forrajero y granos de café verde en el Estado de Nayarit (Robledo L, y cols 2001). Micotoxinas en alimentos para animal en Chihuahua (Torres S y Díaz L, 2002). Lara (2002) reportó métodos de determinación, identificación y control de micotoxinas en ingredientes para la nutrición animal en Puebla; mientras que López (1997) determinó la presencia de

micotoxinas en cereales adquiridos en mercados de Puebla y Tlaxcala. Finalmente, García (2005) reportó los niveles de micotoxinas en maíz para consumo humano disponible en el estado de Michoacán.

Son pocos los estudios realizados en México sobre el contenido de micotoxinas en diversos alimentos y en el Estado de Michoacán, son prácticamente nulos. Por lo que el presente trabajo tratará de arrojar algunos resultados sobre la posible contaminación de algunos productos de alto consumo.

2 GENERALIDADES

2.1 MICOTOXINAS

Las micotoxinas son metabolitos secundarios (Jawetz, 1995) tóxicos producidos por ciertos hongos en productos agrícolas expuestos a la infestación por hongos. De por sí, la presencia de los mohos reducen el valor nutritivo de los alimentos (Pietri A y cols, 2004). Los alimentos contaminados por micotoxinas representan una amenaza contra la salud.

El termino micotoxina fue introducido en 1962 por Forgacs y Carll, quienes lo definieron como una sustancia toxica de origen fúngico (López L, 1985).

Las micotoxinas presentan estructuras de bajo peso molecular producidas por hongos que causan efectos patológicos en los seres humanos y en los animales. Pueden generarse desde el campo o bien posteriormente después de la cosecha en el almacenamiento o en el procesamiento de los alimentos. Debido a su amplio intervalo de efectos tóxicos las micotoxinas pueden causar severas pérdidas económicas a los productores pecuarios y representan un riesgo para los consumidores de los alimentos que se obtengan de estas explotaciones pecuarias (Medina J y Gilber J, 1991).

Son compuestos ubicuos que difieren mucho en sus propiedades químicas, biológicas y toxicológicas (Carrillo L, 2003). Su presencia en niveles superiores a los tolerables representa una amenaza y un riesgo importante en salud. No obstante, la posible toxicidad crónica de muchas micotoxinas (aflatoxinas, ocratoxinas, fumonisinas o ZON, entre otras) en bajas dosis suele suscitar mayor preocupación que la toxicidad aguda.

El impacto de micotoxinas en la salud de humanos y animales es ahora cada vez más reconocido. El ingreso de micotoxinas a los humanos y animales es principalmente por la ingestión en la dieta. (Naccha R y cols, 2005).

Las micotoxinas exhiben una amplia gama de efectos biológicos pueden ser mutagénicas, carcinogénicas, embriotóxicas o estrogénicas. También pueden ser inmunosupresivas y parecen estar involucradas en el fenómeno de inmunidad celular y humoral no específica (Smith E, 2004). La Tabla 1 muestra las diversas micotoxinas que pueden estar contaminando los alimentos, los microorganismos que las producen, los alimentos en que se pueden encontrar y sus posibles efectos en el organismo.

Los hongos *Aspergillus flavus*, *A. parasiticum* y *A. nomius* son los responsables de la producción de aflatoxinas (B1, B2, G1, G2). *A. nomius* es una especie rara a la que no sé le ha relacionado con el pistacho ni a su contaminación por aflatoxina. De todas las micotoxicosis, la contaminación por *Aspergillus flavus* es la que ha tenido un mayor impacto en la sociedad (Murray, 1999). En la Tabla 2 se pueden observar los principales hongos micotoxigénicos y las micotoxinas que producen.

Tabla. 1

Principales micotoxinas y toxinas producidas por hongos en cereales, soya, cacahuates, entre otros productos, y algunos de los efectos en animales.()

TOXINA	ORIGEN	ALIMENTO AFECTADO	POSIBLES EFECTOS
Toxinas de <i>Aspergillus</i> (primordialmente) aflatoxinas B1, B2, G1, G2, presentes en granos; M1, M2, presentes en la leche	<i>Aspergillus flavus</i> y <i>A. parasiticum</i> .	Granos de cereales, cacahuates, soya y otros alimentos.	Hepatotoxicidad, carcinogenicidad, enteritis hemorrágica, supresión inmunologica.
Ocratoxina, (nefrotoxinas).	<i>A. ochraceus</i> y <i>Penicillium</i>	Granos de cereales	Toxico en riñones e hígado

	<i>viridicatum.</i>		
Esterigmatocistina	<i>A. nidulans</i> y <i>A. versicolor</i>	Granos de cereales	Toxemia carcinogénica.
Toxina Tremorgénica	<i>A. flavus</i> , <i>P. cyclospium</i> y <i>P. palitans</i> ,	Granos de cereal, cacahuates, soya y otros alimentos	Temblor y convulsiones
Toxinas de <i>Penicilium</i> (primordialmente) Luteoselyrin	<i>P. islandicum</i>	Arroz,	Temblor y convulsiones
Patulina	<i>P. urticae</i> , <i>P. expansum</i> . <i>P. Claviforme</i> y <i>A. Clavatus</i>	Granos de cereal, manzanas	Hemorragias de pulmones y cerebro, edema toxico en riñones y posible carcinogénica.
Zearalenona (síndrome estrogénico) Zearalenol	<i>F.graminearum</i> , <i>F. tricinctum</i> , y en menor manera, <i>F. moniliforme</i>	Granos de cereal	Hiperestrogenismo, infertilidad
Deoxinivalenol o DON	<i>F. gramineum</i> (estado sexual, <i>Gibberella Zeae</i> .	Granos de cereal	Alimento rechazado por cerdos, gatos, perros, reducción en gran peso,
Tricocentenos (t-2,HT-2, monocetoxiscripenol o MAS, Diactoxiscripenol DAS)	<i>F. tricinctum</i> , <i>F. Gramunarum</i> , <i>F. Equisel</i> , <i>F.lateritium</i> , <i>F. Poae</i> y <i>F.sporotricoides</i>	Granos de cereal	Severa inflamación de tracto gastro intestinal y posible hemorragia, edema, vomito y diarrea, infertilidad, degeneración de medula de hueso, reducción de peso, crecimiento lento y esterilidad
Fumonisinias B1, B2	<i>F. moniliforme</i>	Maiz	Leucoencefalomalacia
Toxinas de Ergot ergopeptinas	<i>Claviceps purpurea</i>	Granos de cereal	Vasoconstricción
Ergovalina	<i>Acremonium coenofialum</i>	Fescue	Reducción de peso

Tabla. 2

Algunos de los principales metabolitos tóxicos producidos por hongos contaminantes de los alimentos

HONGOS	PRINCIPAL METABOLITO TÓXICO
<i>Aspergillus flavus</i>	Aflatoxinas B, M, G; ácido kojico
<i>A. parasiticus</i>	Aflatoxinas B, M
<i>A. ochraceus</i>	Ocratoxina A
<i>Fusarium tricenectum</i>	T-2 toxina
<i>F. roseum</i>	T-2 toxina
<i>F. moniliforme</i>	Zearalenona (F-2 toxina)
<i>Gilerella zeac</i>	2-Deoxinivalenol (Don)
<i>Penicillium viridicatum</i>	Ocratoxina A
<i>P. vyclopium</i>	Ocratoxina A

2.1.1 OCRATOXINA A

A. DEFINICION.

La OTA, es un metabolito secundario producido por hongos tales como *Aspergillus alutaceus*, *Penicillium verrucosum* y *P. viridicatum* durante el almacenamiento de alimentos destinados tanto para consumo humano como de animales. Es un potente nefrotóxico, inmunosupresivo, teratogénico y se ha reportado que también posee efectos carcinogénicos (Scout P, 2002).

B. CARACTERISTICAS FISICAS Y QUIMICAS

Es un compuesto cristalino, coloreado. Es altamente soluble en solventes polares orgánicos y muy poco soluble en agua (Ueno Y, 1987); es bastante estable al tiempo y al calor.

Las ocratoxinas son un grupo de siete isocumarinas derivadas unidas con una amida enlazada al grupo amino de la L-β-fenilalanina. La OTA es la más dominante y más toxica de los miembros de la familia (Xiao H y cols, 1996, Bayman P y cols, 2002). La OTA posee un esqueleto pentaquétido y contiene una

porción de isocumarína Clorinda ligada a través de un grupo de carboxilo a la L - fenilalanina mediante un enlace amino.

