



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
MAESTRÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

Determinación de aflatoxinas en especias, mezclas de especias e
ingredientes usados en la formulación de productos cárnicos
comercializados en la Ciudad de México por dos métodos analíticos

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS**

PRESENTA

M. V. Z. MONTSERRAT LIZETH RÍOS BARRAGÁN

Director: Dr. José Fernando González Sánchez

Co-director: Dr. Rey Gutiérrez Tolentino

Asesores: Dr. Salvador Vega y León
Dr. José Jesús Pérez González

Ciudad de México, octubre del 2019

COMITÉ TUTORAL

Dr. José Fernando González Sánchez
Director

Dr. Rey Gutiérrez Tolentino
Codirector

Dr. Salvador Vega y León
Asesor

Dr. José Jesús Pérez González
Asesor

COMITÉ EVALUADOR

Dr. Arturo Camilo Escobar Medina

Dra. Beatriz Sofía Schettino Bermúdez

Dr. Salvador Vega y León

*“La ciencia será siempre una búsqueda,
jamás un descubrimiento real.
Es un viaje, nunca una llegada.”*

- Karl Raiumnd Pepper.

Agradecimientos

A la Universidad Autónoma Metropolitana por darme la oportunidad de formarme como M. V. Z. y ahora realizar mis estudios en la Maestría en Ciencias Agropecuarias; así como al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada durante los estudios de posgrado.

Me gustaría agradecer de forma muy particular a mi comité tutorial: al Doctor José Fernando, por haber creído en mí y por su apoyo incondicional durante este largo camino; al Doctor Rey, por sus valiosas enseñanzas, por abrirme las puertas del laboratorio y hacerme sentir parte del mismo; al Doctor Jesús, por su paciencia, dedicación y supervisión durante los análisis; al Doctor Salvador, cuando parecía que esa tesis no tendría fin, su invaluable sabiduría y experiencia hizo esto posible.

A los profesores que siempre estuvieron dispuestos a compartirme sus conocimientos, brindarme un consejo o una palabra de apoyo: Dr. Chamorro, Dra. Betty, Dr. Rutilio. A la Dra. Cindy por concederme una sólida base para el manejo del HPLC. Al Dr. Daniel Martínez, Dra. Estelita, Dra. Marcela, Q.F.B. Rosita, por permitirme siempre el uso de sus equipos de laboratorio sin impedimentos. A mis compañeros del LAI y del LVCCySP, que se volvieron buenos amigos.

Y de manera personal, quiero agradecer al Dr. Arturo Escobar. Estoy en deuda, sin duda, con él; quiero agradecerle por su incansable colaboración en esta investigación, por sus comentarios, su exigencia, su asistencia, su crítica, su guía.... Doctor, sí sea eterno.

Dedicatoria

A mi mamá, por su amor, trabajo, sacrificios, por el gran ejemplo que me ha dado siempre, por su apoyo incondicional, por confiar en mí y en mis sueños, estoy orgullosa de tener a la mejor mamá del mundo.

A mi mamá July, por estar siempre pendiente de mí, cuidarme, consentirme, por ser un pilar en mi vida, por seguir dándome cariño a manos llenas, por no ser sólo mi abuelita sino mi otra mamá.

A mis hermanas: Magui, Mit, por ser siempre un valioso apoyo para lograr mis metas, por siempre tener fe en mí y por quererme mucho cuando lloro ridículamente por cansancio. A mis sobrinos: Leo, Julián, por brindarme dos motivos más para sonreír y seguir adelante.

A mis tíos, primos, sobrinos, por ser parte fundamental en mi vida y por estar siempre dispuestos con palabras bonitas, de aliento, de apoyo, con muestras de cariño, abrazos, qué fortuna tenerlos.

A la familia que tuve el privilegio de elegir: Daniel, Diego, Fercho, July, Liz, Toño, gracias por formar parte de mi familia.

Índice

Índice de cuadros	i
Índice de figuras	ii
Abreviaturas y acrónimos	iii
Resumen	v
Abstract	vi
1. Introducción	1
2.1 Objetivo general:.....	4
2.2 Objetivos específicos	4
3. Revisión bibliográfica.....	5
3.1 Hongos toxigénicos.....	5
3.2 Metabolitos secundarios	7
3.3 Micotoxinas	9
3.3.1 Repercusiones económicas por la presencia de micotoxinas en alimentos	12
3.4 Aflatoxinas	14
3.4.1 Aflatoxina B ₁	15
3.4.1.1 Biosíntesis de aflatoxina B ₁	16
3.4.1.2 Efectos en la salud humana.....	19
3.4.1.3 Regulación	22

3.4.1.4	Presencia de aflatoxina B ₁ en productos cárnicos	23
3.4.1.5	Presencia de aflatoxina B ₁ en especias	26
3.4.1.6	Métodos de análisis para la determinación de aflatoxinas en especias.....	29
4.	Materiales y métodos.....	31
4.1	Toma de muestras	31
4.2	Preparación de las muestras	33
4.3	Determinación de aflatoxinas por el método de ELISA	33
4.3.1	Reactivos.....	33
4.3.2	Cristalería y materiales	33
4.3.3	Equipos	34
4.3.4	Materiales del juego de reactivos	34
4.3.5	Metodología.....	34
4.4	Determinación de aflatoxina B ₁ por el método de HPLC.....	35
4.4.1	Reactivos y estándar	35
4.4.2	Cristalería y materiales.....	35
4.4.3	Preparación de cristalería.....	36
4.4.4	Equipos	36
4.4.5	Metodología.....	37

4.4.5.1 Extracción	37
4.4.5.2 Preparación de la muestra previa a la purificación	37
4.4.5.3 Preparación de la columna de sílica gel	38
4.4.5.4 Purificación del filtrado	38
4.4.5.5 Análisis de AFB ₁ por HPLC	39
4.4.5.5.1 Preparación de fase móvil	39
4.4.5.5.2 Derivatización	40
4.4.5.5.3 Condiciones del equipo HPLC.....	40
4.4.5.5.4 Cálculo e interpretación de los resultados.....	41
4.4.5.5.5 Establecimiento de los parámetros de desempeño para el análisis de aflatoxina B ₁ en mezclas de especias mediante HPLC	41
5. Resultados y discusión	44
5.1. Determinación de aflatoxinas totales por el método de ELISA	44
5.2 Determinación de aflatoxina B ₁ por el método de HPLC.....	56
5.2.1 Establecimiento de los parámetros de desempeño para la determinación de aflatoxina B ₁ en mezclas de especias por HPLC.....	56
5.2.2 Determinación de aflatoxinas totales por HPLC	59
5.3 Valoración integral y aportes de los resultados.....	65

6. Conclusiones	68
7. Recomendaciones	69
8. Referencias	70

Índice de cuadros

	pág.
Cuadro 1. Porcentaje de muestras positivas y concentraciones de aflatoxina B ₁ en productos de origen animal de Jordania	24
Cuadro 2. Incidencia de aflatoxinas en productos cárnicos	25
Cuadro 3. Presencia de aflatoxina B ₁ en especias	26
Cuadro 4. Concentración de aflatoxinas totales (AT) en especias e ingredientes comúnmente utilizados en la formulación de productos cárnicos	46
Cuadro 5. Concentración de aflatoxinas totales (AT) en productos cárnicos	52
Cuadro 6. Porcentajes de recuperación de aflatoxina B ₁ en diferentes mezclas de especias para productos cárnicos	58
Cuadro 7. Contaminación por aflatoxina B ₁ en mezclas de especias usadas en diferentes productos cárnicos por el método de HPLC	59

Índice de figuras

	pág.
Figura 1. Concentración media de aflatoxinas totales en los grupos de muestras analizadas	45
Figura 2. Aflatoxinas totales en mezclas de especias para elaboración de productos cárnicos	54
Figura 3. Resultado de la especificidad del método para la determinación de aflatoxina B ₁ en muestras de mezclas de especias	56
Figura 4. Resultados de la linealidad de aflatoxina B ₁ por HPLC empleando detector de fluorescencia (365 nm de excitación y 420 nm de emisión)	57
Figura 5. Concentraciones de aflatoxina B ₁ en mezclas de especias para la formulación de productos cárnicos	60

Abreviaturas y acrónimos

°C – Grados Celsius

µg/kg – Microgramo sobre kilogramo

µg/kg p.c./día – Microgramo sobre kilogramo de peso corporal al día

µL – Microlitro

µm – Micrómetro

ADN – Ácido desoxirribonucleico

AFB1 – Aflatoxina B₁

ARN – Ácido ribonucleico

AT – Aflatoxinas totales

cm – Centímetro

ELISA – Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

FAO – Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura

FD – Detector de fluorescencia

FDA – Administración de Alimentos y Medicamentos

g – gramo

HPLC – Cromatografía líquida de alta resolución

IARC – Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer

INTA – Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria

kg – Kilogramo

LOD – Límite de detección

LOQ – Límite de cuantificación

mL – Mililitro

mL/min – Mililitro sobre minuto

mm – Milímetro

Nd – No determinado

No. – Número

OMS – Organización Mundial de la Salud

RP – Fase reversa

TLC – Cromatografía en capa fina

UV – Ultravioleta

Resumen

Las aflatoxinas son sustancias tóxicas producidas por algunas especies de hongos que representan un grave peligro para la salud humana, en especial la aflatoxina B₁ que es uno de los principales analitos encontrados en alimentos y está catalogado como cancerígeno. El objetivo del presente estudio fue evaluar la presencia de aflatoxinas en especias, mezclas de especias e ingredientes y productos cárnicos comercializados en la Ciudad de México empleando dos métodos analíticos: ELISA y HPLC. Un total de noventa muestras de especias e ingredientes, mezclas de especias para la formulación de productos cárnicos y productos cárnicos provenientes de tiendas y supermercados de la Ciudad de México en el periodo de diciembre de 2015 a enero de 2017 fueron analizadas. Cincuenta muestras fueron analizadas por ELISA para la determinación de aflatoxinas totales, de las muestras de especias e ingredientes, el 61 % de muestras fueron positivas en un intervalo de contaminación de 0.07 a 4.24 µg/kg; de las mezclas de especias el 75 % fueron positivas en un rango de 0.6 a 1.9 µg/kg y de productos cárnicos sólo el 3.5 % de muestras resultaron positivas. Las muestras con mayor prevalencia de aflatoxinas fueron chile y pimentón. Por HPLC resultaron positivas a aflatoxina B₁, el 62.5 % de las cuarenta muestras analizadas, en concentraciones de 0.44 a 1.65 µg/kg. Todos los resultados presentaron concentraciones inferiores al límite máximo establecido por la Unión Europea, de 5 µg/kg para aflatoxina B₁ y 10 µg/kg para aflatoxinas totales; lo que no constituye un problema de salud pública actual en las condiciones analizadas. Sin embargo, alerta la necesidad de poder contar con un programa de monitoreo para evaluar la presencia de estas y otras micotoxinas, así como la necesidad de que exista una regulación oficial mexicana para micotoxinas en especias considerando el alto consumo de chile en la población mexicana.

Abstract

Aflatoxins are toxic substances produced by some species of fungi that pose a serious danger to human health, especially aflatoxin B1 which is one of the main analytes found in food and is listed as a carcinogen. The objective of this study was to evaluate the presence of aflatoxins in spices, mixtures of spices and ingredients and meat products marketed in Mexico City using two analytical methods: ELISA and HPLC. A total of ninety samples of spices and ingredients, spices mixtures for the formulation of meat products and meat products from stores and supermarkets in Mexico City in the period from December 2015 to January 2017 were analyzed. Fifty samples were analyzed by ELISA for the determination of total aflatoxins, of the samples of spices and ingredients, 61% of samples were positive in a contamination range of 0.07 to 4.24 $\mu\text{g} / \text{kg}$; 75% of the mixtures of spices were positive in a range of 0.6 to 1.9 $\mu\text{g} / \text{kg}$ and of meat products only 3.5% of samples were positive. The samples with the highest prevalence of aflatoxins were chili and paprika. HPLC tested positive for aflatoxin B1, 62.5% of the forty samples analyzed, at concentrations of 0.44 to 1.65 $\mu\text{g} / \text{kg}$. All results showed concentrations below the maximum limit established by the European Union, of 5 $\mu\text{g} / \text{kg}$ for aflatoxin B1 and 10 $\mu\text{g} / \text{kg}$ for total aflatoxins; which does not constitute a current public health problem under the conditions analyzed. However, it warns of the need to have a monitoring program to evaluate the presence of these and other mycotoxins, as well as the need for an official Mexican regulation for mycotoxins in spices considering the high consumption of chili in the Mexican population.

1. Introducción

A nivel mundial, México ocupa el séptimo lugar en la producción de carne de res, cerdo y pollo, con más de 6.9 millones de toneladas, lo que representa el 2.5 % del consumo mundial, por otra parte, la producción de carnes frías en el 2018 llegó a 965 mil toneladas y un consumo de 974 mil toneladas (CMC, 2018). El consumo de productos cárnicos aporta diferentes nutrientes (proteínas, vitaminas y minerales) en función del tratamiento tecnológico al que han sido sometidos, lo que contribuye a garantizar la seguridad alimentaria (Infoalimenta, 2019). Además, el consumo de productos cárnicos se incrementa y los consumidores exigen cada vez más una mejor calidad y seguridad de estos.

En la formulación de productos cárnicos se utiliza una gran variedad de productos no cárnicos, como las especias, que son sustancias vegetales (semillas secas, frutas, raíces, cortezas de árbol) usadas para la preparación de alimentos debido a sus propiedades gastronómicas como sabor, color o aroma e incluso por sus propiedades medicinales y algunas con propiedades antimicrobianas (Ozbey y Kabak, 2012; Asghar *et al.*, 2016; Zahra *et al.*, 2018).

Las especias son susceptibles de contaminación por micotoxinas durante las etapas de precosecha, cosecha, procesamiento, almacenamiento, secado o transporte debido a malas prácticas de manejo (Ardic *et al.*, 2008; Khayoon *et al.*, 2012; Ozbey y Kabak,

2012; Tosun y Arslan, 2013) y cuando las condiciones ambientales como temperatura y humedad son favorables (Ardic *et al.*, 2008; Hammami *et al.*, 2014).

La FAO ha mencionado que el 25 % de las cosechas está contaminado al menos con alguna micotoxina, lo que conlleva a pérdidas económicas, así como al detrimento de la salud humana (Zahra *et al.*, 2018). Las micotoxinas son metabolitos secundarios tóxicos de ciertos géneros de hongos, como *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*. Se conocen más de 400 micotoxinas, las aflatoxinas son las más comúnmente encontradas en especias y las más peligrosas debido a su alta toxicidad, además de ser carcinogénicas, teratogénicas, inmunosupresoras, hepatogénicas y mutagénicas (Ardic *et al.*, 2008; O'Riordan y Wilkinson, 2008; Tosun y Arslan, 2013; Akpo-Djèntonin *et al.*, 2018). La aflatoxina B₁ es considerada como carcinógeno en humanos por el Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés) (Ozbey y Kabak, 2012).

El Codex Alimentarius es el organismo rector que regula la inocuidad de los alimentos, para el caso de las especias se han establecido niveles máximos (NM) para micotoxinas en algunos países con énfasis en la aflatoxina B₁, aflatoxinas totales y ocratoxina A. Los NM para aflatoxina B₁ más utilizados son 5 y 10 µg/kg; para el total de aflatoxinas de 10 y 20 µg/kg y para ocratoxina A de 15 y 20 µg/kg. El

NM establecido por la Unión Europea (UE) para aflatoxina B₁ en especias es de 5 µg/kg (Ardic *et al.*, 2008; O’Riordan y Wilkinson, 2008; Ali *et al.*, 2015; Asghar *et al.*, 2016). México no ha fijado NM para especias, pero sí los ha establecido para cereales.

Diversos estudios a nivel global han reportado la presencia de aflatoxina B₁ en especias, sus valores oscilan entre 0.01 y 84.84 µg/kg. Entre las técnicas empleadas para el análisis de aflatoxinas, se encuentran los inmunoensayos (Ardic *et al.*, 2008; Reddy *et al.*, 2001; Tosun y Arslan, 2013; Gojković *et al.*, 2017), cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés) con detectores ultravioleta y de fluorescencia (Cho *et al.*, 2008; O’Riordan y Wilkinson, 2008; Ozbey y Kabak, 2012; Khayoon *et al.*, 2012; Hammami *et al.*, 2014; Ali *et al.*, 2015; Asghar *et al.*, 2016; Akpo-Djèrontin *et al.*, 2018) y cromatografía de capa fina (TLC, por sus siglas en inglés) (Sahar *et al.*, 2009; Zahra *et al.*, 2018). Sin embargo, en México no se han realizado estudios al respecto.

El uso de mezclas de especias y otros condimentos en derivados cárnicos ha ido en aumento y corren el riesgo de estar contaminados, lo que representa un riesgo potencial para la salud pública (O’Riordan y Wilkinson, 2008).