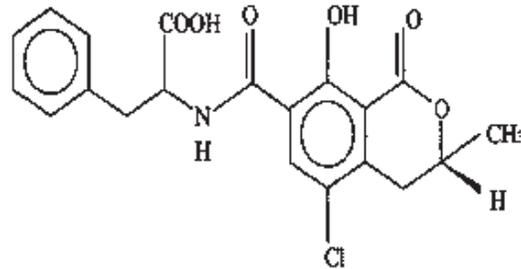


Figura 1. Estructura química de la OTA

La *OTA* fue descubierta a mediados de los 60s en el sur de África durante estudios de laboratorio en la búsqueda de nuevos metabolitos tóxicos. No se relacionó con enfermedades en humanos o en animales.

En varias regiones de Yugoslavia, Rumania, y Bulgaria, fueron descritas una serie de enfermedades fatales involucradas con un síndrome nefrotóxico, aunque no se conocían las causas exactas de la enfermedad, se pensó que estaba asociada con la alta exposición de ocratoxinas en esa área. (Steuder R y cols, 1994)

C. EFECTOS EN LA SALUD

La *OTA* es una de las micotoxinas más tóxicas (Abarca M y cols, 1994). Esta micotoxina se detecta en alimentos para humanos y para animales, principalmente en países con temperatura de clima tropical (Zepnik H y cols, 2001).

La *OTA* es lentamente absorbida por el tracto gastrointestinal y se distribuye por la sangre, principalmente a los riñones. Concentraciones bajas están presentes en el hígado, músculo y grasas. La *OTA* es excretada en la orina y en las heces. La *OTA* ha mostrado ser nefrotóxica en todas las especies de mamíferos estudiados (Boorman G y cols, 1992).

La OTA es un potente inhibidor competitivo de la ligasa fenilalanina-t RNA que da lugar a la inhibición de la síntesis proteica y secundariamente de la síntesis de ARN y ADN. Los efectos tóxicos agudos de la OTA quedan inhibidos por la coadministración de fenilalanina (Walker, 1999).

En un estudio que se realizó en el Departamento de Patología en la Universidad de Napoli Federico II, Italia, se encontró que concentraciones nanomolares de OTA promueven apoptosis en tipos (Scibelli, 2003).

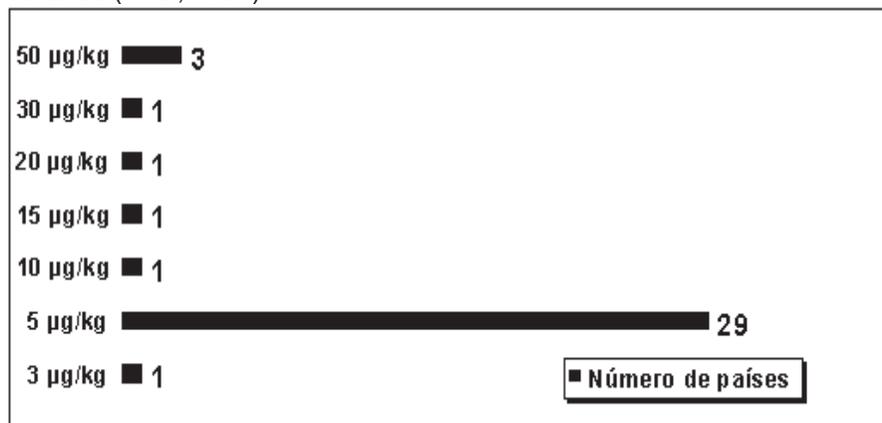
La concentración de micotoxinas se expresa en $\mu\text{g}/\text{Kg}$. Los valores presentes en granos han llegado hasta un máximo de $5 \mu\text{g}/\text{Kg}$. El Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA, 1996) estimó tolerable una ingesta semanal máxima de $0,1 \mu\text{g}/\text{Kg}$ (Carrillo L, 2003).

D. NIVELES PERMISIBLES

El JECFA ha recomendado una ingesta semanal aproximadamente 14 ng diarios por Kg de peso corporal. No todos los países han establecido límites máximos tolerables y aún en aquellos países que los tienen, varían significativamente, como se puede apreciar en la Figura 2.

Figura 2

Número de países de la Unión Europea que han establecido límites para OTA y niveles de tales límites para cereales y productos a base de cereales (FAO, 2004).



2.1.2 AFLATOXINAS

A. DEFINICION

Las aflatoxinas son sustancias químicas producidas por cepas toxigénicas de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*. Estas sustancias pueden causar enfermedad y muerte, tanto en animales como en seres humanos (Ledezma B, 2004).

Las aflatoxinas se producen en la mayoría de granos y productos a base de frutos secos. Las aflatoxinas se descubrieron en 1960, cuando 100,000 pollos de pavo murieron a consecuencia de la ingestión de harina de cacahuete contaminada por un hongo. En la harina de cacahuete se encontró *Aspergillus flavus*, junto con toxinas extraíbles con alcohol, a las que se denominó aflatoxinas (Sommer, 1986)

Los hongos *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* son ubicuos y pueden afectar las cosechas, arroz, maíz, cacahuates, nueces, chiles y especias en la que se basa la dieta de muchos países, principalmente los que están en vías de desarrollo. (Jonathan H, 2004).

B. CARACTERISTICAS FISICAS Y QUÍMICAS

La Tabla 3 muestra características fisicoquímicas específicas de cada una de las aflatoxinas que más comúnmente se encuentran en productos agrícolas.

- Solubles en cloroformo, soluciones acuosas de metanol, acetonitrilo, acetona.
- Susceptibles a la hidrólisis alcalina.
- Se descomponen al tratarse con amoníaco o con soluciones de hipoclorito de sodio (pH>10.5).
- Son termoresistentes.
- Estables en un intervalo de pH entre 3 y 10.

Tabla 3

Características fisicoquímicas de las aflatoxinas que más comúnmente contaminan alimentos (Lowell, 1992).

Aflatoxina	Nombre Químico.	forma	P.de Fusión	Fluorecencia	UV. máx.	Peso Molecular	Formula molecular
B1	2,3 6a α , 9a α -tetrahidro-4-metoxiciclopenta(c) furo (3',2', 4,5) furo (2,3-h) (1) benzo-pirano-1,11-diona.	cristales	268-269°C	azul	362nm	312.0633	C ₁₇ H ₁₂ O ₆
B2	2,3,6a ,8,9a α -hexadidro-4-metoxiciclopenta(c) furo(3', 2', 4,5) furo(2,3-h) (1) benzo-pirano-1,11-diona.	cristales	286-289°C	azul	363nm	314.0790	C ₁₇ H ₁₄ O ₆
G1	3, 4, 7a, 10a-tetrahidro -5-metoxi -1H, 12H-furo -[3',2': 4,5] furo[2,3-h]-pirano [3,4c] [1]-benzopirano -1,12-diona.	cristales	244-246°C	verde	362nm	328.0582	C ₁₇ H ₁₂ O ₆
G2	3, 4, 7a, 9, 10, 10a α -hexahidro -5-metoxi -1H, 12H-furo [3',2': 4,5] furo[2,3-h]-pirano -[3,4c] [1]-benzopirano -1,12-diona.	cristales	237-240°C	verde	363nm	330.0739	C ₁₇ H ₁₄ O ₇

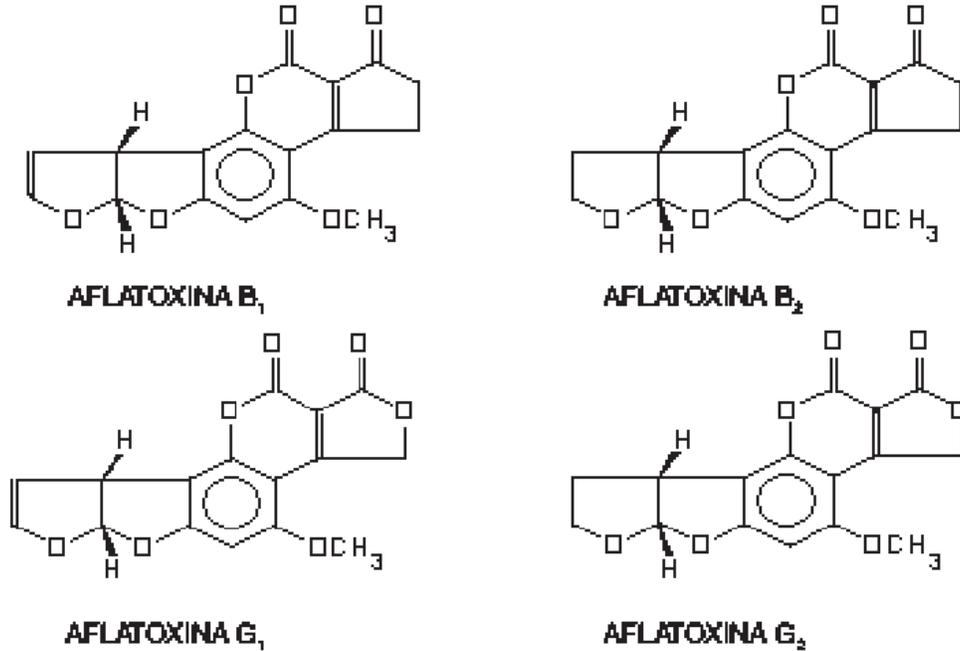


Figura 3.
Estructuras químicas de las aflatoxinas que comúnmente se encuentran contaminando productos agrícolas.