2. Objetivos

2.1 Objetivo general:

- Evaluar la presencia de aflatoxinas en especias, mezclas de especias e ingredientes y productos cárnicos comercializados en la Ciudad de México por dos métodos analíticos.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar la presencia de aflatoxinas totales en especias, mezclas de especias e ingredientes y productos cárnicos empleando un método inmunoenzimático (ELISA).
- Determinar la presencia de aflatoxina B₁ en mezclas de especias por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

3. Revisión bibliográfica

3.1 Hongos toxigénicos

Los principales hongos toxigénicos, capaces de producir micotoxinas contaminantes de alimentos son *Aspergillus spp.*, *Fusarium spp.* y *Penicillium spp* (Abarca *et al.*, 2000). Los hongos contaminantes de alimentos se dividen en hongos de campo y de almacenamiento, los primeros tienen la capacidad de crecer con una humedad relativa de 70 a 90 % y de 20 a 25 °C, un ejemplo de éstos es el género *Fusarium*. Los segundos se adaptan a niveles de humedad más bajos y temperaturas más altas, ejemplo de éstos son *Aspergillus* y *Penicillium*. Las especies de *Aspergillus* por lo general están mejor adaptadas a temperaturas altas (30-40 °C), mientras que *Penicillium spp.* crece óptimamente entre 25 y 30 °C. *Aspergillus* y *Penicillium* pueden infectar las semillas tempranamente en el campo. *A. flavus* es una especie capaz de infectar semillas tanto en el campo como en el almacenamiento; en climas templados es predominantemente un hongo de almacenamiento, sin embargo, en algunas regiones del mundo, los granos y las nueces son más propensos a ser colonizados durante la precosecha que en el almacenamiento. Especies de *Fusarium* y de *Penicillium*, también tienen la capacidad de infectar el grano en el campo y en el almacenamiento (Rodrigues *et al.*, 2012).

El papel de las altas temperaturas y la sequía en la contaminación de las plantas afecta directamente su fisiología y sus mecanismos de resistencia, dejándolos particularmente susceptibles a la infección por hongos y la producción de aflatoxinas. Por ejemplo, el estrés por sequía induce un gran aumento de la producción de aminoácidos en las plantas, principalmente prolina, y se ha informado que ésta estimula la producción de aflatoxinas. Además, la producción de fitoalexinas (compuestos antimicrobianos producidos por las plantas en respuesta al ataque de hongos), que se ha demostrado que inhiben la germinación de las esporas y la extensión de las hifas de *A. flavus* en los cacahuates inmaduros, es inhibido por el estrés por sequía (Rodrigues *et al.*, 2012).

Un reservorio importante de esporas aflatoxigénicas se encuentra en la hojarasca del suelo de los cultivos, lo que aumenta la probabilidad de que los cultivos sean contaminados con las esporas, lo que puede provocar la infección posterior con aflatoxinas si no se garantizan las condiciones adecuadas de manejo y durante el almacenamiento, por ejemplo, las heridas en las capas protectoras de las nueces ya sea por abrasión o por efecto de los insectos, proporcionan vías de infección por esporas de hongos aflatoxigénicos transportadas por el viento (Rodrigues *et al.*, 2012).

Las especies del género *Penicillium* por lo general crecen y producen micotoxinas en un rango mayor de temperatura que las del género

Aspergillus spp., pero generalmente no se adaptan a las condiciones cálidas y secas, por lo que son más abundantes en climas templados y producen principalmente sustancias tóxicas como: ocratoxinas, citrinina y patulina. *Fusarium*, en cambio, es un género adaptado a un mayor rango de hábitats, su distribución es mundial y sus especies son importantes patógenos de plantas; producen principalmente las toxinas tricotecenos, zearalenona y fumonisinas (Rodrigues *et al.*, 2012).

Respecto al género *Aspergillus*, está distribuido alrededor del mundo, tiene capacidad para prosperar en temperaturas altas y con relativamente baja disponibilidad de agua. Entre los metabolitos secundarios que produce, se encuentran las aflatoxinas, ocratoxinas, citrinina y patulina; aparecen con mayor abundancia entre latitudes de 26° a 35° al norte o sur del ecuador (Rodrigues *et al.*, 2012); México se encuentra entre 14° y 32° al norte del ecuador.

3.2 Metabolitos secundarios

Hay diversas teorías sobre por qué se sintetizan los metabolitos secundarios, la primera considera que los metabolitos secundarios son un medio para almacenar o eliminar metabolitos de desecho resultantes del metabolismo primario (Roze *et al.*, 2011). A diferencia de los metabolitos primarios que se sintetizan durante la fase de

crecimiento del hongo, los metabolitos secundarios se sintetizan cuando el crecimiento ha terminado o cuando hay deficiencia de nutrientes indispensables; en estas condiciones, la síntesis va dirigida hacia la producción de pigmentos, antibióticos y micotoxinas, excretados abundantemente durante la fase estacionaria del crecimiento del hongo (Murcia, 2010).

Frecuentemente se producen durante la transición del crecimiento activo a la fase estacionaria, el organismo productor puede crecer en ausencia de su síntesis, por lo que no es indispensable para la supervivencia, por lo menos a corto plazo. Otra teoría menciona que los genes implicados en el metabolismo secundario permiten a la mutación y la selección natural fijar nuevos rasgos beneficiosos a través de la evolución. Por otro lado, se ve al metabolismo secundario como parte integral del metabolismo celular, basado en el metabolismo primario para suministrar las enzimas requeridas, energía, sustratos y contribuye a la supervivencia a largo plazo del organismo productor (Roze *et al.*, 2011).

En los hongos, el metabolismo secundario elimina los productos de las vías metabólicas intermedias cuando el crecimiento se restringe temporalmente y se dirigen a vías biosintéticas altamente específicas, uno de los grupos más importantes de estos metabolitos son las micotoxinas (Rodrigues *et al.*, 2012).

3.3 Micotoxinas

Las micotoxinas son metabolitos secundarios del crecimiento de hongos, los principales son *Aspergillus spp.*, *Fusarium spp.* y *Penicillium spp.*, estos hongos son capaces de colonizar y contaminar sustratos utilizados para la alimentación humana y animal (Duarte-Vogel y Villamil-Jiménez, 2006).

La presencia de micotoxinas en alimentos depende de diversos factores como la región de origen, la temporada, la humedad, la temperatura y las condiciones bajo las que los cultivos son cosechados, almacenados y procesados (Dhanasekaran *et al.*, 2011; Markov *et al.*, 2013). Por ejemplo, respecto a la síntesis de aflatoxinas, ésta se incrementa a temperaturas superiores a 27 °C, a niveles de humedad mayores a 62 % y de 14 % en los alimentos (Dhanasekaran *et al.*, 2011). La producción de aflatoxinas en campo incrementa con el estrés hídrico, con las altas temperaturas y por insectos; además, en almacén por alta temperatura y humedad (Martínez Padrón *et al.*, 2013).

Los principales productos alimenticios afectados son los cereales, las nueces, las frutas secas, el café, el cacao, las especias, las semillas oleaginosas, los guisantes secos, los frijoles, las frutas carnosas y especialmente las manzanas. Las micotoxinas también se pueden encontrar en jugos de fruta, cerveza y vino que resultan del uso de

cereales y frutas contaminados en su producción. También pueden ingresar a la cadena alimentaria humana a través de la carne u otros productos animales, como huevos, leche y queso, como resultado del ganado que consume alimentos contaminados (Rodrigues *et al.*, 2012).

Las micotoxinas pueden resistir la descomposición por digestión en mamíferos no rumiantes y rumiantes con dietas que las contengan, pudiendo ser metabolizadas y llegar a músculo y leche, es por ello por lo que se debe inspeccionar la carne, pues la exposición a estos analitos es peligrosa y debe prevenirse. La carne contaminada puede provocar que el producto cárnico finalizado también lo esté, pues los tratamientos térmicos, como cocinar y congelar, no inactivan algunas micotoxinas como las aflatoxinas (De Ruyck *et al.*, 2015; Stoev, 2015).

En la rica y variada dieta occidental moderna, los individuos se someten en la exposición alimentaria a una muy amplia variedad de micotoxinas; dietas dependientes de cultivos de cereales cultivados y procesados bajo una regulación laxa son propensas a niveles altos de contaminación (De Ruyck *et al.*, 2015).

En los países europeos, las micotoxinas que se encuentran reguladas son: aflatoxinas, ocratoxinas, patulina, deoxilivalenol, zearalenona, fumonisinas y toxinas T-2 y HT-2 (Zain, 2011). Entre estas micotoxinas, las ocratoxinas se clasifican como un posible

carcinógeno por el IARC con pruebas suficientes de carcinogenicidad en animales, pero insuficiente en humanos. Las ocratoxinas probablemente son causantes de la Nefropatía Endémica de Balkan en seres humanos, y en cerdos es el principal agente causal de nefropatía micotóxica (De Ruyck *et al.*, 2015; Stoev, 2015).

El Centro Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés) enlista como posibles carcinógenos a las fumonisinas B₁ y B₂, las cuales se producen principalmente en cereales como el maíz y derivados (De Ruyck *et al.*, 2015). Se les atribuye una serie de brotes de leucoencefalomalacia en caballos y edema pulmonar porcino matando a individuos de ambas especies alimentadas con dietas de maíz con fumonisinas. En 1980, en África del Sur se observó una enfermedad similar a la de los cerdos, en personas de edad avanzada con dietas basadas en maíz, lo que sugiere que las fumonisinas son la causa. En un análisis realizado en África Occidental, específicamente en Burkina Faso, de diversos alimentos y piensos, se detectó la fumonisina B₁ (FB1) en más del 80 % de las muestras. En un estudio realizado en Irán, se encontró cierta correlación positiva entre la prevalencia de FB₁ en arroz y la incidencia de cáncer de esófago (Alizadeh *et al.*, 2012; Stoev, 2015).

Las toxinas T-2 y TH-2 son toxinas que afectan cultivos de cereales como la avena, cebada, maíz y trigo. Se asocian con la inhibición de síntesis de proteínas y apoptosis en una amplia variedad de células y

órganos (cerebro, tracto gastrointestinal, piel, bazo y timo) en animales y personas, lo que puede potencialmente aumentar la susceptibilidad a otros factores cancerígenos (De Ruyck *et al.*, 2015; Stoev, 2015).

El deoxilivalenol y la patulina son potentes inhibidores de proteínas. La zearalenona se ha detectado que posee actividad estrogénica. En cerdas provoca inflamación vulvar y de glándulas mamarias, infertilidad, vulvovaginitis y prolapso rectal y/o vaginal. Se detectó, esta micotoxina en el 90 % de los cultivos de cereales de muestras tomadas de los países de Europa Central como Austria, Francia y Alemania (De Ruyck *et al.*, 2015; Stoev, 2015).

Existen seis aflatoxinas predominantes: aflatoxina B₁, B₂, G₁, G₂, M₁ y M₂; las dos últimas son metabolitos expresados en leche, sintetizados por mamíferos que consumieron una dieta contaminada con aflatoxina B₁ (AFB₁) y B₂ respectivamente. La M₁ puede estar presente en leche de vaca o humana que consumen alimentos contaminados con estos metabolitos (De Ruyck *et al.*, 2015).

3.3.1 Repercusiones económicas por la presencia de micotoxinas en alimentos

Desde el punto de vista económico, la alimentación de los animales domésticos para consumo humano representa el principal costo en las unidades de producción pecuarias. Por esta razón, las

necesidades nutricionales de los animales se han estudiado cuidadosamente con el fin de optimizar la producción de bovinos, ovinos, porcinos y aves de corral entre otros. La alimentación animal es el primer eslabón de la cadena alimentaria; por lo tanto, el riesgo de permanencia de sustancias tóxicas en los piensos contaminados a los tejidos animales y fluidos biológicos y finalmente, a los productos destinados para consumo humano (carne, leche y huevos), es un motivo de preocupación (Arroyo-Manzanares *et al.*, 2015).

De acuerdo con la FAO, se estima que el 25 % de los cultivos destinados a la producción de alimentos se encuentran contaminados con algún tipo de micotoxina (INTA, s/a). Las micotoxinas representan pérdidas de 5,000 millones de dólares anualmente sólo en las industrias forrajeras y ganaderas de Estados Unidos y Canadá. En países de Asia sudoriental se estudiaron las pérdidas económicas atribuibles a la presencia de aflatoxinas en maíz y cacahuate, concluyendo que el 66 % de las pérdidas eran del maíz. Esto incluye pérdidas de vidas humanas y animales, aumento en la atención de salud y costos de atención veterinaria, reducción en la producción ganadera, costos por eliminación de alimentos contaminados y la inversión en investigación y aplicaciones para reducir la severidad del problema de micotoxinas (FAO, 2004; Miller, s/a; Zain, 2011; Zahra *et al.*, 2018). Por otro lado, en países africanos se pierden aproximadamente 670 millones de dólares en alimentos

contaminados con AFB1 por no cumplir con los estándares europeos de exportación (Amare y Keller, 2014).

3.4 Aflatoxinas

Las aflatoxinas son metabolitos secundarios sintetizados principalmente por los hongos *Aspergillus flavus* y *A. parasciticus*. Se aislaron y caracterizaron por primera vez en 1960, debido a la muerte de más de 100,000 pavos jóvenes (enfermedad X de los pavos) en Escocia, que después se determinó, había sido por el consumo de alimento contaminado con harina de cacahuete (Rojas Contreras y Wilches Flores, 2009; Caloni y Cortinovis, 2011; Gomes *et al.*, 2013).

Las aflatoxinas son cristales sólidos sin olor, sin sabor y sin color, insolubles en agua y solubles en metanol, cloroformo, acetona, acetonitrilo y dimetil sulfóxido. En solución son sensibles a la luz y se descomponen en el aire, oxígeno, soluciones alcalinas o de ácidos suaves. Resisten temperaturas de hasta 320 °C, no se descomponen por ultrapasteurización, cocción, freído, hervido, fermentación ni nixtamalización (Carvajal, 2013).

Una vez sintetizadas son acumulativas, de modo que una vez que contaminan el grano o el producto agrícola en campo o almacén persisten a la digestión, al calor de la cocción o al congelamiento. Las aflatoxinas son ingeridas por los seres humanos no sólo a través de

granos, semillas o frutos; también se presentan en la leche o la carne de animales criados con alimentos contaminados (Martínez Padrón *et al.*, 2013).

3.4.1 Aflatoxina B₁

Los principales analitos de origen natural detectados en productos agrícolas son las aflatoxinas B₁ y B₂ (Rossi *et al.*, 2012). La AFB₁ se encuentra en el grupo 1 de carcinógenos del IARC y es uno de los principales factores de riesgo para la presencia de tumores hepáticos malignos en humanos (Pleadin *et al.*, 2015).

La AFB₁ tiene tres principales efectos toxicológicos: genotoxicidad, principalmente induciendo la formación de aductos de AFB₁-ADN y la mutación del gen p53; la atracción por órganos específicos, principalmente el hígado, lo que provoca el daño a dicho órgano; y carcinogenicidad, causando carcinoma hepatocelular. Existe una dosis de micotoxina con la cual el 50 % de los individuos puede desarrollar tumores malignos de 1.15 µg/kg p.c./día. La ingesta máxima de AFB₁ tolerada es de 0.00011 a 0.00019 µg/kg p.c./día con un factor de seguridad de 5,000 y un nivel de riesgo de 1/100,000 (Gimeno, 2004).

3.4.1.1 Biosíntesis de aflatoxina B₁

La AFB₁ puede ingresar al organismo por ingesta, a través de la piel o al ser inhaladas (Carvajal, 2013). Cuando se ingiere un alimento contaminado con AFB₁, se absorbe en el intestino delgado, entonces es transportada en la sangre, donde los glóbulos rojos y proteínas plasmáticas la conducen hacia el hígado, en donde una porción de la aflatoxina absorbida es activada y fijada en tejidos hepáticos (Gimeno, 2004; Martínez Padrón *et al.*, 2013).

La AFB₁ es el carcinógeno hepático de origen natural conocido más potente, no es mutagénica en sí misma, requiere una bioactivación y el hígado es el sitio predominante donde ocurre el cambio metabólico necesario para el efecto tóxico de la aflatoxina, específicamente en las células hepáticas, en la función microsomal del citocromo P450 humano (Guzmán de Peña, 2007). LA AFB₁ posee un enlace insaturado entre los carbonos 8 y 9, se ha demostrado que esta posición es crítica para su potencia carcinogénica (Kensler *et al.*, 2010).