C. EFECTOS EN LA SALUD.

Las aflatoxinas se conocen como un potente carcinogénico presente en los pistachos a nivel mundial. Como los consumidores son cada vez más conscientes de su salud, el problema de las micotoxinas comienza a cobrar importancia entre ellos, por lo que promueven más medidas preventivas y correctivas (Hadavi E, 2005).

La hepatocarcinogenicidad causada por las aflatoxinas se observó en estudios epidemiológicos de áreas de Asia y África, tanto para animales como para humanos después de que consumieron ambos alimentos contaminados con aflatoxinas (Bintvihok A y Kositcharoenkul S, 2005). El metabolismo hepático juega un papel importante para la acción biológica de la AFB1 ya que en ese órgano se realiza mediante una detoxificación en pasos conversión de AFB1 a

AFM1, AFP1, AFQ1, AFB2a y aflatoxicol que se considera ya que ninguno de estos metabolitos tiene la misma toxicidad que la AFB1.

El efecto hepatocarcinogénico de las aflatoxinas esta bien establecido tanto en animales de granja y como de laboratorio. Se sabe que la exposición crónica a aflatoxinas compromete la inmunidad e interfiere con el metabolismo de proteínas y múltiples micronutrientes que son críticos para la salud. Estos efectos no han sido extensamente estudiados en humanos, pero la información disponible indica que como mínimo alguno de los efectos observados en animales también puede ocurrir en humanos (Jonathan H, 2004).

Se considera a la *AFB1* como el más poderoso agente cancerígeno conocido del grupo de las micotoxinas, ya que en dosis muy pequeñas (15 µg/kg), produce hepatomas en ratas (Bintvihok A y Kositcharoenkul S, 2005). La AFB1 es considerablemente genotóxica, es hepatotóxica en humanos y animales, y es nefrotóxica e inmunosupresiva en animales (Geiser D y cols 1997).

El grado de toxicidad y carcinogenicidad de las aflatoxinas sigue el siguiente orden:

$$B_1 > G_1 > B_2 > G_2$$

D. CONTAMINACION

Las aflatoxinas son un contaminante común de alimentos las aflatoxinas se producen por de hongos durante la producción, cosecha, almacenaje y procesamiento de alimentos. Es considerada por la FDA como un contaminante de alimentos (Jonathan H, 2004).

Los frutos secos y piensos almacenados inadecuadamente así como productos agrícolas expuestos a mucha humedad y altas temperaturas facilitan el desarrollo de hongos. La presencia de estos microorganismos estropea los productos reduce

sus cualidades y favorece el crecimiento de micotoxinas. (Joanna D y Bastos R, 2004).

Las temperaturas de crecimiento para *Aspergillus flavus* son: mínima de 6-8°C, óptima de 36-38°C y 44-46°C como máxima. Para que produzcan las aflatoxinas, se requieren las siguientes condiciones térmicas: 12°C temperatura mínima, 27-30°C la óptima y 40-42°C la máxima (Ledesma B, 2004)

El *Aspergillus flavus* y el *Aspergillus parasiticus* están considerados como hongos termotolerantes y microtermofílicos. Los mayores niveles de contaminación se presentan en las regiones tropicales y semitropicales, en donde el clima favorece el crecimiento de los hongos productores de aflatoxinas, puede haber contaminación de los alimentos provenientes de zonas templadas, ya que el *Aspergillus flavus* está distribuido universalmente y su contaminación con aflatoxinas en los alimentos ha sido detectada en todo el mundo (Chiavaro E y cols, 2005)

E. NIVELES PERMISIBLES

Las aflatoxinas se consideran contaminantes inevitables de los alimentos, se tiene la necesidad de establecer niveles máximos de aflatoxinas en los alimentos. Los límites para la AFB1 en los alimentos varían de 0 a 30 µg/Kg, con un margen de variación de 0 a 50 mg/Kg. para las aflatoxinas totales.

El Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios llegó a la conclusión que 10 µg/Kg -20 µg/Kg de AFB1 en los alimentos Los niveles de referencia innecesariamente bajos para las aflatoxinas pueden crear obstáculos técnicos al comercio (FAO, 2003).

Muchos países han establecido normas para controlar la presencia de aflatoxinas. En 1996, el PAG, patrocinado por FAO/OMS/UNICEF estableció como nivel máximo permisible 30 ppb de aflatoxinas en general en los alimentos.

Tabla 4

Limites máximos permisibles en distintos países del mundo para AFB1 y aflatoxinas totales,

PAÍS	LÍMITE MÁXIMO PERMISIBLE
Dinamarca, Gran Bretaña, Finlandia, Polonia, Suecia.	5 ppb de B ₁
Francia	30 ppb en general
Alemania Federal	10.ppb como totales 5 ppb de B ₁
Canadá	20 ppb como totales 5 ppb de B ₁
EE.UU.	20 ppb como totales (suma de B ₁ + B ₂ + G ₁ + G ₂)

(Van Egmond H, 2002).

2.1.3. ZEARALENONA

A. DEFINICION

La ZON es un metabolito fúngico, producido principalmente por *F. graminearum* y *F. culmorum*, que se sabe coloniza el maíz, la cebada, el trigo, la avena y el sorgo, entre otros. De los numerosos derivados de la ZON, que puede producir la especie *Fusarium*, se ha encontrado que sólo el trans- α -zearalenol puede presentarse naturalmente en los cereales en grano. Estos compuestos muestran baja toxicidad, pero notables propiedades estrógenas y anabólicas en ratas, ratones, pollos y ganado porcino (Mirocha J, 1999).

B. CARACTERISTICAS FISICAS Y QUIMICAS

Es un compuesto cristalino, blanco, con punto de fusión de 164-165 °C, insoluble en agua, disulfuro de carbono y tetracloruro de carbono; soluble en álcalis acuosos, éter dietílico, benceno, cloroformo, cloruro de metileno, acetato de etilo, acetonitrilo y alcoholes.

La ZON es termoestable; es una lactona de ácido resorcílico con actividad uterotrópica y anabólica, también conocida como toxina T-2.

La ZON y la zearalenol actúan como estrógenos porque pueden adoptar una conformación que se parece suficientemente a 17β -estradiol y otros estrógenos naturales para permitir el enlace con el receptor estrógeno (Richard J y cols, 1993).

C. EFECTOS EN LA SALUD

La ZON ha sido caracterizada como un compuesto no tóxico puesto que una sola dosis por vía oral de 20 000 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de peso corporal no causa la muerte de ratones.

Su potencial estrógeno es comparable al de los estrógenos estrón y estriol. Sin embargo, la contribución de la ZON a la carga total ambiental de estrógenos no se ha determinado todavía (Mirocha J, 1999).

F. graminearum produce ZON junto con desoxinivalenol y se ha señalado la posible relación de ambas sustancias con brotes de micotoxicosis agudas en personas (Udagawa S, 1988).

La exposición a maíz contaminado con ZON ha ocasionado hiperestrogenismo en animales, especialmente cerdos, caracterizado por vulvovaginitis e infertilidad. En estudios con animales de experimentación se han obtenido pocas pruebas de la carcinogenicidad de la ZON (Udagawa S, 1988).

D. NIVELES PERMISIBLES

La ZON, está actualmente reglamentada para los alimentos en 16 países . La ZON está relacionada estructuralmente con el α -zearalanol (zeranol), un promotor del crecimiento anabólico prohibido en la UE (Unión Europea) en 1988. El ganado metaboliza la zearalenona a varios compuestos, incluido el zeranol.

Reglamentando el contenido de ZON en las raciones animales podría controlarse el problema resultante de la presencia de zeralol natural en los tejidos comestibles. Los niveles permisibles para la ZON en el maíz y en otros cereales varían actualmente entre 50 y 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

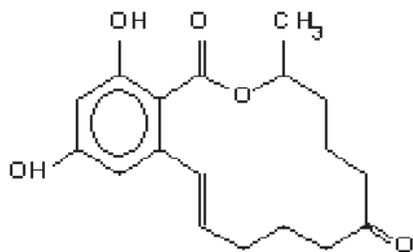
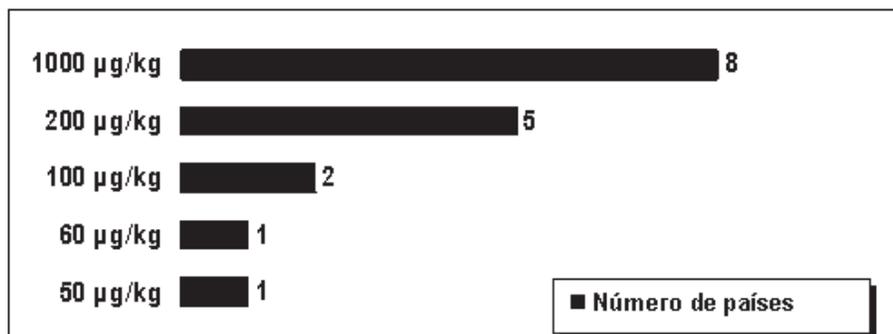


Figura 3
Estructura química de la ZON

Figura 4.
Numero de países a nivel mundial que han establecido límites para la ZON en maíz y otros cereales (FAO, 2003)



2.2. Pistacho



Figura 5
Frutos de pistacho

2.2.1 DESCRIPCION

El pistacho (*Pistacia vera*) es una fruta agrupada semiseca (fruta de hueso); la fruta consiste en una única semilla (almendra) y un revestimiento de la semilla (tegumento), encerrado en un endocarpio (cáscara) huesudo y delgado que esta rodeada por el mesocarpio y el epicarpio (corteza). La recolección se realiza con agitación mecánica con un bastidor o a mano. Las nueces del pistacho contienen un 40-50% de humedad en el momento de la recolección (Olsen M, 1999)

El árbol de pistacho es nativo de Afganistán, del occidente de Asia y Asia menor, Turquía fue el primer lugar donde lo utilizaron para consumirlo según estudios arqueológicos (Duke JA, 1989).

2.2.2 PRODUCCION

La producción de pistacho alrededor del mundo es de aproximadamente de 501 millones de toneladas métricas. Los principales países productores, se muestran a continuación:

Irán	38%
U.S (principalmente California)	28%
Turquía	12%
Siria	12%
China	7%
Grecia	2%
Resto del mundo	1%

California produce pistachos que se distribuyen a casi todo Estados Unidos de Norte América, Europa, Canadá y al menos la otra mitad de la producción es exportada, principalmente a China, Hong Kong, Japón (JECFA,1996).

2.2.3 PROPIEDADES

Todas las nueces, incluyendo pistachos, contienen algunas grasas saturadas pero son consideradas bajas. Los pistachos son una fuente rica de potasio de toda la familia de las nueces, una onza de pistachos proporciona más de 10% de la dieta

de fibra evaluada al día, vitamina B6, tiamina, magnesio, fósforo y cobre (JECFA, 1996).

2.2.4 CONTAMINACION

Muchos hongos del genero *Aspergillus* infectan y estropean las almendras del pistacho, su presencia puede constituir un grave problema porque varias especies de este género producen micotoxinas.

La rotura de la corteza del pistacho (apertura prematura) es un fenómeno importante para su infección con *A. flavus* o *A. parasiticus*. La ruptura expone la almendra a esporas fúngicas trasportados por el viento o insectos que pueden acarrear esporas fúngicas en sus cuerpos. (Olsen M, 1999).

2.3 Pimienta



Figura 6.
Planta de la pimienta y frutos

2.3.1 DESCRIPCION

Piper nigrum L. es un planta leñosa trepadora o rastrera vivaz, de follaje perenne, que puede alcanzar 10 metros de altura. Hojas coriáceas, de color verde grisáceo, pecioladas, anchamente aovadas o suborbiculares, provistas de tres nervios medios prominentes y dos nervios laterales.

Su área principal de producción está en los trópicos asiáticos; y en América se le cultiva en la región amazónica de Brasil y Perú. Es una de las especias de uso más antiguo; su domesticación ocurrió probablemente en la India, de allí se extendió al archipiélago indomalayo y llevada a Europa antes de la Era Cristiana. Sin embargo fue después que los árabes abrieran el camino de las especias entre India y Europa, en los siglos X a XII, que la pimienta alcanzó altos precios y fue uno de los incentivos más poderosos para iniciar las grandes conquistas europeas del siglo XV.

Generalmente, la pimienta requiere baja altitud se le puede encontrar hasta los 1.000 metros. Requiere un clima caliente y húmedo, con precipitaciones anuales entre 1.500 a 2.500 mm, bien distribuido durante el año, ya que no soporta períodos prolongados de sequía. La temperatura anual media óptima varía entre 25 y 30°C y la humedad entre 60-93%. La familia de la pimienta contiene más o menos doce géneros y mil cuatrocientas especies de hierbas, arbustos, guías y árboles nativos de las áreas tropicales y subtropicales del mundo (Meyer H, 1992). La pimienta es la más importante de las especias, con muchos países que la importan y muy pocos productores.

2.3.2 PRODUCCION

La producción mundial de pimienta en el 2003 fue estimada en 327,250 toneladas métricas. La pimienta es nativa de la India, país que es uno de los principales productores de esta especie. En América Latina el principal productor es Brasil y el que mas importa es Estados Unidos.

2.3.3 PROPIEDADES

A dosis bajas es estimulante del sistema nervioso central y de las secreciones digestivas. A dosis mayores es diaforético y tenífugo.

Además es bactericida, conservante de los alimentos y, en uso tópico, rubefaciente y estornutatorio. Indicado en dispepsias hiposecretoras, prevención de gastroenteritis.

En uso externo: inflamaciones osteoarticulares, mialgias, contracturas musculares, forúnculos. Se usa externamente en linimentos y pomadas.

Esta constituido por aceites esenciales, materias nitrogenadas y otras sustancias (Martins A y cols, 1998). Además tiene propiedades como antioxidante natural (Nakatani, 1992). También se le han atribuido propiedades beneficiosas frente al cáncer (Concon J y Thomas W, 1979).

2.3.4 CONTAMINACION

Una alta incidencia de contaminación fue verificada en ambas regiones cuando 99.1% de las muestras mostraron contaminación de hongos el genero *Aspergillus* (53%), de las cuales *Aspergillus flavus* estaba presente en 55 muestras de pimienta negra (Gatti M y cols, 2004)

En Brasil se aislaron un total de 42 especies *Aspergillus flavus* y *A. níger* a partir de pimienta negra y pimienta blanca, de las cuales fueron aisladas siendo, más frecuentemente de pimienta negra que de pimienta blanca (Freire F y Paterson R, 2000).

2.4 CACAHUATE

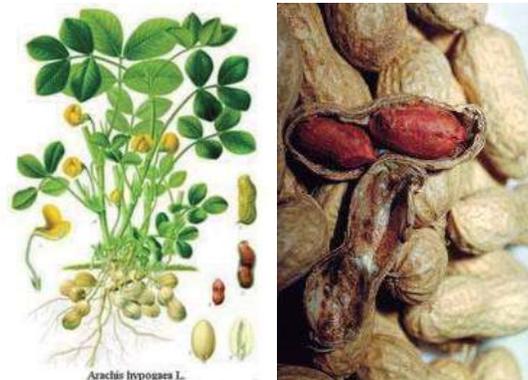


Figura 7
Vainas de cacahuete

2.4.1 DESCRIPCION

La familia *Fabacea del cacahuate (Hypogaea arachis)*. Es una planta herbácea originaria de America del sur, mide de 30 a 50 cm de altura. Las vainas absorben nutrientes. Las frutas arrugan las cáscaras que son estrechas entre dos a tres semillas tienen una capa fina de papel, las vainas maduran de 120 a 150 días después de que se plantan las semillas. Si la cosecha es prematura las vainas serán inmaduras. Si se cosechan tarde, las vainas permanecerán en el suelo (Mphande F y cols, 2003)

2.4.2 PRODUCCION

El cacahuate en el mundo se siembra aproximadamente en 20 millones de hectáreas y ocupa el tercer lugar entre las leguminosas, después de la soya y fríjol, los cuales se producen en 55 y 26 millones de hectáreas. En México se produce desde la época prehispánica y ocupa una superficie aproximada de 100,000 hectáreas, en los estados de Morelos, Puebla, Guerrero, Michoacán, Oaxaca, y Chiapas se cultiva en condiciones de secano, en suelos marginales. Hoy día la producción alcanza 10.000 a 15.000 toneladas anuales de cacahuate en cáscara

Se distinguen tres grupos o razas de cacahuates con características morfológicas diferentes: el Virginia semirrecto, Vulgaris de consistencia rígida y el grupo Valencia de consistencia laxa y erecta (Sánchez 2005).

2.4.3 PROPIEDADES

Investigaciones conducidas por un grupo de científicos de la USDA muestran que los cacahuates son una fuente rica para la salud del corazón, ya que pueden ayudar a reducir los riesgos de enfermedades como el cáncer y del corazón (Awad, 2000). El cacahuate es una fuente muy importante de energía.

Nutrición del cacahuate evaluada en 100g.

Energia	590kcal
Carbohidratos	22g

Fibra dietética	9g
Grasa	50g
Grasa Saturada	7g
Monosaturada	25g
Polisaturada	16g
Proteínas	24g

Proteínas.