Las enzimas microsomales de este citocromo más influyentes en esta activación son la CYP3A4 y la CYP1A2 activando la AFB₁-8,9 epóxido (AFBO). La primera interviene en la formación de la forma *exo*-epóxido y la segunda, 500 veces más mutagénica, interviene en la formación de la forma *endo*, conocida por su capacidad de bioactivar muchos procarcinógenos a su forma carcinógena activa;

ambos necesitan la presencia de un doble enlace entre los carbonos 8 y 9 (Urrego Novoa y Díaz, 2006; Kensler *et al.*, 2010).

El AFBO se une al ADN, ARN o proteínas, primero se liga al N7 de la guanina del ADN, sitio de unión y mutación preferente para formar el aducto 8,9-dihidro-8-(N7-guanil)-9-hidroxi-AFB1, que representa el 90 % del total de aductos formados en el hígado humano, este aducto es muy inestable y puede zafarse del ADN, dando lugar a un sitio apurínico (Carvajal, 2013). Esta unión ocurre por medio de la inducción de depuración y escisión de la hebra, que puede inducir la mutación en células somáticas y es llevada a cabo en regiones del ADN ricas en guanina. Puede inducir, entonces, rotura de la cadena de ADN, daño en las bases de este y daño oxidativo, en última instancia daño al genoma (Urrego Novoa y Díaz, 2006).

Este complejo formado, puede intercalarse en el ADN causando mutación por la transversión de guanina a timina, lo que sucede en la tercera base del codón 249 del gen p53, implicado como punto de chequeo durante la síntesis y reparación del ADN. Esta mutación se ha demostrado en gran variedad de cánceres humanos, y se ha detectado en más del 75 % de cánceres hepáticos en áreas con alta exposición a AFB1 (Villar *et al.*, 2011; Gouas *et al.*, 2012).

De los más de 100 genes relacionados con el cáncer, la mutación en el gen p53 es la más frecuente asociada a neoplasias. La proteína p53 es importante como antitumoral, se hace evidente en el hecho de

que casi 50 % de los cánceres humanos contienen células con mutaciones puntuales o supresiones en ambas copias del gen p53, neoplasias que suelen ser más invasivas y provocan metástasis con mayor frecuencia, correlacionándose, también, con una menor tasa de supervivencia. Las principales funciones de la proteína p53 son: control del ciclo celular, síntesis y replicación del ADN, diferenciación celular, plasticidad genómica y muerte celular programada (Urrego Novoa y Díaz, 2006; Carvajal, 2013).

El aducto 8,9-dihidro-8-(N7-guanil)-9-hidroxi-AFB1 puede unirse también a proteínas celulares induciendo daño celular y eventualmente muerte celular, también puede causar toxicidad aguda o aflatoxicosis (Ornelas-Aguirre y Fimbres-Morales, 2015).

La AFB1-epóxido puede reaccionar con el glutatión (GSH) para reducir la toxicidad por la enzima glutatión-S-transferasa (Dohnal *et al.*, 2014). Ésta unión representa el paso de detoxificación más importante (Urrego Novoa y Díaz, 2006).

El tiempo de vida media plasmática para la AFB1 es de 36.5 minutos, su volumen de distribución es de un 14 % del peso corporal y el aclaramiento renal 1.25 L/kg/h. Alrededor del 80 % de la dosis total de AFB1 se excreta en una semana. La aflatoxina M₁ se excreta entre las 48 horas siguientes a la ingestión y representa entre el 1 y 4 % de la AFB1 ingerida (Urrego Novoa y Díaz, 2006; Ornelas-Aguirre y Fimbres-Morales, 2015).

Al menos 17 enzimas catalizan la biosíntesis de las actividades de la AFB1, 25 o más genes codifican estas enzimas. La biosíntesis de aflatoxinas parece cumplir múltiples funciones bioquímicas y biológicas para el organismo productor incluyendo la eliminación de etilo, protección del genoma de los rayos UV, disminuyendo el estrés oxidativo, protección contra insectos, regulación de formación de conidios y desarrollo de esclerocios (Roze *et al.*, 2011).

3.4.1.2 Efectos en la salud humana

El consumo de aflatoxinas causa dos tipos de toxicidad en los humanos. Uno de ellos es la toxicidad aguda, enfermedad caracterizada por fiebre alta, orina coloreada, vómitos, edema en los pies, ictericia, ascitis de rápido desarrollo, hipertensión y una alta tasa de mortalidad; y la otra es la toxicidad crónica, dada por la exposición continua a aflatoxinas en la dieta. La AFB1 se une al ADN, causando alteraciones estructurales. El consumo de alimentos contaminados con aflatoxinas es un posible factor etiológico para la cirrosis infantil (Dhanasekaran *et al.*, 2011).

Se estima que la ingesta de alimento contaminado con aflatoxina en dosis de 1,700 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal en un corto tiempo puede ser suficiente para causar severo daño hepático. Aparentemente la aflatoxicosis aguda no ocurre con la ingesta de 340 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso

corporal por día. Una dosis única de 75,000 µg/kg de peso puede provocar la muerte (Weidenbörner, 2001; Dhanasekaran *et al.*, 2011).

El carcinoma hepatocelular humano de las zonas de alta exposición a AFB1 se ha relacionado estrechamente a ésta hasta en un 50 %. Los seres humanos infectados crónicamente con el virus de hepatitis B tienen un mayor riesgo de desarrollar cáncer hepático si tienen biomarcadores positivos para AFB1 (Ferrís i Tortajada *et al.*, 2008; Wild y Montesano, 2009; Gomes *et al.*, 2013; Iqbal *et al.*, 2014). Los mayores factores de riesgo son el virus de hepatitis B y la exposición a AFB1, que presentan un efecto de sinergismo (Villar *et al.*, 2011). Por otro lado, la exposición a aflatoxinas y el virus de hepatitis C también presentan este efecto para la inducción de cáncer hepático (Liu y Wu, 2010).

Debido a la exposición a aflatoxinas, se han reportado tumores cancerosos como hepático, de colon, recto, estómago, glándulas lagrimales, pulmón, lengua y esófago. En Tailandia, Kenia, Mozambique y Suazilandia, estudios han relacionado directamente la ingestión de aflatoxinas con casos de cáncer hepático, siendo la presencia del virus de hepatitis B un cofactor importante (Carvajal, 2013).

Estudios epidemiológicos relacionan la ingesta de AFB1 con la incidencia de neoplasias gastrointestinales y hepáticas en países africanos, Filipinas y China. También, la exposición a las aflatoxinas

ha sido asociada con desórdenes en el crecimiento, como enanismo en niños (Guzmán de Peña, 2007). Un estudio epidemiológico realizado en África y Asia Oriental, determinó una correlación positiva entre la ingestión de alimentos contaminados con AFB1 y la prevalencia de cáncer primario en humanos; revelando que la existencia del virus de la hepatitis B podría contribuir a una incidencia de cáncer en poblaciones expuestas a aflatoxinas (Álvarez *et al.*, 2000), aunque el mecanismo molecular para la interacción entre virus de hepatitis B y aflatoxinas aún no se conoce (Strosnider *et al.*, 2006).

De acuerdo con datos de la OMS (2018), el cáncer hepático es la segunda causa de muertes por cáncer en el mundo con 788,000 defunciones, de acuerdo con reportes obtenidos hasta el 2015. El cáncer de hígado es el quinto tipo de cáncer más común en hombres y el séptimo en mujeres; es diagnosticado en más de medio millón de personas en todo el mundo cada año y sólo el 5 % de los pacientes alcanza una supervivencia de cinco años (Ferrís i Tortajada *et al.*, 2008; Gomes *et al.*, 2013). En la actualidad, más de cinco billones de personas están expuestas a las aflatoxinas, lo que se desconoce es cuántos casos de cáncer de hígado pueden atribuirse a la aflatoxina en todo el mundo (Kensler *et al.*, 2010).

Además de sus efectos carcinogénicos, en un estudio se examinaron los posibles efectos de las aflatoxinas en la fertilidad. El semen del 40 % de los hombres infértiles y el 8 % de los hombres fértiles tenían

presencia de aflatoxinas. El 50 % de los hombres infértiles con altos niveles de aflatoxina en semen mostraban anomalías (conteo de espermatozoides, morfología y motilidad) en el análisis espermático; mientras que 10-15 % de los hombres fértiles mostraban anomalías en los espermatozoides (Shuaib *et al.*, 2010).

Azziz-Baumgartner *et al.* (2005) realizaron un estudio en Kenia por un brote de insuficiencia hepática aguda. Hubo 317 casos, de los cuales 125 terminaron en la muerte del paciente; siete muestras de suero de los pacientes fueron analizadas y todas fueron negativas para los virus que causan enfermedad hepática en Kenia. Previamente, en esta zona geográfica se habían producido brotes de aflatoxicosis por consumo de maíz contaminado con AFB1 en una concentración de 4,400 µg/kg, 220 veces mayor al límite de concentración sugerido por las autoridades de Kenia, lo que relaciona positivamente la aflatoxicosis aguda, la falla hepática y el consumo de maíz contaminado.

3.4.1.3 Regulación

La Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés), estableció desde 1977 un límite permisible de 20 µg/kg de aflatoxinas totales en alimentos destinados para consumo humano (Méndez-Albores y Moreno-

Martínez, 2009). El límite máximo permisible en la Unión Europea para AFB1 en especias es de 5 µg/kg (Ardic *et al.*, 2008; O’Riordan y Wilkinson, 2008; Ali *et al.*, 2015; Asghar *et al.*, 2016).

Según datos de la FAO, el límite vigente actual en por lo menos 29 países es de 2 µg/kg; la mayoría de estos países pertenecen a la Unión Europea, a la Asociación Europea de Libre Comercio y a los países candidatos a incorporarse a la Unión Europea.

En México, la NOM-188-SSA1-2002, Productos y Servicios. Control de aflatoxinas en cereales para consumo humano y animal, establece que los límites máximos permitidos para cereales no deben exceder de 20 µg/kg de aflatoxinas totales. En caso de concentraciones de 21 a 300 µg/kg el cereal puede usarse para consumo animal.

3.4.1.4 Presencia de aflatoxina B₁ en productos cárnicos

Los productos cárnicos son aquellos que han sido sometidos a un proceso de curado y/o maduración a fin de modificar sus características sensoriales y de conservación. Son sometidos a procesos de secado, molido, emulsificación, adición de sales, especias (pimienta, chiles, comino, etc.) y otros ingredientes (soya, féculas de maíz o papa, etc.), cambios de color o una combinación de ellos (FAO, 2014). En los productos cárnicos, las micotoxinas, como la AFB1, pueden originarse a partir de residuos de la alimentación

animal, por el crecimiento de hongos toxigénicos o por la adición de especias (Fazekas *et al.*, 2005; Bailly y Guerre, 2009).

Herzallah (2009) determinó la presencia de AFB1 en muestras de carne y productos cárnicos (Cuadro 1).

Cuadro 1. Porcentaje de muestras positivas y concentraciones de aflatoxina B₁ en productos de origen animal de Jordania

Muestra	Muestras positivas (%)	Promedio de concentración AFB1 (µg/kg)
Carne producida localmente (res, borrego y cabra)	10	2.9
Carne importada (res)	30	3.2

Markov *et al.* (2013) analizaron muestras de productos cárnicos fermentados y encontraron presencia de moho productor de AFB1 en el 12 %. Además, aflatoxinas en un rango de <1 a 3 µg/kg, siendo el salami el de mayor concentración (Cuadro 2).

Adb-Elghany y Sallam (2015) determinaron aflatoxinas totales en almuerzo y hamburguesa de res, con una concentración de 1.12 y 3.22 µg/kg respectivamente, resultando que los hígados fueron las piezas más contaminadas, pero sin pasar el límite máximo permitido (Cuadro 2).

Pleadin *et al.* (2015) detectaron aflatoxinas en jamón, embutidos fermentados secos, tocino y salchichas de hígado, teniendo el menor

porcentaje de muestras positivas el tocino con 3.2% y el mayor porcentaje las salchichas de hígado con 11.1% (Cuadro 2).

Cuadro 2. Incidencia de aflatoxinas en productos cárnicos

Referencia	Producto	Muestras positivas (%)	Intervalo de concentración (µg/kg)	Promedio de concentración (µg/kg)	Método de análisis
Pleadin <i>et al.</i> (2015)	Jamón	3.8	Nd-1.06	0.05	Prueba de ELISA (kit fabricado por R-Biopharm, Darmstadt, Alemania)
	Embutidos fermentados secos	3.8	0.96-5.10	0.3	
	Tocino	3.2	Nd-1.23	0.04	
	Salchichas de hígado	11.1	1.12-3.13	0.26	
Abd-Elghany y Sallam (2015)	Almuerzo de res	100	0.47-2.1	1.12	Inmunoafinidad con fluorimetría (ColumnasAf)
	Hamburguesa de res	100	0.55-7.5	3.22	
Markov <i>et al.</i> (2013)	Salchichas	-	<1.0-1.5	1.1	Prueba de ELISA (kit fabricado por R-Biopharm, Darmstadt, Alemania)
	Embutidos semisecos	-	<1.0-1.1	<1.0	
	Productos cárnicos secos	-	<1.0-2.7	-	

Nd = No determinado

3.4.1.5 Presencia de aflatoxina B₁ en especias

En varias partes del mundo se han analizado especias y mezclas de ellas con el fin de determinar la presencia de AFB₁, en el Cuadro 3 se resumen algunos resultados de éstas y las concentraciones en que se han encontrado.

Cuadro 3. Presencia de aflatoxina B₁ en especias

Referencia (País)	Muestras	Muestras positivas	Intervalo de concentración (µg/kg)	Método de análisis	de
Hammami <i>et al.</i> , 2014 (Qatar)	Especias y mezclas de especias	5/12 (41.6%)	1.85 – 69.28	HPLC + Columna de inmunoafinidad	
Khayoon <i>et al.</i> , 2012 (Malasia)	Arroz Cacahuete Especias	1/5 (20%) 2/9 (22%) 2/10 (20%)	5.28 3.16 y 6.00 10.8 y 33.2	HPLC-FD Columna monolítica base sílica	+
Ardic <i>et al.</i> , 2008 (Turquía)	Pimienta roja molida	72/75 (96%)	0.11 – 24.7 11>5	ELISA Columna de inmunoafinidad	+
Cho <i>et al.</i> , 2008 (Corea)	Especias y especias procesadas	12/88 (13%)	0.08 – 4.45	HPLC-UV	
Sahar <i>et al.</i> , 2009 (Pakistán)	Análisis cualitativo. Muestras positivas: tomate, chile en polvo, cilantro, pepino, cacahuates y durazno seco 6/18 (33%)			TLC	
Ozbe y Kabak, 2012 (Turquía)	Hojuelas chile rojo Polvo chile rojo Pimienta negra en polvo Comino Canela en polvo	19/24 (79%) 14/22 (63%) 7/23 (30%) 4/19 (21%) 0/17	0.13 – 11.45 0.2 – 35.77 0.13 – 0.42 0.32 – 0.88 -	HPLC-FD	

Continuación del Cuadro 3.

Tosun y Arslan, 2013 (Turquía)	Hojas de laurel	2/29 (6%)	16.5 – 20.3	ELISA + Columna de inmunoafinidad		
	Comino	5/62 (8%)	0.5 – 26.3			
	Menta	4/80 (5%)	4.2 – 26.7			
	Romero	3/50 (6%)	3.3 – 10			
	Albahaca	6/100 (6%)	0.8 – 18.1			
	Canela	5/100 (5%)	49.4 – 53			
	Semillas de amapola	3/43 (7%)	0.98 – 3.2			
	Tomillo	0	ND			
	Jengibre	3/75 (4%)	3.8 – 23.1			
	Anís	4/67 (6%)	4.9 – 8.4			
	Zumaque	8/80 (10%)	51.2 – 52.5			
	Pimienta negra	4/67 (6%)	24.6 – 30			
	Hojuelas de pimienta roja	4/57 (7%)	3.5 – 30.3			
	Pimienta roja	6/75 (8%)	23.4 – 46.6			
	Cilantro	1/50 (2%)	15.6 – 15.6			
	Reddy, <i>et al.</i> , 2001 (India)	Chile grado 1	21/42(50%)		16 < 10 – 1>51	ELISA
		Chile grado 2	25/38 (65%)		10 < 10 – 6 > 51	
Chile grado 3		41/44 (93%)	21 < 10 – 13>51			
Tienda fría		3/15 (20%)	2 < 10 – 0 > 51			
En polvo		17/43 (39%)	12 < 10 – 4 > 51			
Arowora <i>et al.</i> , 2012 (Nigeria)	Maíz	-	9.67 ± 1.67	HP-TLC		
	Sorgo	-	21.72 ± 2.92			
	Trigo	-	2.57 ± 0.61			
	Pescado seco	-	3.14 ± 0.35			
	Cangrejo seco	-	1.66 ± 0.75			
	Cebolla	-	1.89 ± 0.68			
	Chips de batata	-	5.66 ± 0.97			
	Chips de yuca	-	4.20 ± 0.90			

Continuación del Cuadro 3.

O'Riordan y Wilkinson, 2008 (Irlanda)	Pimentón	2/8 (25%)					9.85 ± 8.65	HPLC-UV + Columna de inmunoafinidad
	Chile	10/30 (33%)					9.05 ± 8.67	
	Canela	0/7					-	
	Cilantro	1/9 (11%)					12.80 ± 0.40	
	Comino	0/6					-	
	Curry	3/20 (15%)					8.15 ± 0.95	
	Paprika	2/10 (20%)					3.40 ± 3	
	Pimienta	4/30 (13%)					2.19 ± 1.23	
	Cúrcuma	4/10 (40%)					8.17 ± 5.54	
Zahra <i>et al.</i> , 2018 (Pakistán)	Chile rojo	11/28 (39%)					23.99 – 89.20	TLC
	Pimienta negra	4/22 (18%)					47.68 – 75.78	
	Higos	8/20 (40%)					6.72 – 14.43	
	Chabacano	1/20 (5%)					13.2 ± 0.28	
Gojković <i>et al.</i> , 2017 (Bosnia y Herzegovina)	Cereales	13	<1	1-40	>40		Kits de ELISA	
	Nueces	19	5	4	4			
	Especias (cúrcuma, mostaza blanca y pimienta)	6	8	3	8			
		-	4	2				
Ali <i>et al.</i> , 2015 (Malasia)	Mezclas de especias análisis 1	85%					0.01 – 7.68	HPLC-Espectrofluorimetría
	Mezclas de especias análisis 2	83%					0.32 – 28.43	
Asghar <i>et al.</i> , 2016 (Pakistán)	Cond. biryani	12/80 (15%)	<1	1-10	10-20	>20	HPLC-FD + Columna de inmunoafinidad	
	Cond. Karhai	12/80 (15%)	4	9	2	0		
	Cond. Tikka	13/87 (15%)	3	12	0	0		
	Cond. Nihari	10/67 (15%)	4	9	1	1		
	Cond. Korma	11/73 (15%)	4	8	2	0		
			4	8	2	1		

Continuación del Cuadro 3.

		> 3 meses	< 3 meses	HPLC-FD
Akpo-				
Djènontin <i>et</i>	*A-J-P	6.21 ± 0.04	2.98 ± 0.04	
<i>al.</i> , 2018	A-C-P	84.84 ± 0.03	1.84 ± 0.08	
(Benin)	A-J-L	24.06 ± 0.11	4.84 ± 0.03	
	A-J-N-E-C-P-L	28.31 ± 0.007	11.34 ± 0.09	
	A-J-N-CI-C-P-L	Nd	1.84 ± 0.07	
	A-R-T-CI-L-N-Cn	8.86 ± 0.04	4.65 ± 0.08	
	J-L-P-Co-T-R-Cn-	2.82 ± 0.03	0.66 ± 0.08	
	An-Cu			
	A-T-Cu-P-L-Ah-N-J-	0.46 ± 0.05	0.66 ± 0.06	
	CI			

*A (ajo), J (jengibre), P (pimienta), C (chile), L (laurel), N (nuez moscada), E (eneldo), CI (clavo), R (romero), T (tomillo), Cn (canela), An (anís), Cu (curry), Co (Comino), Ah (albahaca).

Nd= no determinado

3.4.1.6 Métodos de análisis para la determinación de aflatoxinas en especias

Existen diversas técnicas analíticas para la determinación de aflatoxinas, entre los métodos reportados para su determinación se encuentran con mayor frecuencia técnicas cromatográficas como cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) o cromatografía en capa fina (TLC), y técnicas inmunológicas como ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) (Gojčović *et al.*, 2017).

La técnica de ELISA consiste en la reacción del antígeno y el anticuerpo en pocillos de microplacas, después de agregar un sustrato cromogénico. La prueba permite la cuantificación del analito mediante un lector óptico de ELISA, es una técnica que consta de una preparación de la muestra rápida y corto tiempo de análisis, los

resultados pueden obtenerse en minutos, por lo general son menos precisas y sensitivas que métodos de laboratorio como HPLC. Esta técnica es utilizada comúnmente debido a la disponibilidad de kits de prueba, además de ser un método rápido, económico y eficaz cuyos resultados positivos pueden ser comprobados mediante HPLC con detector de fluorescencia (Köppen *et al.*, 2010; Trombete *et al.*, 2013).

La cromatografía es un método usado para la separación de los componentes de una muestra, éstos se distribuyen en dos fases, una estacionaria y una móvil. El análisis cromatográfico de aflatoxinas está precedido por una secuencia de operaciones generales amplias y complejas que incluyen muestreo, preparación de muestras, extracción, purificación y concentración del extracto obtenido antes de la cuantificación (Quattrocchi *et al.*, 1992). La técnica de HPLC es usada como confirmatoria de ELISA, es la técnica más utilizada para la cuantificación de AFB1, acoplado con una columna C18 fase reversa (Trombete *et al.*, 2013).

4. Materiales y métodos

4.1 Toma de muestras

Se realizó un muestreo aleatorio de especias, mezclas de especias y soya de dos empresas especializadas con mayor volumen de venta en la Ciudad de México, durante los meses de diciembre de 2015 a enero de 2017, de acuerdo con la disposición de muestreo descrita en el reglamento europeo número 401/2006 (UE 2006), así como informados por otros autores (Cho *et al.*, 2008; Ozbey y Kabak, 2012; Ali *et al.*, 2015; Cavus *et al.*, 2018). A continuación, se describe: se tomaron 5 muestras de 100 g del saco (10 kg) correspondiente al fondo (1), medio (2) y superficie (2), se mezclaron las tres porciones y se pasaron a una bolsa de polietileno sellada y se conservó a 4 °C, protegida de la luz hasta su análisis.

La muestra de cacahuates fue tomada de un lugar de venta a granel en los meses de diciembre de 2015 a marzo de 2016, de acuerdo a lo establecido en el reglamento europeo (UE, 2006) y la NMX-F-353/1-S-1980, se tomaron 10 submuestras de 300 g del saco distribuido del fondo (2), medio (4) y superficie (4) para un total de 3 kg y se pasó a una bolsa de polietileno sellada y se conservó a 4 °C, protegida de la luz hasta su análisis.

Los productos cárnicos de marca, empacados y con información en el etiquetado, se obtuvieron de forma puntual en supermercados, como

jamones (cerdo y pavo), salchichas y la carne para hamburguesa, arrachera, alitas, nuggets y además carne enchilada a granel sin marca.

Las muestras se clasificaron en tres grupos:

A) Especies y otros ingredientes:

- Cebolla en polvo.
- Ajo en polvo.
- Pimentón en polvo.
- Chile guajillo en polvo.
- Fécula de papa.
- Fécula de maíz.
- Soya texturizada.
- Cacahuete.

B) Mezclas de especias para la formulación de:

- Salami: Combinación de especias, sales, antioxidantes y retenedores, diseñada para elaborar salami cocido.
- Peperoni: Mezcla de fosfatos, sales, pimentón español, anís, pimienta blanca y condimentos.
- Chistorra: Mezcla de harina de maíz, pimentón, sal dextrosa monohidratada, carbohidrato, sal de curación, acentuador de sabor, oleorresinas, acidulante, conservador artificial, ajo, laca rojo #6, color amarillo #6 y condimentos.
- Chorizo argentino: Sal refinada y yodatada, carbohidrato, sal de curación, especias, fibra, conservador, nuez moscada, antioxidante y acidulante.
- Longaniza: Muestreo a granel, sin información de los ingredientes.
- Marinador: Muestreo a granel, sin información de los ingredientes.

C) Productos cárnicos

- Jamón de cerdo.
- Jamón de pavo.
- Salchicha de pavo.
- Carne para hamburguesa.
- Arrachera.
- Alitas de pollo.
- Nuggets de pollo.
- Carne enchilada.

4.2 Preparación de las muestras

Las muestras, excepto las especias, fueron puestas en estufa a 50 °C durante 72 horas para eliminar el contenido de humedad, al finalizar, se molieron y tamizaron (0.1mm) y se colocaron en bolsas selladas en refrigeración a 4 °C, protegidas de la luz hasta su análisis.

4.3 Determinación de aflatoxinas por el método de ELISA

4.3.1 Reactivos

- Metanol grado HPLC.
- Agua destilada.

4.3.2 Cristalería y materiales

- Papel filtro Whatman No. 4.
- Matraz Erlenmeyer 250 mL.
- Tapón de caucho.
- Espátula de acero.
- Embudo de vidrio.
- Tamiz (0.1 mm).

4.3.3 Equipos

- Licuadora marca Oster.
- Balanza Sartorius (Máx. 2100 g d=0.1 g).
- Micropipeta (20 – 200 μ L).
- Lector de micropocillos (Biorad, modelo 680).

4.3.4 Materiales del juego de reactivos

- Conjugado.
- Controles (0, 1, 2, 4 y 8 μ g/kg).
- Pocillos de mezcla.
- Pocillos cubiertos con anticuerpos.
- Solución *Stop*.
- Software v.3.6 de Neogen Veratox.

4.3.5 Metodología

Se pesaron 5 g de cada muestra, la extracción de las aflatoxinas se realizó con metanol al 70 %. Se agitó la mezcla de muestra con metanol vigorosamente durante 3 minutos y se filtró el extracto, éste se vertió por lo menos 5 mL a través de un filtro Whatman No. 4. En pocillos de mezcla, se adicionaron 100 μ L del conjugado, utilizado para competir con las aflatoxinas o los controles para los sitios de unión de anticuerpos; posteriormente se colocaron 100 μ L de los controles (0, 1, 2, 4 y 8 μ g/kg) y muestras, se mezcló el contenido succionándolo y liberándolo tres veces. Se transfirieron 100 μ L a los pocillos cubiertos con anticuerpos específicos para aflatoxinas, se mezcló durante 20 segundos y se incubaron a temperatura ambiente

en los pocillos durante 10 minutos. Pasado ese lapso, se vertió la solución *Stop*, 100 µL en cada pocillo y se llevó al lector de micropocillos. Los resultados fueron analizados mediante el software de Neogen Veratox Software v 3.6.

4.4 Determinación de aflatoxina B₁ por el método de HPLC

4.4.1 Reactivos y estándar

- Metanol grado HPLC.
- Acetonitrilo grado HPLC.
- Ácido trifluoroacético grado HPLC.
- Diclorometano grado reactivo.
- Hexano destilado grado reactivo.
- Éter etílico grado reactivo.
- Agua desionizada (Centro de Producción de Agua Xochimilco, purificada mediante Purelab flexibilidad de Veolia Water).
- Estándar de aflatoxina B₁ (Romer Labs).
- Sulfato de sodio anhidro.
- Sílica gel 60 mallas.
- Celite 545.

4.4.2 Cristalería y materiales

- Matraz Erlenmeyer (250 mL).
- Tapones de caucho.
- Espátula
- Papel aluminio.
- Embudo de cristal.
- Papel filtro Whatman No. 4 (filtrado rápido).
- Columnas cromatográficas.
- Vasos de precipitados (40 – 500 mL).
- Matraces redondos de fondo plano (125 mL).
- Pipetas Pasteur.

- Viales ambar.
- Microjeringa (1 – 50 μ L).
- Pipeta de 1 mL.
- Micropipeta (100 – 1000 μ L).
- Puntas para micropipeta 1000 μ L.
- Columna para HPLC (LichroCART 250-4 Lichrospher 100 RP-18 de 10 μ m).

4.4.3 Preparación de cristalería

La cristalería se enjuagó inicialmente con una mezcla de hipoclorito de sodio al 10 %, posteriormente se realizó un lavado con jabón y agua corriente, seguido de un enjuague con agua destilada. Una vez que el material estuvo seco se hizo un enjuague con acetona, al secarse se realizó un enjuague con metanol y finalmente hexano.

4.4.4 Equipos

- Agitador mecánico (Eberbach).
- Mufla (Furnace).
- Horno (Felisa).
- Organizador (Hitachi, ELITE LaChrom).
- Detector de fluorescencia L-2485 (Hitachi, ELITE LaChrom).
- Horno de columna L-2300 (Hitachi, ELITE LaChrom).
- Inyector automático L-2200 (Hitachi, ELITE LaChrom).
- Bomba L-2130 (Hitachi, ELITE LaChrom).
- Rotoevaporador (Büchi R-114).
- Vórtex (Velp. Scientifica).
- Sonicador (Branson 2510).

4.4.5 Metodología

4.4.5.1 Extracción

Se pesaron 5 g de las muestras colectadas, se colocaron en un matraz Erlenmeyer de 250 mL con tapa de caucho, se adicionaron 2.5 g de Celite, 2.5 mL de agua desionizada y 50 mL de diclorometano; se llevaron a un agitador mecánico de alta velocidad durante 30 minutos. Posteriormente se pasó por un papel filtro Whatmann No. 4; el filtrado se mantuvo en refrigeración a 4 °C y protegido de la luz hasta su análisis.

4.4.5.2 Preparación de la muestra previa a la purificación

Se colocó sulfato de sodio anhidro durante 24 horas a 500 °C en una mufla previo al análisis, esto con el fin de eliminar la humedad; al término de las 24 horas se puso en un desecador y al momento de pesar se agregó inmediatamente después diclorometano con el propósito de evitar la absorción de la humedad ambiental.

Por otro lado, se colocó sílica gel a 100 °C durante una hora en una mufla, posteriormente fue activada con 1 % de su peso con agua desionizada; la activación se realizó debido a que la sílica, al entrar en contacto con solvente desprende calor; el calor en la columna cromatográfica provocaría burbujas y grietas, cualquier grieta o canal en la columna afecta adversamente la purificación.

4.4.5.3 Preparación de la columna de sílica gel

Se rellenó el fondo de una columna cromatográfica con lana de vidrio purificada, su función es que la sílica y el sulfato de sodio no puedan salir por debajo; se agregó diclorometano y con una varilla de vidrio se compactó evitando la formación de burbujas de aire, se adicionaron 2.5 g de sulfato de sodio anhidro disuelto en diclorometano mientras que se golpeaba suavemente la columna con el fin de compactarla, se agregó diclorometano hasta 10 cm sobre el sulfato de sodio anhidro, posteriormente se adicionaron 5 g de sílica gel disuelta en diclorometano deslizándola sobre las paredes de la columna, se lavaron las paredes de la columna con diclorometano manteniendo el golpeteo para la compactación, cuando quedaron 5-7 cm de diclorometano por encima de la sílica, finalmente se adicionaron 7.5 g de sulfato de sodio anhidro dejando dos centímetros de diclorometano por encima del tope del sulfato.

4.4.5.4 Purificación del filtrado

En la columna preparada, se drenó el diclorometano hasta el tope del sulfato y se adicionaron 25 mL del filtrado con AFB1, se drenó hasta que la muestra llegó al borde superior del sulfato y se lavó la misma con 75 mL de hexano y 75 mL de éter dietílico posteriormente; ambos lavados se descartaron.

La AFB1 se eluyó con 75 mL de una mezcla de diclorometano: metanol (97:3 v/v) en un matraz redondo de 125 mL. El diclorometano

y el metanol tienen la capacidad de eluir a la AFB1 debido a su mayor polaridad.

El eluato se pasó y evaporó en un rotoevaporador hasta casi sequedad bajo presión reducida a una temperatura entre 30 y 35 °C, con 500 µL del eluyente diclorometano:metanol 97:3 v/v se enjuagaron las paredes del matraz y con una pipeta Pasteur se tomó el residuo y se colocó en un tubo cónico de 15 mL con tapa.

El eluato anteriormente obtenido se secó bajo una corriente de nitrógeno. El eluato seco se protegió de la luz y se guardó en refrigeración a 4 °C. Se analizó antes de que pasaran 24 horas de su obtención.

4.4.5.5 Análisis de AFB1 por HPLC

4.4.5.5.1 Preparación de fase móvil

La fase móvil se preparó con metanol, acetonitrilo y agua destilada en una relación de 20:20:60 v/v/v. El metanol y el acetonitrilo fueron filtrados con membrana de politetrafluoroetileno y el agua desionizada

con membrana de acetato de celulosa. Se mezclaron en un recipiente de vidrio y se colocó en el sonicador durante 30 minutos con el fin de eliminar las burbujas de aire.

4.4.5.5.2 Derivatización

Al eluato seco se le adicionaron 200 μL de hexano y se agitó con el vórtex durante un minuto, posteriormente se agregaron 50 μL de ácido trifluoroacético, se tapó el tubo y se mezcló con el vórtex durante un minuto; se colocó en baño de agua a 40 °C durante 40 minutos, posteriormente se evaporó bajo flujo lento de nitrógeno. El residuo se reconstituyó en 500 μL de la fase móvil antes de ser inyectado al equipo de HPLC.