Los cacahuates contienen un contenido mayor de proteínas en comparación con otras leguminosas y nueces.

Grasas insaturadas

Los cacahuates contienen grasas monosaturadas y polinsaturadas. Estas grasas ayudan a reducir los niveles de colesterol en la sangre lo que ayuda a reducir enfermedades en el corazón.

Fibra

Un pequeño puñado de cacahuates contiene aproximadamente 2g de fibra, que representa el 9% de la porción diaria requerida.

Vitamina E

Cada onza de cacahuates proporciona el 16% de la vitamina E requerida y ha mostrado una acción de antioxidante, la cual ayuda a reducir enfermedades del corazón.

Minerales

Los cacahuates también son una fuente importante de minerales esenciales como son magnesio, fósforo, potasio, zinc y cobre.

Vitaminas B

Los cacahuates contienen una buena fuente de folato (Awad A y cols, 2000).

2.4.4.- CONTAMINACION

Los cacahuates son particularmente susceptibles a la contaminación durante crecimiento y almacenaje. Un almacenaje inadecuado de cacahuates puede conducir a una contaminación por el hongo *Aspergillus flavus* productor de aflatoxinas (Vázquez M, 2001).

El cacahuete posee una de las semillas que se forman dentro de los frutos enterrados más susceptibles a la infección por hongos y a la contaminación con micotoxinas por que permanecen mucho tiempo en contacto con la microflora del suelo por lo que es altamente vulnerable de ser infectado por una o mas especies de hongos (Mazzani C y Layrisse A, 1994).

La presencia de hongos micotoxigenicos en las semillas del cacahuete han representado desde 1960 hasta la fecha, un serio problema para la producción e industrialización de esta leguminosa en todas las partes del mundo y en México (Mazzani C y Layrisse A, 1994).

En Egipto se recolectaron 40 muestras de cacahuete analizadas por cromatografía en capa fina y se encontró que estaban contaminados por aflatoxinas, además *Aspergillus flavus* fue el hongo contaminante más frecuente (Sabad y cols, 2003).

2.5 CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA

Esta técnica es sencilla, versátil, barata y de gran importancia. Las separaciones sobre la capa, que es una fase estacionaria delgada que recubre una placa de vidrio, metal o plástico, se basa en procesos de adsorción, reparto, exclusión de intercambio iónico (Donald JP, 1983).

Los componentes de una mezcla pasan a través de una fase estacionaria mediante el flujo de una fase móvil y las separaciones están basadas en las diferencias en la velocidad de migración entre los componentes de la fase móvil (West S Haller C, 2001).

La cromatografía en capa fina, o CCF, al igual que la cromatografía en papel, no es costosa y es sencilla: el proceso puede requerir una media hora aproximadamente, mientras que la CCF es muy popular y se utiliza de rutina en muchos laboratorios. Los adsorbentes más comunes son la alumina, la sílica gel y la celulosa. La CCF tiene ventajas sobre la cromatografía en papel de ser más rápida (West S y Holler C, 2001).

La muestra, que por lo general es una mezcla de compuestos orgánicos, se aplica cerca del final de la placa en forma de un pequeño volumen de solución de microlitos que contienen microgramos de los compuestos, se pueden aplicar con jeringas hipodérmicas o una pipeta de vidrio pequeña (Underwood A, 1989).

El análisis cualitativo consiste en determinar la distancia que recorre la muestra en relación a la distancia recorrida por la fase móvil. La relación y distancia es lo que se llama factor de retención o índice de retención, R_f (Rubinson KA y Rubinson JF, 2001).

2.6.- EXTRACCION EN FASE SÓLIDA.

La Extracción en Fase Sólida (EFS) es una potente y simple técnica de limpieza de muestras que es, al mismo tiempo, rápida y económica. Una columna consiste en un lecho de adsorbente de partículas gruesas mantenido entre dos discos porosos en un tubo desechable. La EFS permite la preconcentración de la muestra con un riesgo mínimo de pérdida o contaminación de la misma.

El primer paso para la extracción es utilizar un solvente orgánico para "humectar" la fase. Con fases hidrofóbicas (C18) se usa un solvente polar, como el metanol. Con fases estacionarias polares se usa un solvente no polar.

La fase estacionaria en EFS se condiciona con el mismo solvente de la matriz de la muestra. El condicionamiento permite alinear la fase estacionaria lejos de la superficie de la sílice, permitiendo la interacción entre el analito y la fase estacionaria. Cualquier solvente orgánico residual se elimina en esta etapa, asegurando que los componentes de interés sean retenidos en la parte superior de la columna.

Las interacciones entre las moléculas de la muestra y la fase estacionaria controlan la retención en el adsorbente en EFS. Para maximizar las interacciones, la muestra debe cargarse en el adsorbente a una velocidad aproximada de 3 mL/min. Este caudal puede controlarse mediante una válvula en la estación de vacío. Los componentes de interés han de retenerse en el adsorbente de EFS mientras que la matriz y los contaminantes deben eluirse y descartarse. El adsorbente en EFS ha de mantenerse húmedo siempre, puesto que el secado del mismo puede acarrear una pérdida de muestra.

Usando un solvente o una serie de solventes de fuerza eluotrópica los contaminantes pueden eliminarse del adsorbente de EFS hasta que solo los analitos de interés queden atrapados. Con un lavado adecuado las impurezas se eliminan con un adecuado eluyente de lavado. El adsorbente de EFS se deja secar generalmente con nitrógeno. El secado es esencial si el eluyente de lavado no es miscible con el solvente de elución final.

La elución de los analitos se efectúa mediante un eluyente adecuado y a un caudal de aproximadamente 1 mL/min. El adsorbente y las interacciones analito-adsorbentes determinan el eluyente final de elución. Tras la elución los analitos y el eluyente se recuperan en el recipiente colector.

3 JUSTIFICACION

La ingestión de alimentos que contiene micotoxinas pueden causar efectos perjudiciales en la salud humana y animal, ya que estudios en diferentes especies animales han revelado su efecto carcinogénico (IARC, 1993). En el humano se ha observado que causan daños esplénicos, óseos y, en algunos casos cardiacos y aun cerebrales, pero principalmente nefróticos y hepáticos. Cuando las micotoxinas se asocian con el virus de la hepatitis B, son responsables de miles de muertes humanas por año, principalmente en países en vías de desarrollo (Naccha R y cols, 2005).

Se han realizado diversos estudios a nivel mundial sobre el contenido de micotoxinas en diferentes tipos de alimentos para consumo humano y animal. En México los estudios se han enfocado principalmente a identificar y medir la presencia de micotoxinas en maíz, en trigo y cebada, principalmente así como en alimento para animales y se han encontrado niveles significativos de contaminación. Sin embargo, no existen reportes relacionados con otros productos de alto consumo en México como son los cacahuates, los pistaches y la pimienta; por lo que en este trabajo, se desea conocer si existe contaminación por algunas micotoxinas en tales productos y, de ser así, en qué niveles.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la presencia de micotoxinas en pistaches, cacahuates y pimienta recolectados en mercados del Estado de Michoacán.

4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Establecer si existe contaminación por micotoxinas en pistaches, cacahuates y pimienta negra provenientes de establecimientos comerciales de algunos municipios del Estado de Michoacán.
- Establecer los niveles de micotoxinas que pudieran estar presentes en los productos ensayados.

5 PARTE EXPERIMENTAL

5.1 MATERIALES

Los reactivos y solventes fueron marca JT Baker. Las Aflatoxinas B1, B2, G1, G2 y la Ocratoxina A son Sigma; la Zearalenona, Fluka; Benceno (GOLDEN BELL).

5.2 EQUIPOS

- Termo Baño, modelo FE-372 (Felisa)
- Baño Ultrasónico, (Branson 1510)
- Centrifuga (Fisher Scientific)
- Mortero de porcelana
- Cartuchos de Extracción en Fase Sólida (Supelco, Supelclean LC-18 SPE de 3mL)
- Balanza Granataria, (Fisher Scientific)
- Placas para Cromatografía de Capa Fina Silgur-25 UV₂₅₄ 10 x 20 (Macherey-Nagel)
- Lámpara de luz ultravioleta, 6w model UVLMS, 3UV assembly, 115v-60Hz, 0.16 amps(UVP)
- Camara de extraccion fase solida (Preppy, Supelco)

5.3 MUESTREO

La recolección de muestras se realizó en diferentes municipios del estado de Michoacán (Tabla.5) y se recolectaron pistaches, pimienta y cacahuates. Así como en los de mercados de: San Juan, Independencia y de Abastos de la ciudad de Morelia. La recolección se llevo a cabo en los meses de Junio, Julio y Agosto del año 2005; la cantidad recolectada fue de 250g.