4.4.5.5.3 Condiciones del equipo HPLC

Se utilizó una columna C18 de fase reversa, con un detector de fluorescencia a 365 nm de excitación y 420 nm de emisión, a flujo de 1 mL/min. Se comprobó que no existieran escapes del sistema de las conexiones. Se eliminaron las burbujas de aire que pudieran encontrarse en el sistema y se dejó funcionando el equipo a flujo de 0.5 mL/min durante 10 minutos para estabilizar el equipo y eliminar las posibles impurezas absorbidas en la columna. Posteriormente se aumentó el flujo a 1 mL/min y se dejó estabilizar por 15 minutos. Posteriormente se aplicaron 50 μL del residuo reconstituido de las muestras al sistema HPLC.

4.4.5.5.4 Cálculo e interpretación de los resultados

La identificación de los picos en la muestra se realizó por comparación de los tiempos de retención de éstos con los tiempos de retención del estándar. La concentración de AFB1 se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{Concentración de AFB1 (ng/g)} = (H \times C_p \times V_{L1} \times V) / (H_p \times W \times V_L)$$

Donde:

H y H_p son las alturas de los picos de la muestra y el estándar respectivamente.

C_p es la concentración del estándar (ng/μL).

V es el volumen final de la muestra (μL).

V_{L1} y V_L son los volúmenes del estándar aplicado y de la muestra aplicada.

W es el volumen de la muestra.

4.4.5.5.5 Establecimiento de los parámetros de desempeño para el análisis de aflatoxina B₁ en mezclas de especias mediante HPLC

Se determinaron los parámetros de desempeño o criterios de funcionamiento para el análisis de aflatoxina B₁ en mezclas de especias para la formulación de productos cárnicos mediante HPLC en términos de selectividad, linealidad, límite de detección (LOD),

límite de cuantificación (LOQ) y recobrado. A continuación, se describen los mismos.

Selectividad/Especificidad: se realizaron cuatro inyecciones por duplicado de cuatro muestras: blanco de reactivo, estándar de aflatoxina B₁ (1 µg/kg), una muestra de mezcla de especias sin fortificar y muestra fortificada con aflatoxina B₁ (1µg/kg).

Linealidad: se realizó la inyección de una curva de calibración de 8 puntos en concentraciones de 0.048 a 6.25 µg/kg de aflatoxina B₁, cada uno se inyectó por duplicado, y se calculó la ecuación de mejor ajuste y el coeficiente de correlación.

Límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ): se prepararon dos curvas de calibración (alta y baja), se tomaron los valores de la pendiente, el intercepto de la media y la desviación estándar de las mismas y se calcularon el LOD y el LOQ, empleando la siguiente ecuación:

$$\text{Límite de detección} = \frac{Y_{bl} + 3 S_{bl}}{b} \cdot \frac{1}{\sqrt{n}}$$
$$\text{Límite de cuantificación} = \frac{Y_{bl} + 10 S_{bl}}{b} \cdot \frac{1}{\sqrt{n}}$$

Donde:

Y_{bL} es la respuesta del blanco

S_{bL} es la desviación estándar del blanco

b es la pendiente de la curva de calibración (concentración vs la respuesta expresada en mVs)

n es la medida individual.

Recobrado: se contaminaron varias mezclas de especias para la elaboración de productos cárnicos (salami, peperoni, chorizo argentino, longaniza, chistorra, y marinador) por triplicado a la concentración de 5 µg/kg, el LMP de aflatoxina B₁ para especias según el LMP de la UE, se determinó el porcentaje de recuperación de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\% \text{ rec} = \frac{\text{Conc. observada}}{\text{Conc. adicionada}} * 100$$

5. Resultados y discusión

5.1. Determinación de aflatoxinas totales por el método de ELISA

Un total de cincuenta muestras fueron analizadas para determinar la presencia de aflatoxinas totales (AT), clasificándose en: especias e ingredientes (n=18), productos cárnicos (n=28) y mezclas de especias para la formulación de productos cárnicos (n=4), resultando positivas a AT el 40 % de las muestras. El mayor porcentaje de AT aparece en especias e ingredientes y en mezclas de especias para la formulación de productos cárnicos con el 61 y el 75 % respectivamente, mientras que los productos cárnicos sólo tuvieron un 3.5 % de muestras positivas a AT.

En la Figura 1 se muestra la concentración media de AT para los tres grupos analizados, puede observarse que el valor medio no sobrepasa el valor de 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$, inferior al valor recomendado por otros países con normas nacionales para especias y sus mezclas, que oscilan entre 5 y 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (CODEX, 2017). México no ha establecido una norma específica para la presencia de aflatoxinas en especias, por lo que en este trabajo para la comparación de resultados se empleará la norma europea, que es la más exigente y plantea límites máximos de aflatoxina B₁ y la suma de aflatoxinas en especias de 5 y 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ respectivamente (UE, 2010).

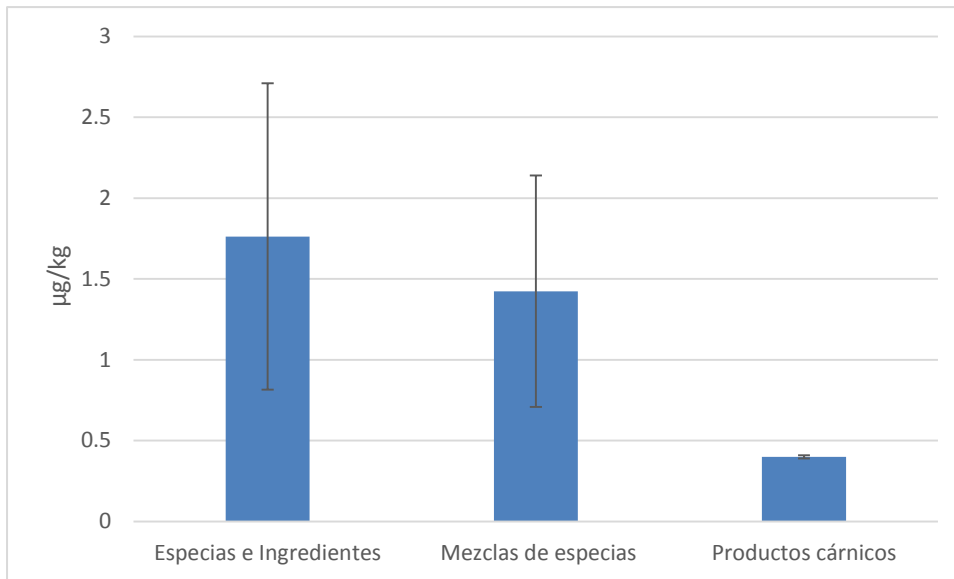


Figura 1. Concentración media de aflatoxinas totales (µg/kg) en los grupos de muestras analizadas.

En el Cuadro 4 se muestran los resultados para las especias e ingredientes comúnmente utilizados en la formulación de productos cárnicos, el valor máximo se reporta en chile guajillo con una concentración de 4.24 µg/kg. Resultados similares se informaron en un estudio realizado en el mercado de Doha, en Qatar, donde analizaron catorce muestras de especias, se detectó la presencia de aflatoxinas en cinco especias y sus mezclas (pimienta negra, chile, tandoori masala, cúrcuma y garam masala), encontrando el mayor valor de aflatoxina B₁ en chile con una concentración de 69.28 ± 1.08 µg/kg (Hammami *et al.*, 2014). En otro estudio realizado en Pakistán,

se analizaron 170 muestras de chile en diferentes presentaciones (salsa de chile, chile triturado y polvo de chile), se detectó la presencia de aflatoxinas en un intervalo de 39 al 59 % de las muestras analizadas, con un valor máximo de 27.5 y 21.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$, en muestras procedentes del mercado y de restaurantes respectivamente (Iqbal *et al.*, 2013). Los resultados antes mencionados corroboran que el chile es una especia susceptible al desarrollo fúngico y formación de aflatoxinas si las condiciones de humedad y temperatura son propicias durante su producción y almacenamiento.

Cuadro 4. Concentración de aflatoxinas totales (AT) en especias e ingredientes comúnmente utilizados en la formulación de productos cárnicos

Especias e ingredientes	No. de muestras analizadas	Intervalo de contaminación ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Cebolla	3	Nd – 1.61
Pimentón	2	2 – 3.05
Ajo	3	1 – 2.05
Chile guajillo	1	4.24
Soya texturizada	2	Nd - 0.07
Cacahuete	1	1.57
Fécula de maíz	2	Nd
Fécula de papa	4	Nd – 2.75

Nd= No determinado

Las muestras de pimentón son las segundas en mayor concentración de AT en este estudio, con un intervalo de 2.0 a 3.05 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en el 100 % de las muestras analizadas. En un estudio realizado en setenta muestras de pimentón recolectadas en la ciudad de São Paulo, Brasil,

de enero a abril de 2006, se detectaron aflatoxinas en el 82.9 % de las muestras y AFB₁ en el 61.4 %, en un intervalo de concentración de 0.5 a 7.3 µg/kg, con una concentración media de 3.4 µg/kg (Shundo *et al.*, 2009). En otro estudio realizado en ciento treinta preparaciones de especias, que fueron obtenidas en diversos puntos de venta en Irlanda (incluidos supermercados, tiendas y puestos de mercado), encontraron que el 20 % de las muestras estaban contaminadas con aflatoxina B₁, en un intervalo de 0.40–6.40 µg/kg (O’Riordan y Wilkinson 2008). Por otro lado, en un estudio donde evaluaron la presencia de aflatoxinas y ocratoxina A en pimentón rojo para la venta al por menor en España, encontraron que las muestras que presentaban aflatoxinas estaban muy por debajo de los dos límites legales, de 5 µg/kg para aflatoxina B₁ y 10 µg/kg para aflatoxinas totales, establecido por la Unión Europea (UE, 2010), no así la ocratoxina A, que se encontró con mayor frecuencia, con una media de 11.8 µg/kg y en un intervalo más variado (SD 18.9 µg/kg) (Hernández Hierro *et al.*, 2008). Los resultados obtenidos en pimentón en este estudio se encuentran en el mismo orden que los reportados en los trabajos antes mencionados.

Arowora *et al.* (2012) realizaron un estudio en productos agrícolas en Nigeria, donde informaron la presencia de aflatoxina B₁ y AT en cebolla en niveles de 1.89±0.68 y 3.14 µg/kg respectivamente, estos resultados se encuentran en el mismo orden de lo reportado en este

trabajo, que alcanzaron un valor máximo de 1.61 µg/kg. Tančinová *et al.* (2014) encontraron hongos productores de aflatoxina en ajo en polvo proveniente de China, cebolla en polvo y granulada proveniente de Francia. Con relación a las muestras de ajo en este estudio, se detectaron valores máximos de 2.05 µg/kg, concentración muy inferior a lo reportado en un estudio realizado en Egipto, donde se reportaron valores de 224.4 µg/kg en ajo entero, mientras que en ajo pelado no se detectaron aflatoxinas (Refai *et al.*, 2003). Por otro lado, Sahar *et al.* (2009) analizaron tres muestras de ajo en donde no detectaron la presencia de aflatoxinas. Los altos niveles encontrados en ajo entero por Refai *et al.* (2003) pueden ser discutibles, ya que se ha demostrado el efecto antifúngico del ajo en estudios *in vitro*, donde disminuye la producción de aflatoxinas desde 5.94 hasta 0.15 µg/kg (Thanaboripat *et al.*, 1997). Mientras otro estudio muestra que existe una inhibición del crecimiento micelial en un medio líquido SMKY y en granos de maíz inoculado con *Aspergillus flavus* del 61.94 % (Bilgrami *et al.*, 1992). En otro estudio *in vitro* empleando medio YES inoculado con *Aspergillus flavus*, evaluaron el crecimiento micelial, esporulación y producción de aflatoxinas con diferentes concentraciones de ajo y cebolla y demostraron un efecto moderado de inhibición y producción de aflatoxinas (Chalfoun *et al.*, 2004). Los estudios antes mencionados podrían explicar los bajos valores encontrados de aflatoxinas en ajo y cebolla en este trabajo.

Algunos de los ingredientes como soya, cacahuete y féculas de maíz y papa se emplean en la producción de cárnicos con la finalidad de aumentar los rendimientos, mejorar la textura, producir delgadas rebanadas de carne procesada y mejorar la aceptabilidad del producto; a diferencia de las especias, éstas son más susceptibles a la contaminación por aflatoxinas, aspecto que ha sido evidenciado a nivel global y en México en relación al maíz y cacahuates (Wu *et al.*, 2013; Ostadrahimi *et al.*, 2014; Ortega-Beltran *et al.*, 2015; Agyekum y Jolly, 2017). En este trabajo, el valor encontrado de aflatoxinas en cacahuete se encuentra en rango a lo reportado en otros estudios en México donde los valores de AT oscilan entre 0.11 y 79.69 µg/kg (Alvarado-Hernández *et al.*, 2016).

Por otro lado, Flores Ortiz *et al.* (2006) mencionan que en México la incidencia de aflatoxinas en maíz se estima en el 90 %, en un intervalo de 2.5 a 30 µg/kg y un promedio de 66 µg/kg en 42 muestras analizadas; Peña Betancourt *et al.* (2013) analizaron muestras de maíz, en todas ellas se determinaron aflatoxinas en un intervalo de 1.7 a 13.5 µg/kg. En este estudio no se detectó la presencia de aflatoxina en la fécula de maíz, lo que puede deberse en primer lugar al proceso de obtención de la misma, donde se separa la cáscara del almidón. En un estudio donde se evaluó la calidad del almidón durante el proceso de fermentación espontánea (21 días) no se encontraron aflatoxinas por encima de 5 µg/kg (Yuan *et al.*, 2008) y

en otro estudio donde se analizó el destino de las aflatoxinas durante el proceso de molienda húmeda y su distribución en productos y subproductos, sólo el 8.7 % del total de aflatoxinas en el maíz inicial se encontró en la fracción de almidón, que representa el 61 % del maíz molido, lo que concluye, es que las aflatoxinas fueron destruidas durante la conversión a almidón (Aly, 2002). Un segundo aspecto puede ser que el maíz empleado no presente aflatoxinas o las presente en cantidades por debajo del límite máximo permisible para su consumo, debido a que existieron buenas prácticas de producción (Sekiyama *et al.*, 2005).

En este estudio, el 50 % de las muestras de fécula de papa, muestra resultados positivos en un intervalo de 0.92 a 2.75 $\mu\text{g}/\text{kg}$, este resultado es discutible ya que no se ha informado la presencia de aflatoxinas en papa cosechada, sin embargo, los cultivos de raíces son susceptibles al crecimiento de *Aspergillus* y, por lo tanto, a la posible contaminación con aflatoxina (Lovelace y Aalbersberg, 1989). Se ha reportado la presencia de aflatoxinas en papa inoculada con un promedio de 8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de aflatoxinas totales (principalmente B₁ y G₁) a 27 °C y 95-97 % de humedad relativa en 20 días (Swamlnathan y Koehler, 1976). En camote, se han reportado concentraciones de aflatoxinas que van de 0.01 a 0.18 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Tung y Ling, 1968). En alimentos con almidón, crudos y cocidos, después del almacenamiento se encontraron niveles de aflatoxinas en el orden de

3-25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en *Ipomoea batatas* (Lovelace y Aalbersberg, 1989). A pesar de no haber estudios en papas cosechadas, los estudios en camote y en su almidón corroboran de alguna manera los resultados de este estudio, y que condiciones no adecuadas durante su almacenamiento, también pueden contribuir a encontrar presencia de aflatoxina, considerando que el almidón de papa se emplea en diferentes medios de cultivo para la producción de aflatoxinas.

En la muestra de soya texturizada analizada se encontraron AT con un valor de 0.07 $\mu\text{g}/\text{kg}$, la cantidad de AT resulta mínima, esto es debido a que se ha informado por diversos autores que la soya contiene sustancias inhibidoras del crecimiento fúngico y la síntesis de aflatoxinas (Strange, 1991; Winter y Pereg, 2019). En un estudio realizado en Serbia, se analizaron 63 muestras de soya y no se encontró presencia de aflatoxinas (Jakić-Dimić *et al.*, 2009), lo que corrobora que la soya es menos susceptible a la infección por hongos y formación de micotoxinas que granos más grandes como el maíz.

En todos los casos tampoco se rebasó el valor de 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ establecido por la Unión Europea, por lo que no constituye un riesgo para la salud pública (UE, 2010).

En el Cuadro 5 se presentan los resultados de aflatoxinas totales (AT) en productos cárnicos. De las veintiocho muestras analizadas, sólo una muestra de carne enchilada fue positiva, lo que representa el 3.5 %.

Cuadro 5. Concentración de aflatoxinas totales (AT) en productos cárnicos

Producto cárnico	No. de muestras analizadas	Intervalo de contaminación (µg/kg)
Carne enchilada	2	Nd- 0.4
Jamón de cerdo	6	Nd
Jamón de pavo	6	Nd
Salchicha de pavo	3	Nd
Nuggets de pollo	4	Nd
Chorizo	4	Nd
Alitas de pollo	1	Nd
Arrachera	1	Nd
Carne para hamburguesa	1	Nd

Nd= No determinado

La presencia de aflatoxinas en productos cárnicos ha sido informada por diversos autores, por ejemplo Markov *et al.* (2013) realizaron un estudio en noventa productos cárnicos (salchichas, productos secos) evaluando tres micotoxinas: aflatoxinas, ocratoxina y citrinina, las dos primeras por ELISA y la última por HPLC, los resultados arrojaron presencia de aflatoxinas en el 10 % de las muestras analizadas, con una media de concentración de 3.0 µg/kg, sin embargo, la mayor incidencia en las muestras fue de ocratoxina con un 64.44 %. Resultados similares en relación con la abundancia de ocratoxina y aflatoxina fue reportada en un estudio donde se analizaron 410 muestras: jamones (n=105), salchichas fermentadas secas (n=208), tocino (n=62) y salchichas cocidas (n=35) (Pleadin *et al.*, 2015).

La presencia de micotoxinas en los productos cárnicos puede ocurrir en diferentes puntos de la cadena, en el campo, donde el animal está expuesto a alimentos contaminados (Bailly y Guerre, 2009), durante la elaboración del producto, empleando especias o mezclas de especias contaminadas o durante el almacenamiento final (Abd-Elghany y Sallam, 2015). Durante la maduración de los jamones curados, un estudio realizado en España evaluó el efecto de la temperatura y la actividad del agua en el crecimiento fúngico y producción de aflatoxinas, donde una actividad de agua mayor de 0.9 y una temperatura mayor a 15 °C producen aflatoxinas (Peromingo *et al.*, 2016).

A diferencia de las especias, para las que existen límites máximos permisibles para aflatoxinas, en productos cárnicos no existen regulaciones al respecto, sólo en Italia, el Ministerio de Salud ha recomendado, desde 1999, el valor máximo de 1 µg/kg de ocratoxina A en carne o productos cárnicos (Montanha *et al.*, 2018), considerando que ésta aparece con mayor frecuencia y en concentraciones de 1-10 µg/kg, mientras las aflatoxinas aparecen por debajo de 1 µg/kg (Pleadin *et al.*, 2015).

Los resultados de este trabajo coinciden con los informados internacionalmente, donde la incidencia de aflatoxinas en las muestras de productos cárnicos fue baja, al igual que su concentración, que fue menor de 1 µg/kg.

En la Figura 2 se muestran los resultados de las concentraciones de aflatoxinas totales para las mezclas de especias que se emplean en la elaboración de productos cárnicos, el 75 % de las muestras resultaron positivas.

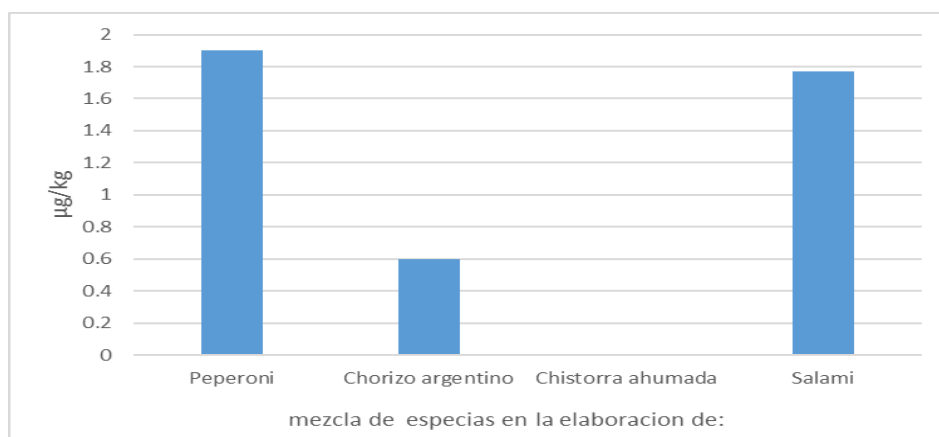


Figura 2. Aflatoxinas totales en mezclas de especias para elaboración de productos cárnicos.

Algunos estudios realizados en Qatar y Turquía, en mezclas de especias procedentes de mercados, reportan AT en un intervalo de 0.16 a 5.12 µg/kg y 0.1-0.9 µg/kg respectivamente (Abdulkadar *et al.*, 2004; Cavus *et al.*, 2018). Estos resultados están en el mismo orden que lo encontrado en este trabajo. Son resultados esperados si se considera que en la composición de las mezclas se presentan especias como el pimentón, que es una de las especias más susceptibles a la contaminación (Shundo *et al.*, 2009). En el caso de la mezcla de especias para chistorra, dio resultado negativo a la

presencia de aflatoxinas y en la mezcla está presente el pimentón, pudiendo ser contradictorio el resultado, sin embargo, dentro de dicha mezcla también está presente el ajo, que se ha demostrado que es un inhibidor de la contaminación fúngica y de la síntesis de aflatoxinas (Thanaboripat *et al.*, 1997), por lo que puede inferirse que no existió un crecimiento fúngico ni producción de toxinas.

Al igual que en las especies e ingredientes, los valores encontrados no sobrepasan el límite permisible de la UE por lo que su empleo en la formulación de productos cárnicos no constituye un riesgo para la salud pública (UE, 2010).

5.2 Determinación de aflatoxina B₁ por el método de HPLC

5.2.1 Establecimiento de los parámetros de desempeño para la determinación de aflatoxina B₁ en mezclas de especias por HPLC

En la Figura 3 se muestra el perfil cromatográfico de una mezcla de especias, adicionada y sin adicionar, además del blanco de reactivo y el estándar de aflatoxina B₁ lo que corrobora la selectividad y especificidad del método para identificar aflatoxina B₁.

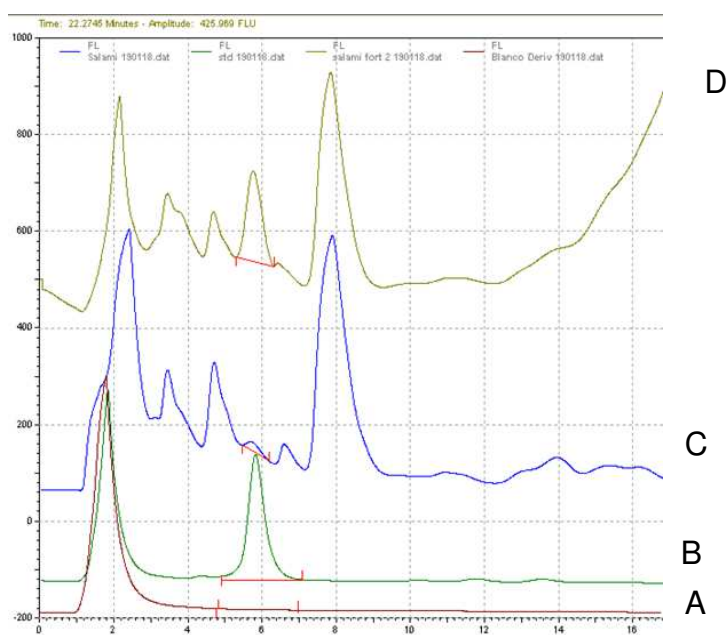


Figura 3. Resultado de la especificidad del método para la determinación de aflatoxina B₁ en muestras de mezclas de especias.

(A. Corresponde al blanco de reactivo, B. al estándar (AFB₁ 1 µg/kg), C. a la muestra y D. a la muestra adicionada (1 µg/kg)).

En la Figura 4 se muestran los resultados de la linealidad para aflatoxina B₁ en un intervalo de 0.048 a 3.125 µg/kg, mostrando un coeficiente de correlación de 0.9951.

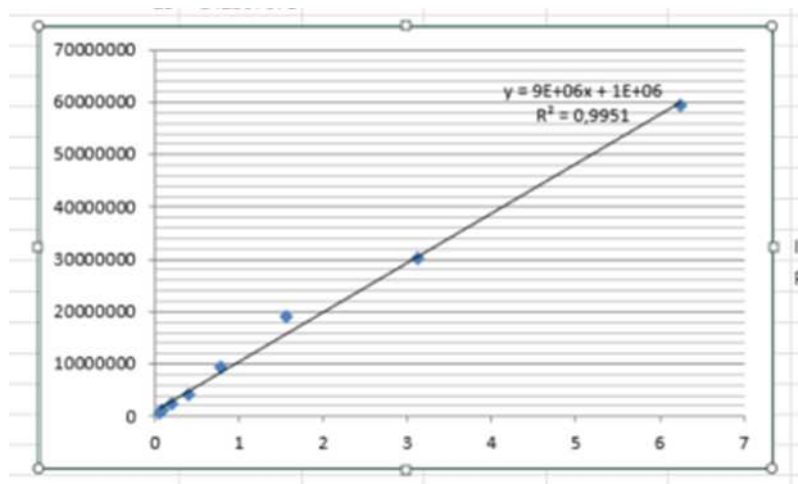


Figura 4. Resultados de la linealidad de aflatoxina B₁ por HPLC empleando detector de fluorescencia (365 nm de excitación y 420 nm de emisión)

Los parámetros LOD y LOQ se calcularon en 0.23 y 0.44 µg/kg respectivamente. Respecto al porcentaje de recuperación, para cada mezcla de especias se muestra en el Cuadro 6 donde oscila entre 75 y 108.51 %.

Cuadro 6. Porcentajes de recuperación de aflatoxina B₁ en diferentes mezclas de especias para productos cárnicos.

Muestra de mezcla de especias	% de recuperación
Salami	88.45 – 101.67
Peperoni	86.37 – 105.57
Chorizo argentino	75 – 78.80
Chistorra	95.08
Marinador	108.51
Longaniza	87

Los valores obtenidos en relación con la selectividad, linealidad, límite de detección y cuantificación, así como recobrados, están en conformidad con las instrucciones de la Unión Europea en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados. Estudios en los que se emplea HPLC para la detección de aflatoxina B₁ en especias y mezclas de especias presentan LOD y LOQ menores que los obtenidos en este trabajo en intervalos que oscilan para LOD entre 0.006 y 0.05 µg/kg y el LOQ entre 0.025 y 0.15 (Iqbal *et al.*, 2013; O’Riordan *et al.*, 2008; Cavus *et al.*, 2018), esto porque a pesar de que emplea detección fluorescente, los modelos de equipos son diferentes, las columnas empleadas son de diferentes marcas y los métodos de derivatización (postcolumnna) presentan variaciones. Sin embargo, esto no resta importancia a los resultados obtenidos en este trabajo porque permite detectar las concentraciones por debajo de los valores máximos establecidos para

este tipo de muestra, que son 5 y 10 µg/kg para aflatoxina B₁ y aflatoxinas totales, respectivamente (UE, 2010).

5.2.2 Determinación de aflatoxinas totales por HPLC

El 62.5 % de un total de 40 muestras analizadas para la presencia de aflatoxina B₁ por HPLC fueron positivas en un intervalo de concentraciones entre 0.44 y 1.65 µg/kg, la media de las concentraciones fue de 0.86±0.37 µg/kg (Cuadro 7). El 20 % de las muestras analizadas se encontraron en concentraciones de AFB₁ por debajo del límite de cuantificación y el 17.5 % restante debajo del límite de detección

Cuadro 7. Contaminación por aflatoxina B₁ en mezclas de especias usadas en diferentes productos cárnicos por el método de HPLC

Muestra de mezcla de especias	No. de muestras analizadas	% de muestras positivas a AFB ₁	Media de contaminación µg/kg	Intervalo de contaminación µg/kg
Salami	8	50	0.53	0.44 – 0.65
Peperoni	7	71	0.73	0.67 – 0.85
Chorizo argentino	7	85	0.93	0.62 – 1.64
Chistorra	9	77	0.88	0.44 – 1.66
Marinador	3	40	0.54	0.46 – 0.61
Longaniza	6	50	1.52	1.46 – 1.65

Además, como puede observarse en la Figura 5, los niveles de concentración de AFB1 que se determinaron en las muestras analizadas no sobrepasan el límite máximo permisible de la Unión Europea para AFB1 en especias, que es de 5 µg/kg (UE 2010).

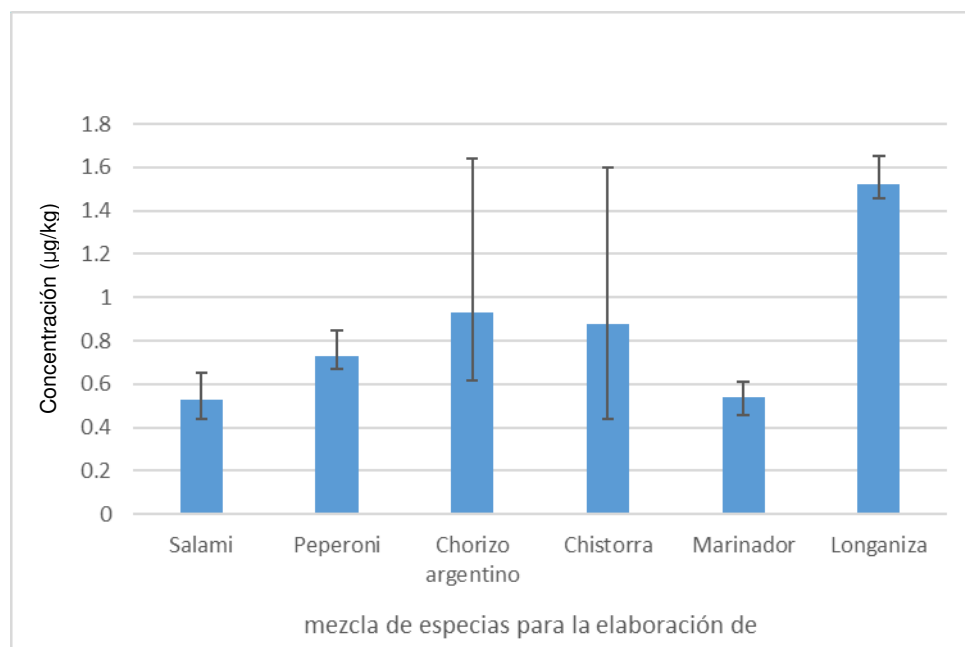


Figura 5. Concentraciones de aflatoxina B₁ en mezclas de especias para la formulación de productos cárnicos.

Los resultados obtenidos en esta investigación son similares a los informados por diversos autores, en donde la mayoría de las muestras presentaron AFB1 en niveles por debajo del límite máximo

permisible (5 µg/kg) (Fazekas *et al.*, 2005; O’Riordan y Wilkinson, 2008; Ozbey y Kabak, 2012).

Para el caso de la mezcla de especias para salami, el intervalo de concentración de AFB1 fue de 0.44 a 0.55 µg/kg, la etiqueta no mostraba los ingredientes de la formulación, pero las especias comúnmente utilizadas son: pimienta, ajo y canela. En un estudio, O’Riordan y Wilkinson (2008) analizaron muestras de especias, entre ellas pimienta y canela. Analizaron 30 muestras de pimienta y encontraron AFB1 en el 13 % con una concentración de 2.19 ± 1.23 , en las siete muestras de canela que analizaron no detectaron muestras positivas, al igual que Ozbey y Kabak (2012). De acuerdo con un estudio realizado por Chalfoun *et al.* (2004), quienes analizaron el efecto de algunas especias en la inhibición de la producción de aflatoxinas, determinaron que la canela la inhibió completamente, esto puede explicar que las concentraciones de aflatoxina B₁ son bajas en este estudio debido a la inhibición que provoca la canela.

Para la mezcla de especias para peperoni que contiene pimentón español, anís y pimienta blanca, en este trabajo el 71 % de muestras fueron positivas a AFB1 con un promedio de concentración de 0.73 µg/kg; en un estudio, O’Riordan y Wilkinson (2008) obtuvieron 25 % de muestras de pimentón positivas a AFB1 con una concentración de 9.85 ± 8.65 µg/kg. Respecto al anís, Tosun y Arslan (2013) obtuvieron

6 % de muestras positivas a AFB1 en concentraciones de 4.9 a 8.4 µg/kg, por otro lado, Chalfoun *et al.* (2004) mencionan que el anís tiene la capacidad de inhibir el desarrollo del micelio de hongos productores de aflatoxinas, lo que podría dar respuesta a las bajas concentraciones encontradas en la mezcla de especias para la formulación de peperoni.