5.4 MOLIENDA

50g muestra se procesaron con ayuda de un mortero para homogeneizar el tamaño de partícula.

5.5 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA.

Procedimiento A.

5g de muestra previamente molida, se pesaron en un matraz erlenmeyer de 100 mL y se le adicionaron 3.35g de ácido ascórbico, 30 mL de una mezcla metanol-agua (90:10) y se colocó en un agitador ultrasónico (Branson 1510) por 15 minutos para extraer las micotoxinas. Posteriormente el sobrenadante fue vertido en tubos de ensayo y se llevó a centrifugación por 5 minutos a 3000 rpm. El proceso de extracción fue repetido con otros 20 ml de la mezcla metanol-agua (90: 10) por 15 minutos. Los extractos combinados fueron transferidos a un matraz volumétrico de 50 ml y diluidos al volumen con la mezcla metanol-agua (90:10).

Procedimiento B

Se pesaron y trituraron 10g de muestra, las micotoxinas se extraen con cloroformo tibio, se precipitaron con hexano. El precipitado se removió por filtración; la toxina cruda se vuelve a disolver con cloroformo y se purifica por extracción con bicarbonato de sodio al 0.5M.

5.6 EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA

Se tomo una alícuota de 5ml del extracto y se ajusto a pH de 7 con una solución de NaOH al 30%. El volumen del extracto se concentró a 2 mL en baño de vapor a 60°C. El residuo fue disuelto en 2 mL de ácido acético al 5% y transferido al interior de una columna de Extracción en Fase Sólida, prelavada con 4ml de metanol seguidos de 4ml de ácido acético al 5%. La columna fue primeramente lavada con 200 µL de una mezcla metanol-agua-ácido acético (50:46:4) y las micotoxinas fueron eluidas con 4.8 mL de una mezcla metanol-agua-ácido acético (80:15:5). El extracto final se concentró en un baño de vapor hasta obtener un residuo de aproximadamente 2 mL.

5.7 CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA

Se realizaron en placas de vidrio comerciales. En cada placa se colocaron 20 µL de los extractos de las diferentes muestras y los estándares correspondientes.

Las soluciones estándar de las micotoxinas se prepararon en concentraciones que van de 10 a 60 ppb. La fase móvil para aflatoxinas y zearalenona fue una mezcla de acetato de etilo-metanol (2:1). Para Ocratoxina se usó una mezcla de benceno-ácido acético (9:1)

La determinación de la presencia de micotoxinas fue realizada con ayuda de una lámpara de luz ultravioleta a 365 nm para Aflatoxinas y Ocratoxinas, y 254 nm para el de Zearalenona. Los límites de detección con esta metodología son de aproximadamente 0.5 ppb.

6 RESULTADOS

Se analizaron 30 muestras (Tabla 5): 10 de cacahuates, 10 de pistaches y 10 de pimienta. Todas las muestras fueron procesadas de acuerdo a procedimientos estándar tal y como se describe en el apartado 5.5 para el procedimiento A. La posible presencia de micotoxinas en las muestras se contrastó con el uso de estándares de las micotoxinas. Los estándares utilizados fueron de AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, OTA y ZON. Aún cuando se aplicaron diferentes cantidades de los extractos, no fue posible determinar la presencia de alguna micotoxina en los productos analizados.

En otro trabajo donde se determinó la flora fúngica de los mismos productos aquí analizados se encontró la presencia de *Penicillium verrucosum* en la muestra número 26. Por esta razón se utilizó un segundo proceso de preparación de muestra (apartado 5.5, Procedimiento B) para asegurarse de que efectivamente las muestras se encuentran libres de OTA. Con este procedimiento se puede identificar y cuantificar OTA en el orden de picogramos (Naccha R y cols, 2005). Siguiendo este segundo procedimiento, se analizaron 9 muestras con características coloniales semejantes ala 26 (4, 5, 8, 16, 22, 23, 26, 27, 30).

Aún cuando ninguna de las muestras reveló la presencia de micotoxinas en niveles detectables, debe tenerse cuidado ya que sí están contaminadas con un hongo productor de micotoxinas. La ausencia de las micotoxinas en presencia del hongo productor puede deberse a un correcto almacenaje y manipulación del producto. Cabe señalar que las muestras que presentan este hongo son de pistache y pimienta provienen de la región de Zamora (una muestra de pistache), de San José de Gracia (una muestra de pistache), de Quiroga (una muestra de cacahuate y una de pimienta) y el resto se adquirieron de diversos mercados de la Ciudad de Morelia tales como el Mercado Independencia (una muestra de pimienta), de San Juan (una muestra de pistache), del auditorio (dos muestras de

cacahuate) y del de Abastos (muestra de pistache y de pimienta). En otras palabras, la presencia del hongo micotoxigénico se manifestó en los tres productos y de regiones diversas.

Tabla 5
Tipo de muestra y su procedencia

No.	Tipo de Muestra	Municipio de procedencia
1	Pistache	Patzcuaro
2	Pistache	Jiquilpan
3	Cacahuate	Jiquilpan
4	Pistache	Central de abastos de Morelia
5	Pistache	Mercado de San Juan
6	Cacahuate	Santa Ana Maya
7	Pistache	Central de abastos de Morelia
8	Cacahuate	Quiroga
9	Cacahuate	Mercado Independencia
10	Pistache	Mercado Independencia
11	Pistache	Huiramba
12	Pimienta	Huiramba
13	Pimienta	Mercado independencia
14	Cacahuate	Apatzingan
15	Pimienta	Mercado independencia
16	Pimienta	Apatzingan
17	Cacahuate	Tacambaro
18	Pimienta	Mercado independencia
19	Cacahuate	Apatzingan
20	Pimienta	Azuayo
21	Pistache	Mercado de san Juan
22	Cacahuate	Mercado del auditorio
23	Pimienta	Central de abastos de Morelia
24	Cacahuate	Tianguis plaza

25	Cacahuate	Patzcuaro
26	Pistache	Zamora
27	Pistache	San José de Gracia
28	Pimienta	Venustiano Carranza
29	Pimienta	Uruapan
30	Pimienta	Quiroga

7 DISCUSION

El número de personas que sufren de enfermedades cardiovasculares así como otras relacionadas con el estrés, ha hecho que se busquen mejores dietas, más saludables. Una de las dietas de la que se hace mención es la Mediterránea debido a su alto contenido de fibra. Esta dieta incluye el consumo de diferentes tipos de oleaginosas que cumplen la función de ser nutritivas y útiles en la prevención de enfermedades cardiovasculares (Fidenza, 2002). Sin embargo, se debe estar seguro que los alimentos que se consumen deben ser inocuos sobre todo desde el punto de vista micotoxicológico.

Existen varios artículos relacionados con el contenido de hongos en alimentos. Se han encontrado diversos géneros presentes pero *Aspergillus* y *Penicillium* son los géneros predominantes, especialmente en alimentos que no son cereales (Pacin *et al* 2002; Gatti *et al*, 2003; Mounjouenpou *et al*, 2007). En un trabajo también realizado en el laboratorio, se encontró que algunas muestras estaban contaminadas con *Aspergillus* y *Pencillium*, especialmente *Penicillium verrucosum*, hongo responsable de producir OTA. Abdel-Gawad and Zohri (1993) estudiaron la flora fúngica en almendras, nueces de la India, castañas, avellanas, pistaches y nueces y lograron aislar *Aspergillus* de todas las muestras. Sus resultados concuerdan con los aquí reportados en términos de frecuencia.

Existen una gran variedad de artículos relacionados con la determinación de OTA en diferentes productos alimenticios. La OTA se determina ya sea por HPLC o TLC después de haber aislado la micotoxina con columnas de inmunoafinidad. La TLC es todavía muy usada sobretodo en combinación con detección y cuantificación densitométrica. De esta manera se logra obtener un mayor numero de resultados con un menor margen de error. En este trabajo el análisis se realizó por Extracción en Fase Sólida en Fase Reversa, seguida por TLC (secciones 5.6-5.7). Esta metodología ya había sido establecida y estandarizada en un trabajo previo (López-Ventura, 1997). En términos analíticos, el método por TLC cumple con los parámetros de validación usuales: linealidad, reproducibilidad, precisión. Debe mencionarse que la mayoría de las metodologías utilizadas en la bibliografía

usan extracción por inmunoafinidad, aquí se realizó en fase reversa ya que se sabe que el % de recobro es del 89% y se considera aceptable. Santos y Vargas (2002) reportaron un % de recobro del 98.4% usando columnas de inmunoafinidad.