En cuanto a la mezcla de especias para chistorra resultaron positivas el 77 % de las muestras analizadas, en un intervalo de 0.44 a 1.66 µg/kg. Dicha mezcla contiene harina de maíz, pimentón y ajo. A pesar de que el ajo tiene la capacidad para inhibir el crecimiento micelial y la esporulación de hongos productores de aflatoxina, los resultados pueden ser variables, aunque es importante resaltar que se ha encontrado una correlación positiva entre la concentración del ajo y la tendencia al aumento de la inhibición (Chalfoun *et al.*, 2004). En un estudio realizado por Majeed *et al.* (2013), se analizaron 68 muestras de arroz, 105 de maíz y 102 de maíz procesado (harina y pan), colectadas al azar de mercados minoristas e industrias locales de las divisiones de Faisalabad, Sahiwal y Gujranwala de Punjab, Pakistán, durante junio de 2011 a febrero de 2012. El arroz tuvo 55 % de muestras positivas a AFB1, el maíz 35 % y los productos de maíz 42 %; la media de concentración de AFB1 en arroz, maíz y productos de maíz, fue de 8.23, 7.90 y 5.47 µg/kg, respectivamente. Esto denota que el maíz procesado presenta concentraciones menores de AFB1

que el maíz sin procesar, aunque presenta mayor incidencia. Los resultados coinciden con los resultados de alta incidencia y baja concentración de esta mezcla que contiene harina de maíz entre sus ingredientes principales.

Respecto a la mezcla de especias para chorizo argentino que contiene nuez moscada, pimentón, pimienta negra y ajo, el 85 % de las muestras analizadas fueron positivas, en un intervalo de 0.62 a 1.64 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Ozbey y Kabak (2012) analizaron veintitrés muestras de pimienta negra, determinando AFB1 en siete de ellas, en concentraciones de 0.13 a 0.42 $\mu\text{g}/\text{kg}$; Tosun y Arslan (2013) obtuvieron 7 % de muestras positivas a AFB1, en concentraciones de 3.5 a 30.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en pimienta negra, Zahra *et al.* (2018), de igual manera, tuvieron resultados positivos en un 18 %, en concentraciones de 47.68 a 75.78 $\mu\text{g}/\text{kg}$. De acuerdo con un estudio realizado en Lisboa, Portugal, en el que se analizaron diez muestras de nuez moscada para estimar la concentración de aflatoxinas mediante HPLC, se detectó AFB1 en ocho de ellas, en tres las concentraciones oscilaron entre 1 y 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, en otras tres los valores oscilaron entre 6 y 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y se detectaron dos más con concentraciones de 54 y 58 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Estos resultados muestran que la nuez moscada tiene una alta incidencia de AFB1 y puede llegar a presentar concentraciones altas de la misma, aunque esto es variable. Además, como se mencionó anteriormente, las heridas en las capas protectoras de las nueces

proporcionan vías de infección por esporas de hongos aflatoxigénicos transportadas por el viento, lo que aumenta la probabilidad de que los cultivos sean contaminados con éstas, lo que puede provocar la infección posterior con aflatoxinas si no se garantizan las condiciones adecuadas de manejo y durante el almacenamiento (Rodrigues *et al.*, 2012).

Respecto a las muestras de mezcla de especias para longaniza analizadas, se encontró un 50 % de muestras positivas a AFB1 en un promedio de concentración de 1.52 µg/kg. Las especias utilizadas con frecuencia para su formulación son chiles, laurel, ajo, cebolla y pimienta negra; Sahar *et al.* (2009) analizaron muestras de chile en polvo de las que obtuvieron resultados positivos para AFB1, al igual que O’Riordan y Wilkinson (2008), quienes encontraron 33 % de muestras de chile positivas a AFB1 con concentración media de 9.05±8.67 µg/kg; De acuerdo con Ozbey y Kabak, (2012), el chile es altamente susceptible a la contaminación por hongos y la formación de micotoxinas posteriormente, debido a su ambiente (alta humedad y alta temperatura) y las condiciones de procesamiento.

Tosun y Arslan (2013) obtuvieron dos muestras positivas a AFB1 de veintinueve muestras de hojas de laurel analizadas, con concentraciones de 16.5 y 20.3 µg/kg. Por otro lado, Akpo-Djènontin *et al.* (2018) analizaron muestras de laurel seco, obteniendo resultados inferiores al límite de cuantificación respecto a la

concentración de AFB₁; y como se ha mencionado antes, el ajo y la cebolla tienen un efecto en la inhibición de la AFB₁, lo que da una explicación a la baja concentración que presenta la mezcla de especias para la formulación de longaniza.

Las muestras de mezclas de especias para marinador analizadas arrojaron 40 % de positivas a AFB₁, en un intervalo de 0.46 a 0.61 µg/kg. Dicha mezcla es elaborada con ajo, pimienta, cebolla y chile rojo; como se discutió anteriormente, la cebolla y el ajo tienen la capacidad para inhibir la producción de AFB₁, por otro lado, muestras de chile rojo han sido reportadas como positivas a AFB₁ hasta en concentraciones de 89.20 µg/kg (Ozbey y Kabak, 2012; Zahra *et al.*, 2018) Similar a esta mezcla de especias, Ali *et al.* (2015) analizaron muestras de mezclas de especias para marinado de carnes, encontrando resultados positivos a AFB₁ en el 84 % de las muestras, en un intervalo de concentración de 0.03 a 4.38 µg/kg, con un promedio de concentración de 1.64. Ambos resultados son inferiores al límite máximo permisible establecido por la Unión Europea.

5.3 Valoración integral y aportes de los resultados

De acuerdo con la revisión documental, en México no existe regulación para micotoxinas en especias y mezclas de especias, este trabajo podría ser el primero que detecta la presencia de aflatoxina B₁ y aflatoxinas totales en estas matrices y en productos cárnicos que usan las mismas en su formulación. Aunque en Europa y Asia hay

registros desde el inicio del milenio (Reddy *et al.*, 2001; Ardic *et al.*, 2008; Cho *et al.*, 2008; O’Riordan y Wilkinson, 2008; Sahar *et al.*, 2009; Khayoon *et al.*, 2012; Ozbey y Kabak, 2012; Tosun y Arslan, 2013; Hammami *et al.*, 2014; Ali *et al.*, 2015; Asghar *et al.*, 2016; Gojković *et al.*, 2017; Zahra *et al.*, 2018). Los resultados obtenidos en este trabajo alertan a los organismos reguladores de la necesidad de ampliar las regulaciones a otros tipos de matrices si se considera el impacto negativo que presentan las aflatoxinas a la salud pública.

Las metodologías empleadas son adecuadas para el análisis de AFB1 y AT, están acorde con otros estudios que emplean sistemas inmunoenzimáticos (ELISA) y de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), además que permite detectar la aflatoxina por debajo del LMP establecido por el Codex Alimentarius y la Unión Europea. Por otra parte, los métodos usados en este trabajo constituyen herramientas necesarias para laboratorios de control de calidad donde se puede emplear el sistema de ELISA como un método de detección eficaz cuando se trata de la determinación de micotoxinas en especias y productos cárnicos obteniendo resultados semicuantitativos de manera rápida y a un costo inferior a los procesos cromatográficos especializados, como es referido por otros autores (Matrella *et al.*, 2006; Markov *et al.*, 2013) y altamente correlacionado con los resultados del método HPLC-FD (Pleadin *et al.*, 2015). El método de HPLC, con un costo superior debido al

empleo de columnas, solventes y mantenimiento de los equipos, puede ser empleado como método confirmativo.

Aunque las concentraciones resultantes en este estudio para especias y productos cárnicos fueron menores a los niveles máximos establecidos por el Codex Alimentarius para la aflatoxina B₁ y AT y no constituyen un problema de salud pública en las muestras analizadas, no se puede desatender, ya que como se mencionó anteriormente, la AFB₁ es un potente carcinogénico (Ozbey y Kabak, 2012) y la exposición a concentraciones bajas y de manera constante puede constituir un riesgo al consumidor (Ali *et al.*, 2015), de aquí la necesidad de poder extender estos análisis a la cadena productiva de las especias de mayor consumo en México que presentan la mayor prevalencia de aflatoxinas, como fueron los chiles y el pimentón, seguida de las mezclas de especias que se emplean en productos de alto consumo como la longaniza, de tal forma que permitan identificar los peligros y establecer programas de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (HAPPC) que disminuyan el impacto de las micotoxinas en la elaboración de productos cárnicos.

6. Conclusiones

1. Se establecen dos metodologías analíticas (ELISA y HPLC-FD) para la determinación de aflatoxinas totales y aflatoxina B₁ en especias, mezclas de especias y productos cárnicos en conformidad con los lineamientos de la Comisión Europea en cuanto al funcionamiento e interpretación de los resultados.
2. Se documenta por primera vez en México la presencia de aflatoxinas en especias y mezclas de especias para la formulación de productos cárnicos en concentraciones inferiores al límite máximo permisible establecido por la Unión Europea.
3. Las especias de mayor prevalencia a la aflatoxina B₁ son los chiles y pimentón de alto consumo en la población mexicana.

7. Recomendaciones

1. Ampliar el estudio de aflatoxinas totales en especias y mezclas de ellas en toda la cadena productiva y en la elaboración de productos cárnicos, que permita establecer un HACCP que contribuya a garantizar la inocuidad alimentaria, de forma lógica y objetiva.
2. Ampliar el análisis a otras micotoxinas con énfasis en ocratoxina A, de mayor prevalencia en estudios internacionales.
3. Informar a los organismos reguladores que amplíen las regulaciones de aflatoxinas a otras matrices como son las especias y mezclas de especies en correspondencia con las legislaciones internacionales como son el Codex Alimentarius y la Unión Europea.

8. Referencias

- Abarca, L., Bragulat, M. R., Accensi, F. y Cabañes, F. J. (2000). Hongos productores de micotoxinas emergentes. *Revista Iberoamericana de Micología* 17(1):63-68.
- Abd-Elghany, S. M. y Sallam, K. I. (2015). Rapid determination of total aflatoxins and ochratoxins A in meat products by immuno-affinity fluorimetry. *Food Chemistry* 179(1):253-256.
- Abdulkadar, A., Al-Ali, A., Al-Kildi, A. y Al-Jedah, J. (2004). Mycotoxins in food products available in Qatar. *Food Control* 15(7):543-548.
- Agyekum, M. y Jolly, C. M. (2017). Peanut trade and aflatoxin standards in Europe: Economic effects on trading countries. *Journal of Policy Modeling* 39(1):114-128.
- Akpo-Djènantin, D. O. O., Gbaguidi, F., Soumanou, M. M. y Anihouvi, V. B. (2018). Mold infestation and aflatoxins production in traditionally processed spices and aromatic herbs powder mostly used in West Africa. *Food Science & Nutrition* 6(1):541-548.
- Ali, N., Hashim, N. H. y Shuib, N. S. (2015). Natural occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in processed spices marketed in Malaysia. *Food Additives & Contaminants: Part A* 32(4):518-532.

Alizadeh, A. M., Rohandel, G., Roubarmohammadi, S., Roubary, M., Sohanaki, H., Ghiasian, S. A., Taherkhani, A., Semnani, S. y Aghasi, M. (2012). Fumonisin B1, contamination of cereals and risk of esophageal cancer in a high risk area in northeastern Iran. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 13(6):2625-2628.

Alvarado-Hernández, J. R., Carvajal-Moreno, M., Rojo-Callejas, F. y Ruiz-Velasco, S. (2016). Aflatoxins in natural peanuts (*Arachis hypogaea* L.) of Mexico: Validation of the biochemical methods for extraction and quantification. *Journal of Plant Biochemistry & Physiology* 4(1):1000168.

Álvarez Bañuelos, M. T., Carvajal Moreno, M., Ruisánchez Peón, N. y Rojo, F. (2000). Aduetos-ADN-aflatoxina como biomarcadores de exposición en grupos de riesgo de cáncer de hígado. *Revista Cubana de Oncología* 16(1):35-39.

Aly, S. E. (2002). Distribution of aflatoxins in product and by-products during glucose production from contaminated corn. *Food/Nahrung* 46(5):341-344.

Amare, M. G. y Keller, N. P. (2014). Molecular mechanisms of *Aspergillus flavus* secondary metabolism and development. *Fungal Genetics and Biology* 66(1):11-18.

Ardic, M., Karakaya, Y., Atasever, M. y Durmaz, H. (2008). Determination of aflatoxin B₁ levels in deep-red ground pepper (isot)

using immunoaffinity column combined with ELISA. *Food and Chemical Toxicology* 46(1):1596-1599.

Arowora, K. A., Abiodun, A. A., Adetunji, C. O.; Sanu, F. T.; Afolayan, S. S. y Ogundele, B. A. (2012). Levels of aflatoxins in some agricultural commodities sold at Baboko Market in Ilorin, Nigeria. *Global Journal of Science Frontier Research* 12(10):31-33.

Arroyo-Manzanares, N., Huertas-Pérez, J. F., García-Campaña, A. M. y Gámiz-García, L. (2015). Aflatoxins in animal feeds: A straightforward and cost-effective analytical method. *Food Control* 54(1):74-78.

Asghar, M. A., Zahir, E., Rantilal, S., Ahmed, A., e Iqbal, J. (2016). Aflatoxins in composite spices collected from local markets of Karachi, Pakistan. *Food Additives & Contaminants: Part A* 9(2):113-119.

Azziz-Baumgartner, E., Lindblade, K., Gieseke, K., Rogers, H. S., Kieszak, S., Njapau, H., Schleicher, R., McCoy, L. F., Misore, A., DeCock, K., Rubin, C., Slutsker, L. y the Aflatoxin Investigative Group (2005). Case-control study of an acute aflatoxicosis outbreak, Kenya, 2004. *Environmental Health Perspectives* 113(12):1779-1783.

Bailly, J. y Guerre, P. (2009). Mycotoxins in meat and processed meat products. *En: Safety of Meat and Processed Meat*. Pp. 83-124.

Bilgrami, K. S., Sinha, K. K. y Sinha, A. K. (1992). Inhibition of aflatoxin production & growth of *Aspergillus flavus* by eugenol & onion

& garlic extracts. *The Indian Journal of Medical Research* 96(1):171-175.

Caloni, F. y Cortinovis, C. (2011). Toxicological effects of aflatoxins in horses. *The Veterinary Journal* 188(3):270-273.

Carvajal, M. (2013). Transformación de la aflatoxina B₁ de alimentos, en el cancerígeno humano, aducto AFB₁-ADN. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas* 16(2):109-120.

Cavus, S., Tornuk, F., Sarioglu, K. y Yetim, H. (2018). Determination of mold contamination and aflatoxin levels of the meat products/ingredients collected from Turkey market. *Journal of Food Safety* 38(5):e12494.

Chalfoun, S. M., Pereira, M. C., Resende, M. L. V., Angélico, C. L. y Silva, R. A. (2004). Effect of powdered spice treatments on mycelial growth, sporulation and production of aflatoxins by toxigenic fungi. *Ciência e Agrotecnologia* 28(4):856-862.

Cho, S. H., Lee, C. H., Jang, M. R., Son, Y. W., Lee S. M., Choi, I. S., Kim, S. H. y Kim, D. B. K. (2008). Aflatoxins contamination in spices and processed spice products commercialized in Korea. *Food Chemistry* 107(1):1283-1288.

Comité del Codex sobre contaminantes de los alimentos (2017). Documento de debate sobre los niveles máximos para las micotoxinas en las especias. Comisión del Codex Alimentarius.

Disponible en: http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FMeetings%252FCX-735-11%252FWD%252Fcf11_11s.pdf Consultado: 13 de junio, 2019.

Consejo Mexicano de Carne (2018). Compendio estadístico 2018. Disponible en: <https://comecarne.org/wp-content/uploads/2019/04/Compendio-Estadi%CC%81stico-2018-VF.pdf> Consultado: 4 de septiembre, 2019.

De Ruyck, K., De Boevre, M., Huybrechts, I. y De Saeger, S. (2015). Dietary mycotoxins, co-exposure, and carcinogenesis in humans: Short review. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 766(1):32-41.

Dhanasekaran, D., Shanmugapriya, S., Thajuddin, N. y Panneerselvam, A. (2011). Aflatoxins and aflatoxicosis in human and animals. *En: Aflatoxins, biochemistry and molecular biology*. Pp. 221-255.

Dohnal, V., Wu, Q. y Kuča, K. (2014). Metabolism of aflatoxins: key enzymes and interindividual as well as interspecies differences. *Archives of Toxicology* 88(1):1635-1644.

Duarte-Vogel, S. y Villamil-Jiménez, L. C. (2006). Micotoxinas en la salud pública. *Revista de Salud Pública* 8(1):129-135.

FAO. 2004. Reglamentos a nivel mundial para las micotoxinas en los alimentos y en las raciones en el año 2003. Disponible en: <http://www.fao.org/3/a-y5499s.pdf> Consultado: 21 de enero, 2016.

FAO. 2014. Carne y productos cárnicos. Disponible en: <http://www.fao.org/ag/againfo/themes/es/meat/home.html> Consultado: 25 de agosto, 2017.

Fazekas, B., Tar, A. y Kovács M. (2005) Aflatoxin and ochratoxin A content of spices in Hungary. *Food Additives and Contaminants* 22(1):856–863.

Ferrís i Tortajada, J., Ortega García, J. A., Garcia i Castell, J., López Andreu, J. A., Ribes Koninckx, C. y Berbel Tornero, O. (2008). Factores de riesgo para los tumores hepáticos malignos pediátricos. *Anales de Pediatría* 68(4):377–384.

Flores Ortíz, C. M., Hernández Portilla, L. B. y Vázquez Medrano, J. (2006). Contaminación con micotoxinas en alimento balanceado y granos de uso pecuario en México en el año 2003. *Técnicas Pecuarias en México* 44(2):247-256.

Gimeno, A. (2004). Aflatoxina M1 no leite. Riscos para a saúde pública, prevenção e controlo. *Alimentação Animal* 49(1):32-44.

Gojković, V. S., Grujić, R. D., Ivanović, M. M., Marjanović-Balaban, Z. R., Vujadinović, D. P. y Vukić, M. S. (2017). The frequency of

presence of aflatoxin B₁ in foodstuffs of vegetable origin 133(1):29–36.

Gomes, M. A., Priolli, D. G., Tralhão, J. G. y Botelho, M. F. (2013). Carnicoma hepatocelular: epidemiologia, biología, diagnóstico e terapias. *Revista da Associação Médica Brasileira* 59(5):514-524.

Gouas, D. A., Villar, S., Ortiz-Cuaran, S., Legros, P., Ferro, G., Kirk, G. D., Lesi, O. A., Mendy, M., Bah, E., Friesen, M. D., Groopman, J., Chemin, I. y Hainaut, P. (2012). *TP53 R249S* mutation, genetic variations in *HBX* and risk of hepatocellular carcinoma in The Gambia. *Carcinogenesis* 33(6):1219-1224.

Guzmán de Peña, D. (2007). La exposición a la aflatoxina B₁ en animales de laboratorio y su significado en la salud pública. *Salud Pública de México* 49(3):227–236.

Hammami, W., Fiori, S., Thani, R. A., Kali, N. A., Balmas, V., Migheli, Q., y Jaoua, S. (2014). Fungal and aflatoxin contamination of marketed spices. *Food Control* 37(1):177-181.

Hernández Hierro, J., Garcia Villanova, R., Rodríguez Torrero, P. y Toruño Fonseca, I. M. (2008). Aflatoxins and ochratoxin A in red paprika for retail sale in Spain: occurrence and evaluation of a simultaneous analytical method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56(3):751-756.

Herzallah, S. M. (2009). Determination of aflatoxins in eggs, milk, meat and meat products using HPLC fluorescent and UV detectors. *Food Chemistry* 114(3):1141-1146.

Infoalimenta (2019) Carnes y elaborados cárnicos. Disponible en: http://www.infoalimenta.com/biblioteca-alimentos/62/67/elaborados-carnicos/detail_templateSample/ Consultado: 4 de septiembre, 2019.

INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria), s/a. Disponible en: <http://inta.gob.ar/proyectos/PNCYO-1127023> Consultado: 7 de septiembre, 2017.

Iqbal, S. Z., Asi, M. R., Zuber, M., Akhtar, J. y Jawwad, M. S. (2013). Natural occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in comercial chilli and chilli sauce samples. *Food Control* 30(2):621-625.

Iqbal, S. Z., Nisar, S., Asi, M. R. y Jinap, S. (2014). Natural incidence of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in chicken meat and eggs. *Food Control* 43(1):98-103.

Jakić-Dimić, D., Nešić, K. y Petrović, M. (2009). Contamination of cereals with aflatoxins, metabolites of fungi *Aspergillus flavus*. *Biotechnology in Animal Husbandry* 25(5-6):1203-1208.

Kensler, T. W., Roebuck, B. D., Wogan, G. N. y Groopman, J. D. (2010). Aflatoxin: a 50-year odyssey of mechanistic and translational toxicology. *Toxicological Sciences* 120(1):28-48.

Khayoon, W. S., Saad, B., Lee, T. P. y Salleh, B. (2012). High performance liquid chromatographic determination of aflatoxins in chilli, peanut and rice using silica based monolithic column. *Food Chemistry* 133(1):489-496.

Köppen, R., Koch, M., Siegel, D., Merkel, S., Maul, R. y Nehls, I. (2010). Determination of mycotoxins in foods: current state of analytical methods and limitations. *Applied Microbiology & Biotechnology* 86(6):1595-1612.

Liu, Y. y Wu, F. (2010). Global burden of aflatoxin-induced hepatocellular carcinoma: a risk assessment. *Environmental Health Perspectives* 118(6):818-824.

Lovelace, C. E. y Aalbersberg, W. G. (1989). Aflatoxin levels in foodstuffs in Fiji and Tonga islands. *Plant Foods for Human Nutrition* 39(4):393-399.

Majeed, S., Iqbal, M., Asi, M. R. e Iqbal, S. Z. (2013). Aflatoxins and ochratoxin A contamination in rice, corn and corn products from Punjab, Pakistan. *Journal of Cereal Science* 58(1):446-450.

Markov, K., Pleadin, J., Bevardi, M., Vahčić, N., Sokolić-Mihalak, D. y Frece, J. (2013). Natural occurrence of aflatoxin B₁, ochratoxin A and citrinin in Croatian fermented meat products. *Food Control* 34(1):312-317.

Martínez Padrón, H. Y., Hernández Delgado, S., Reyes Méndez, C. A. y Vázquez Carrillo, G. (2013). El género *Aspergillus* y sus micotoxinas en maíz en México: problemática y perspectivas. *Revista Mexicana de Fitopatología* 31(2):126-146.

Matrella, R., Monaci, L., Milillo, M. A., Palmisano, F. y Tantillo, M. G. (2006). Ochratoxin A determination in paired kidneys and muscle samples from swines slaughtered in southern Italy. *Food Control* 17(1):114 -117.

Méndez-Albores, A. y Moreno-Martínez, E. (2009). Las micotoxinas: contaminantes naturales de los alimentos. *Ciencia Pp.* 1-7. Disponible en:

<https://www.revistaciencia.amc.edu.mx/online/AlboresMicotoxinas.pdf>

Miller. Comunicación personal. Citado por: FAO (s/a). Manual sobre la aplicación del sistema de Análisis de Peligros y de Puntos Críticos de Control (APPCC) en la prevención y control de las micotoxinas. Disponible en: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/005/y1390S/y1390S00.pdf>
Consultado: 20 de diciembre, 2015.

Montanha, F. P., Anater, A., Burchard, J. F., Luciano, F. B., Meca, G., Manyes, L. y Pimpao, C. T. (2018). Mycotoxins in dry-cured meats: A review. *Food and Chemical Toxicology* 111(1):494-502.

Murcia Rodríguez, H. W. (2010) Micotoxinas y aflatoxina B₁, un problema en salud animal. *Teoría y praxis investigativa* 5(2):71-78.

O’Riordan, M. J. y Wilkinson, M. G. (2008). A survey of the incidence and level of aflatoxin contamination in a range of imported spice preparations on the Irish retail market. *Food Chemistry* 107(1):1429–1435.

Organización Mundial de la Salud. (2018) Cáncer. Datos y cifras. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer> Consultado: 20 de diciembre, 2018.

Ornelas-Aguirre, J. M. y Fimbres-Morales, A. (2015). Aflatoxinas y su asociación con el desarrollo de carcinoma hepatocelular. *Revista Ciencia e Investigación Médica Estudiantil Latinoamericana* 20(1):1-7.

Ortega Beltran, A., Jaime, R. y Cotty, P. J. (2015). Aflatoxin-producing fungi in maize field soils from sea level to over 2000 masl: A three year study in Sonora, Mexico. *Fungal Biology* 119(4):191-200.

Ostadrahimi, A., Ashrafnejad, F., Kazemi, A., Sargheini, N., Mahdavi, R., Farshchian, M. y Mahluji, S. (2014). Aflatoxin in raw and salt-roasted nuts (pistachios, peanuts and walnuts) sold in markets of Tabriz, Iran. *Jundishapur Journal of Microbiology* 7(1):e8674.

Ozbey, F. y Kabak, B. (2012). Natural co-occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in spices. *Food Control* 28(1):354-361.

Peña Betancourt, S. D., Carmona Madero, M. Á. y Valladares Carmona, B. (2013). Comparación de calidad física, contenido de

fenoles y aflatoxinas en maíces híbridos y nativos. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 4(5):779-788.

Peromingo, B., Rodríguez, A., Bernáldez, V., Delgado, J. y Rodríguez, M. (2016). Effect of temperature and water activity on growth and aflatoxin production by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* on cured meat model systems. *Meat Science* 122(1):76-83.

Pleadin, J., Satver, M. M., Vahčić, N., Kovačević, D., Milone, S., Saftić, L. y Scortichini, G. (2015). Survey of aflatoxin B₁ and ochratoxin A occurrence in traditional meat products coming from Croatian households and markets. *Food Control* 52(1):71-77.

Quattrocchi, O. A., Abelaraira de Andrizzi, S. I. y Laba, F. R. (1992). Introducción a la HPLC. Aplicación y Práctica. Pp. 407.

Reddy, S. V., Mayi, D. K., Reddy, M. U., Thirumala-Devi, K. y Reddy, D. V. R. (2001). Aflatoxins B₁ in different grades of chillies (*Capsicum annum L.*) in India as determined by indirect competitive-ELISA. *Food Additives and Contaminants* 18(6):553-558.

Refai, M. K., Niazi, Z. M., Aziz, N. H. y Khafaga, N. E. M. (2003). Incidence of aflatoxin B₁ in the Egyptian cured meat basterma and control by γ -irradiation. *Food/Nahrung* 47(6):377-382.

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

Rojas Contreras, O. L. y Wilches Flores Á. M. (2009). Determinación de aflatoxinas en alimentos de mayor consumo infantil comercializados en la ciudad de Pamplona, norte de Santander. *Bistua: Revista de la Facultad de Ciencias Básicas* 7(1):1-12.

Rossi, C. N., Takabayashi, C. R., Ono, M. A., Saito, G. H., Itano, E. N., Kawamura, O., Hirooka, E. Y., y Ono, E. Y. S. (2012). Immunoassay based on monoclonal antibody for aflatoxin detection in poultry feed. *Food Chemistry* 132(1):2211-2216.

Roze, L. V., Chanda, A. y Linz, J. E. (2011). Compartmentalization and molecular traffic in secondary metabolism: A new understanding of established cellular processes. *Fungal Genetics and Biology* 48(1):35-48.

Sahar, N., Ahmed, M., Parveen, Z., Ilyas, A. y Bhutto, A. (2009). Screening of mycotoxins in wheat, fruits and vegetables grown in Sindh, Pakistan. *Pakistan Journal of Botany* 41(1):337-341.

Sekiyama, B. L., Ribeiro, A. B., Machinski, P. A. y Machinski Junior, M. (2005). Aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in maize-based food products. *Brazilian Journal of Microbiology* 36(3):289-294.

Shuaib, F. M. B., Ehiri, J., Abdullahi, A., Williams, J. H. y Jolly, P. E. (2010). Reproductive health effects of aflatoxins: A review of the literature. *Reproductive Toxicology* 29(1):262-270.

Shundo, L., De Almeida, A. P., Alaburda, J., Lamardo, L. C., Navas, S. A., Ruvieri, V. y Sabino, M. (2009). Aflatoxins and ochratoxin A in Brazilian paprika. *Food Control* 20(12):1099-1102.

Stoev, S. (2015). Foodborne mycotoxicoses, risk assessment and underestimated hazard of masked mycotoxins and joint mycotoxin effects or interaction. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 39(1):794-809.

Strange, R. N. (1991). Natural occurrence of mycotoxins in groundnuts, cottonseed, soya, and cassava. *Mycotoxins and Animal Foods*, 341-362.

Strosnider, H., Azziz-Baumgartner, E., Banziger, M., Bhat, R. V., Breiman, R., Brune, M. N., DeCock, K., Dilley, A., Groopman, J., Hell, K., Henry, S. H., Jeffers, D., Jolly, C., Jolly, P., Kibata, G. N., Lewis, L., Liu, X., Lubber, G., McCoy, L., Mensah, P., Miraglia, M., Misore, A., Njapau, H., Ong, C. N., Onsongo, M. T. K., Page, S. W., Park, D., Patel, M., Phillips, T., Pineiro, M., Pronczuk, J., Rogers, H. S., Rubin, C., Sabino, M., Schaafsma, A., Shephard, G., Stroka, J., Wild, C., Williams, J. T. y Wilson, D. (2006) Workgroup report: Public health strategies for reducing aflatoxin exposure in developing countries. *Environmental Health Perspectives* 114(12):1898-1903.

Swamlnathan, B. y Koehler, P. E. (1976). Isolation of an inhibitor of *Aspergillus parasiticus* from white potatoes (*Solanum tuberosum*). *Journal of Food Science* 41(2):313-319.

Tančinová, D., Mokry, M., Barboráková, Z. y Mašková, Z. (2014). Mycobiota of spices and aromatic herbs. *Potravinarstvo Scientific Journal for Food Industry* 8(1):172-177.

Thanaboripat, D., Nontabenjawan, K., Leesin, K., Teerapiannont, D., Sukcharoen, O. y Ruangrattanamatee, R. (1997). Inhibitory effect of garlic, clove and carrot on growth of *Aspergillus flavus* and aflatoxin production. *Journal of Forestry Research* 8(1):39-42.

Tosun, H. y Arslan, R. (2013). Determination of aflatoxin B₁ levels in organic spices and herbs. *The Scientific World Journal* p. 874093.

Trombete, F. M., Saldanha, T., Direito, G. M. y Fraga, M. E. (2013). Aflatoxinas y tricocentenos en trigo y derivados: incidencia de la contaminación y métodos de determinación. *Revista Chilena de Nutrición* 40(2):181-188.

Tung, T. C. y Ling, K. H. (1968). Study on aflatoxin of foodstuffs in Taiwan. *The Journal of Vitaminology* 14(1):48-52.

Unión Europea (2006) REGLAMENTO (CE) No 401/2006 DE LA COMISIÓN de 23 de febrero de 2006 por el que se establecen los métodos de muestreo y de análisis para el control oficial del contenido de micotoxinas en los productos alimenticios Disponible en:

<http://data.europa.eu/eli/reg/2006/401/oj> Consultado: 1 de octubre, 2015.

Unión Europea (2010) REGLAMENTO No. 165/2010 DE LA COMISIÓN de 26 de febrero de 2010 que modifica, en lo que respecta a las aflatoxinas, el Reglamento (CE) No. 1881/2006 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios. Disponible en: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:32010R0165&qid=1567559548605&from=EN> Consultado: 6 de septiembre, 2017.

Urrego Novoa, J. R. y Díaz, G. J. (2006). Aflatoxinas: mecanismos de toxicidad en la etiología de cáncer hepático celular. Revista de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia 54(2):108-116.

Villar, S., Le Roux-Goglin, E., Gouas, D. A., Plymoth, A., Ferro, G., Boniol, M., Lereau, M., Bah, E., Hall, A. J., Wild, C. P., Mendy, M., Norder, H., Van Der Sande, M., Whittle, H., Friesen, M. D., Groopman, J. D. y Hainaut, P. (2011). Seasonal variation in *TP53 R249S*-Mutated serum DNA with aflatoxin exposure and hepatitis B virus infection. Environmental Health Perspectives 119(11):1635-1640.

Weidenbörner, Martin. (2001). Encyclopedia of Food Mycotoxins. Pp. 294.

Wild, C. P. y Montesano, R. (2009). A model of interaction: Aflatoxins and hepatitis viruses in liver cancer aetiology and prevention. *Cancer Letters* 286(1):22-28.

Winter, G. y Pereg, L. (2019). A review on the relation between soil and mycotoxins: Effect of aflatoxin on field, food and finance. *European Journal of Soil Science* 70(4):882-897.

Wu, F., Stacy, S. L. y Kensler, T. W. (2013). Global risk assessment of aflatoxins in maize and peanuts: Are regulatory standards adequately protective? *Toxicological Sciences* 135(1):251-259.

Yuan, M. L., Lu, Z. H., Cheng, Y. Q. y Li, L. T. (2008). Effect of spontaneous fermentation on the physical properties of corn starch and rheological characteristics of corn starch noodle. *Journal of Food Engineering* 85(1):12-17.

Zahra, N., Khan, M., Mehmood, Z., Saeed, M. K., Kalim, I., Ahmad, I., y Malik, K. A. (2018). Determination of aflatoxins in spices and dried fruits. *Journal of Scientific Research* 10(3):315-321.

Zain, M. E. (2011). Impact of mycotoxins on humans and animals. *Journal of Saudi Chemical Society* 15(1):129-144.