Pittet y Royer (2002) desarrollaron un método de determinación rápida por TLC para OTA en café sin tostar a un nivel de control de 10 $\mu\text{g}/\text{Kg}$. Sus resultados con TLC mostraron una buena correlación con resultados obtenidos por HPLC/inmunoafinidad. El intervalo analítico que usaron fue de 0.2-136.7 $\mu\text{g}/\text{Kg}$. Por otro lado, Sugita-Konishi *et al* (2006) realizaron un estudio para determinar la presencia de aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 así como OTA y fumonisinas B1, B2 y B3 en diferentes tipos de comida disponibles en el mercado japonés. Determinaron OTA en avena, harina de trigo, salvado, café sin tostar, café tostado, pasas, cerveza y vino pero no la detectaron en arroz ni en maíz. Las concentraciones encontradas de OTA fueron menores a los 0.8 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ usando un método por HPTLC. En este trabajo el límite de detección establecido es de 0.1 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, valor que concuerda con los reportados, por otros autores, en la bibliografía (Santos y Vargas, 2002; Pittet y Royer, 2002; Sugita-Konishi *et al*, 2006; Amezqueta *et al*, 2007).

El haber encontrado *Penicillium verrucosum* en varias muestras que después de haber sido analizadas resultaron tener niveles no detectables de micotoxinas, en especial, la OTA, llevó al uso de un método alternativo de extracción de OTA de las muestras (Sección 5.5 B). Este método se basa en la extracción en tibia de la OTA, tal y como lo describieron Erlich y Lee (1984). De esta manera el total de muestra es el que se trata y de existir contaminación se revelaría fácilmente. Sin embargo, aún con un segundo método de extracción no se encontró OTA en niveles detectables.

La información aquí obtenida es importante ya que este tipo de estudios no se habían realizado en México y menos para el Estado de Michoacán. Por otro lado, se verifica que los alimentos que aquí fueron analizados son inocuos por lo que su consumo es seguro. De cualquier manera, valdría la pena ampliar el número de muestras así como las áreas para obtener mayor información.

8 CONCLUSIONES

- Las muestras de cacahuete, pistaches y pimienta negra recolectadas en diversos comercios de la Cd. de Morelia no contienen niveles detectables de micotoxinas. En el caso de OTA, esta información fue corroborada utilizando una metodología de extracción alternativa.
- La metodología utilizada es simple y ya había sido previamente probada.

9. PERSPECTIVAS

- Ampliar el muestreo, en espacio y tiempo, para obtener mayor información.
- Utilizar columnas de inmunoafinidad para mejorar, aún más, el recobro de micotoxinas de las muestras.
- Ampliar el análisis hacia otros productos de gran consumo como por ejemplo, la cerveza.

9 BIBLIOGRAFIA

Abarca M, Bragulat M, Sastella G, Cabañes F. 1994 Ochratoxin A production by strain of *Aspergillus niger*. *Appl Environ Microbiol*, 60, 2650-2652

Abdel-Gawad, K.M. and A.A. Zohri, 1993. Fungal flora and mycotoxins of six kinds of nut seeds for human consumption in Saudi Arabia. *Mycopathologia* 1993: 55-64.

Amezqueta S., E. Gonzalez-Peñas, T. Lizarraga, M. Murillo and A. Lopez de Cerain, 2007. Development of a chemical method for the complete Ochratoxin A elimination from naturally contaminated cocoa shells. XXII International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins. 21-25 May. Istanbul, Turkey.

Awad A, Chan K, Dowine A, Finkc S, 2000 Peanuts as a source of B-sitos terol, a sterol with anticancer properties, *Nutrition and Cancer*. 36(2), 238-241

Baymen P, James L, Mark A, Themis J, Noreeh E. 2002 Ochratoxin Production by the *Aspergillus alliaceus*, *Plantt Mycotoxins Research*, Ame Soc Mic. Albany, Cal. 68 (5), 2326-2329.

Bennett J y Klich M, 2003 Mycotoxins, *Dep Cell Biol*, Tulare University, New Orleans Lousiana, *Clinical Microbiology Review*, 3, 497-516

Bintvihok A y Kositcharoenkul S, 2005 effect of dietary calcium propionate on performance, hepatic enzyme activities and aflatoxin residues in broilers fed a diet containing low levels of aflatoxin B1. *department of pharmacology, faculty of veterinary science ,chulalongkorn university, Thailand* v. 47 p.41-46.

Bhatnagar D y Ehrlich KC. 2002 Toxins of filamentous fungi. *US Departamento of Agriculture, Agricultural Research Service Research Center; New Orleans*, 538, pp 293-301

Boorman G, McDonald M, Imoto S, and Persing R. 1993 Renal Lesions Induced by ochratoxin A exposure in the F344 rat. *Toxicol, Pathol*, 20, 236-245

Carrillo, L. 2003. Capítulo 6: Micotoxinas pp 2-4. En Carrillo, L. *Microbiología Agrícola*. Primera Edición. Universidad Nacional de Salta. Argentina. 300p.

Chiavaro E, Cacchioli C. Berni E. Spotti E. 2005 inmunoaffinity clean-up and direct fluorescence measurement of aflatoxins B1 and M1 in pig liver: Comparison whit high-performance liquid chromatography determination. *Taylor y Francis Group, Universita degli studi di Parma, Parma, Italy. ISSN 0265-203X* 22 (11): 1154-1161

Concon J y Thomas W, 1979 Evidence of carcinogenicity Nutr Cancer Philadelphia Frank Lin Institute Press, 23, pp. 724-726

Donald J y Pietrzyk. 1983 Química Analítica, Ed, Interamericana, México, DF. Cap. 4 Cromatografía pp. 65-90

Duke J A, 1989 CRC Handbook of Nuts. CRC Press. pp. 240-243

Erlich, K.C. y L.S. Lee, 1984. Mycotoxins in grain dust: method for analysis of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone, Vomitoxin, and secalonic acid D. Journal of the Association of Official Analytical Chemists 67:963-967.

FAO alimentación nutrición, 2003 Centro de capacitación y referencia FAO/OIEA para el control de los alimentos y los plaguicidas, Roma, 2003, ISBN 92-304611-2.

Fidanza, F., 2002. Tree nuts in the Mediterranean Diet Context. II Conferencia Salud y Frutos Secos. Fundacion NUCIS. 28, February, Barcelona, Spain.

Freire F y Paterson R, 2000 mycoflora and mycotoxins in Brazilian black pepper, white pepper and Brazil nuts. Mycopatologia centro nacional de agroindustria tropical Ceara Brazil. ISSN 0301-486x v. 149(1) p. 13-9

Garcia L, 2005 Niveles de micotoxinas en maiz disponible en el estado de Michoacan, Tesis de Licenciatura en QFB, UMSNH.

Gatti M, Nascimento R y Lemos T, 2004 Mycological survey for potential aflatoxin and ochratoxin producer and their toxicological properties in harvested Brazilian black pepper, Dep Biol. Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil. 67 (1), 96-102

Gatti M.J., M.E. Fraga, C. Magnoli, A.M. Dalcero and C.A. da Rocha Rosa, 2003. Mycological survey for potential aflatoxin and ochratoxin producers and their toxicological properties in harvested Brazilian black pepper. Food Additives and Contaminants, 20:1120-1126.

Geiser D, Pitt J, Taylor J, 1997 Cryptic speciation and recombination in the Aflatoxin producing fungus *Aspergillus flavus*, Division of food science and technology north Ryde Australia, Natl Acad Sci 95, 388-393

Hadavi E, 2005 Several physical properties of aflatoxin-contaminated pistachio nuts: Application of BGY fluorescence for separation of aflatoxin-contaminated nuts. Science and Research Campus of Islamic Azad University, Theran, Iran. ISSN 0265-203x v. 22(11) p. 1144-1153

Hana V. Imkekuhn and Rohr K. 1992 Determination of Ochratoxin A in urine and faeces of swine by high-performance liquid Chromatography, Institute für Landwirtschaft, Burdesalle, Braunschweig Germany, 613, pp 295-302

Harris D, 2001 Análisis Químico Cuantitativo, preparación de muestra, impreso en España, Ed, reverté pp. 789-803.

IARC. International Agency for Research on Cancer 1993. IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals in man. Some naturally occurring substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins. Lyon, France. Vol.56, p 571.

Jacobsen B, 1993 Mycotoxins and Micotoxicosis, Alabama cooperative extension system, Auburn University, Alabama Dep Pla Pat. 767, 1-4

Jawetz . 1995 microbiología medica, Ed el manual moderno, México DF. Cáp. 45, pag 690

JECFA 1996. Ochratoxin A. A safety evaluation of certain food additives and contaminants. Serie sobre aditivos alimentarios de la OMS, 35, 363-376

Joanna D y Bastos R. 2004 Effect of citrina and in Association with aflatoxins B1 on the infectivity and proliferation of toxoplasma gondii in vitro, parasitology and public, Health Federal University of Goias, Goias, GO, Brazil. 654, pp. 247-254.

Jonathan H, 2004 human aflatoxicosis in developing countries; a review of toxicology, exposure, potencial health consequences, an interventions. American Society for Clinical Nutrition. 80, 1106-22

Rubinson KA y Rubinson JF, 2000. Contemporary Instrumental Analysis, Prentice Hall, New Jersey pp 576

Lara J, 2002 Métodos de determinación, identificación y control de micotoxinas en ingredientes para la nutrición animal. Investigación Aplicada, Tehuacan, Puebla.

Ledezma B, oct 2004 Aflatoxinas. Acta méd. Costarrica, 46(4), 174-178. ISSN 0001-6002.

López Ventura MA, 1997 Determinación de la presencia de micotoxinas muestreadas en los cereales adquiridos en mercados de Puebla y Tlaxcala. Tesis de Licenciatura en QFB, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

López L, 1985 Micotoxinas y micotoxicosis, Aflatoxinas. Revista Alimentos, 10 (3). 32 - 38.

Lovell RT, 1992. Mycotoxins Hazardous to farmed fish. Feed International, March 24-28

Martins A, Salgueiro L, Vila R, Tomi F, Canigüeral S, Casanova J, Proença da Cunha A. 1998

from four Piper species. Phytochemistry Oxford. Oxford Elsevier Science Ltd. 49(7) 2019-2023.

Mphande F, Siame B, Taylor J, 2003 fungi aflatoxins, and cyclopiazonic acid associated with peanut retailing in Botswana. Dep Biol Scie, University of Botswana 47(4), 1368-75

Mazzani C. Layrisse A, 1994. Resistencia de campo de genotipos de maní (*Arachis hypogaea* L.) a la infección de sus semillas por *Aspergillus* spp. Phytopathologia Mediterránea, Universidad central de Venezuela, Apdo 4579, macaray 2101.

Medina J. y Gilbert J, 1991. Métodos rápidos de Análisis de Aflatoxinas y Zearalenona en Insumos y Alimentos Avícolas por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución. pp 5 - 7.

Meyer H, Vanstaden J, 1992 The use of Antibiotics to Control Systemic Bacteria in invitro cultures of piper nigrum cv Kuching. South African Journal of Botany Suid- Africaanse Tydskrifvir. 62,1070-1075

Mirocha J, 1999 Micotoxinas de interés creciente Zearalenona Tercera Conferencia Internacional Mixta. FAO/PNUMA Sobre Micotoxinas, Túnez, Túnez, 3-6 de marzo de 1999 pp. 2-5

Mounjouenpou, P., D. Gueule, B. Guyot, P.R. Tondje, A. Fontana-Tachon and J.P. Guiraud, 2007. Incidence of pod integrity on the fungal microflora and Ochratoxin A production in cocoa. XXII International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins. 21-25 May. Istanbul, Turkey.

Murray 1999 Microbiología, Micotoxicosis, mecanismos patogénicos, Ed Elsevier, Madrid España, pp. 619-623

Naccha R. Lidia, Cavazos Norma, Torres Anabel, Castillo Martha, Robledo Alfonso, 2005 ocratoxinas y su impacto en la salud, ciencia UANL, 8, 373-378

Nakatani 1992 Natural antioxidants from spices, ACS symp ser Washinton, DC.America Chemical Society.58,114-116

Olsen M, 1999 Prevención y determinación de Micotoxinas, Tercera Conferencia Internacional Mixta, FAO/OMS/PNUMA. Sobre Micotoxinas.Tunez, Túnez, 3-6 de marzo de 1999 pp. 2-3

Pacin A.M., H.H.L. Gonzalez, M. Etcheverry, S.L. Resnik, L. Vivas and S. Espin, 2002. Fungi associated with food and feed commodities from Ecuador. Mycopathologia 156:87-92.

Park D, 1999 Reducción al mínimo de los riesgos que plantan las micotoxinas mediante la utilización del concepto de HACCP. Tercera conferencia internacional. FAO/OMS/PMA Sobre Micotoxinas. Túnez, Túnez, 3-6 de marzo de 1999 pp. 2-6

Pietri A, Bertuzzi T, Moretti G, Stefanelle C, Piva G, 2004 A study of the contamination of maize destined for Lodi. Rivista Italiana di Suinicultura 45:95-101

Pitt, J y Miscamble, 2000 water relations of *aswpergillus flavus* and closely related species. Journal of food protection 58,86-90.

Pittet, A. and D. Royer, 2002. Rapid, low cost thin-layer chromatographic screening method for the detection of ochratoxin A in green coffee at a control level of 10 microg/kg. Journal of Agriculture and Food Chemistry 50:243-247.

Richard J, Bennett G, Ross P, 1993 Analisis of Naturally occurring Mycotoxins in food, J anim Sci. 71, 2563-2574

Robledo L, Marín S y Ramos A. 2001, Contaminación con micotoxinas en maíz forrajero y granos de café verde en el estado de Nayarit, Méx. Dirección de investigación Científica, Universidad Autónoma de Nayarit, Revl beroam Micol, 18, 141-144.

Sabed A. Soher E. Sahato A. 2003 occurrence of certain mycotoxins in peanuts products and thermostability of fumonisin B1 during processing. Dep Food Tox and Cont, Cairo, Egypto. 51(20), 6068-72

Sánchez Domínguez S, Muñoz Orozco A, Gonzalez Hernandez V, Martinez Garza A, 2004 characterization and classification of mexican peanut (*arachis hypogaea* L).departamento de fitotecnia, Universidad Autónoma de Chapingo. Edo de México. 40, 171-182.

Santos, E.A. and E.A. Vargas, 2002. Immunoaffinity column clean-up and thin layer chromatography for determination of ochratoxin A in green coffee. Food Additives and Contaminants 19:447-458.

Scibelli A. Tafuri S. Ferrante M. Almenti E. Naso B. Lucisano A. Staiano N, 2003 Ochratoxin A affects cos cell adhesion and signaling. diparttimento di patologia e sanita animale, Universita di Napoli Federico II, Napoli, Italy. 64(5), 1018-28.

Scott P, 2002 methods of analysis of ochretoxin A. Health Canada Ottawa, Ontario, Ave Exp Biol. (ISSN:0065-2598) 504, 117-34

Smith E, 2004 Aflatoxins, micotoxins in agriculture and food safety New York, Marcel Dekker, 269-285.

Sommer N, Buchanan J, Fortlage R, 1986 relation to early splitting and lattering of pistachio nuts to aflatoxin in the archard. Phytopathology 76,692-694

Sugita-Konishi, Y., M. Nakajima, S. Tabata, E. Ishikuro, T. Tanaka, H. Norizuki, Y. Itoh, K. Aoyama, K. Fujita, S. Kai and S. Kumagai, 2006. Occurrence of aflatoxins, ochratoxin A, and fumonisins in retail foods in Japan. *Journal of Food Protection* 69:1365-1370.

Steuder R, Dietrich I, Schartter J, 1994 ochratoxin A and coffee, *Mith gibiete lebensm hyg.* 85, 719-727

Torres S y Díaz L, 2002 Micotoxinas en la alimentación animal. Universidad Autónoma de Chihuahua, Facultad de zootecnia división de posgrado e investigaciones.

Udagawa S, 1988. Mycotoxicoses - the present problems and prevention of mycotoxins. *Asian Medical Journal* 31, 599 - 604.

Ueno Y, 1987 *Mycotoxins, Toxicological Aspects of Food*, Ed. Elsevier Applied Science London Y New York, Londres pp. 139-204

Underwood A, 1989 *Química analítica cuantitativa, cromatografía* 5ta edición Pearson Educación, impreso en México pag.662-665.

Vázquez M, 2001 el ecosistema de granos almacenados, Departamento de Biología de Plantas, CINVESTAV Irapuato. *Avance y perspectiva*, 20, 407-413

Van Egmond H, 2002 worldwide regulations for mycotoxins, *Adv Exp Med Biol.* (ISSN:0065-2598) 504, 257-69

Walker R, 1999 Micotoxinas de creciente interés, Ochratoxinas Tercera Conferencia Internacional Mixta. FAO/OMS/PNUMA. *SOBRE MICOTOXINAS*. Túnez, Túnez, 3-6 de marzo de 1999 pp. 2-5

West S y Holler C, 2001 *Introducción a los métodos de separación analíticos*, Mc Graw Hill 7ª edición impreso en México, pp 666-667.

Xiao H, Ronald R, Matquardt H, Abramson D y Andrew A, 1996, Metabolites of Ochratoxins in Rat urine and in a cultures *Aspergillus ochraceus*, *Dep Anim Sci University of Manitoba Winnipeg, Canada, Applied and environmental Microbiology*, 62 ,(2)648-655

Zepnik H, Pahler A, Schaver V, Dekant W, 2001 Ochratoxin A-Induced tumour formation: Is there a role of reactive Ochratoxin A metabolites? *Wurzburg, Germany. Toxicological sciences* 59, 59-67