



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

“Aflatoxinas en botanas de maíz de la Ciudad de México.”

SERVICIO SOCIAL

Equivalente a Tesis, para obtener el Grado de Licenciatura de Biología

Alumno

Jessie Alejandro Castillo Barrera

Matrícula: 2182028844

Lugar de realización: Lab. de Micotoxinas C-119. Departamento de Botánica, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México

Asesora Externa: Dra. Magda Carvajal Moreno.

Asesora Interna: Dra. Ana Karina Rodríguez Vicente

Septiembre 2023

i. DEDICATORIA

Con todo mi amor a mis padres Antonio Castillo y Petra Barrera, por su apoyo incondicional y su guía a lo largo de toda mi formación.

A mi hermano y amigos por su solidaridad, cariño y alegría.

ii. Agradecimientos

A personas

A la Dra. Magda Carvajal-Moreno, del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, por su apoyo y dirección de esta tesis, su cuidadosa revisión y la publicación de este trabajo.

A la Dra. Ana Karina Rodríguez-Vicente, de la Universidad Autónoma Metropolitana por su confianza, sugerencias y apoyo como asesora interna para el desarrollo de esta investigación.

Al Biol. Eduardo Olmedo-López, compañero de laboratorio, por su apoyo brindado durante la elaboración de este trabajo.

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

A instituciones

A la Universidad Autónoma Metropolitana, por brindarme sus instalaciones, profesores, aulas programas y permitirme formarme en la carrera de Biología.

Al Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México, por permitirme llevar a cabo esta investigación en el laboratorio C-119 de Micotoxinas, por le quipo, las instalaciones, los reactivos, las bases de datos y materiales.

iii. INDICE

Número	Contenido	Página
i	Dedicatoria	2
ii	Agradecimientos	3
iii	Índice	4
iv	Lista de Tablas	6
v	Lista de Figuras	7
vi	Resumen	8
vii	Abstract	9
1.	Introducción	10
2.	Marco Teórico	11
	2.1. Antecedentes.	11
	2.2. Aflatoxinas	11
	2.2.1. Hongos productores	11
	2.2.2. Tipos de aflatoxinas.	11
	2.2.3. Hidroxilados de aflatoxinas.	12
	2.2.4. Propiedades fisicoquímicas de las AF	12
	2.2.5. Estructuras	13
	2.2.6. Importancia de las aflatoxinas en la salud humana	13
	2.3. Exposición a las aflatoxinas	14
	2.4. Legislación	14
3.	Objetivos	15
4.	Metodología	15
	4.1. Muestreo	15
	4.2. Validación el método	18
	4.2.1. Linealidad. Curvas de calibración	18
	4.2.2. Parámetro de Límites de Detección (LOD) y de cuantificación (LOQ).	19
	4.2.3. Porcentaje de recuperación.	19
	4.2.4. Selectividad.	20
	4.3. Análisis químico de las aflatoxinas.	20
	4.3.1. Extracción química de Aflatoxinas de botanas de maíz.	21
	4.3.2. Derivatización	21
	4.3.3. Cromatografía de líquidos	22
	4.3.3.1. Fase móvil.	22
	4.3.3.2. Cuantificación de AF por cromatografía de líquidos.	22
	4.4. Análisis estadístico	22
5.	Resultados y Discusión	22
	5.1. Validación del método	22

	5.2. Linealidad	22
	5.2.1. Curva de calibración de AFB ₁	24
	5.2.2. Curva de calibración de AFB ₂	25
	5.2.3. Curva de calibración de AFG ₁	26
	5.2.4. Curva de calibración de AFG ₂	27
	5.2.5. Curva de calibración de AFM ₁	28
	5.2.6. Curva de calibración de AFM ₂	29
	5.2.7. Curva de calibración de AFP ₁	30
	5.2.8. Curva de calibración de AFL	31
	5.3. Límite de detección	32
	5.4. Porcentaje de recuperación	32
	5.5. Selectividad	32
	5.6. Validación	33
	5.7. Resultados de AF en botanas de maíz	33
	5.8. Análisis Estadísticos	36
	5.8.1. Prueba de Kruskal-Wallis	36
	5.8.2. Prueba de Dunn	36
6.	Conclusiones	43
7.	Bibliografía	44

iv. Lista de Tablas

Número	Contenido de la tabla	Páginas
1	Clasificación de botanas de acuerdo con su proceso de fabricación.	10
2	Propiedades fisicoquímicas de algunas aflatoxinas y sus metabolitos (OPS,1983).	12
3	Nombre, marca, peso del paquete e ingredientes con riesgo de tener Aflatoxinas.	17
4	Rangos de límites de detección para cada AF de acuerdo con las pruebas de linealidad.	23
5	Curva de calibración de AFB ₁	24
6	Curva de calibración de AFB ₂	25
7	Curva de calibración de AFG ₁	26
8	Curva de calibración de AFG ₂	27
9	Curva de calibración de AFM ₁	28
10	Curva de calibración de AFM ₂	29
11	Curva de calibración de AFP ₁	30
12	Curva de calibración de AFL.	31
13	Límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ) para cada AF	33
14	Datos del experimento de Porcentaje de Recuperación.	33
15	Ocho AF en botanas de maíz.	34
16	Concentración de AF hidroxiladas (ng g ⁻¹) de AF en 1 g de muestra de botana de maíz.	35
17	Resultados de la prueba de Kruskal Wallis.	37

v. Lista de Figuras

Número	Contenido	Páginas
1.	Estructura química de las aflatoxinas.	13
2.	Muestras de botanas elaboradas a base de maíz, marca, peso del paquete e ingredientes con riesgo a tener AF.	16
3.	Curva de calibración de AFB ₁	24
4.	Curva de calibración de AFB ₂	25
5.	Curva de calibración de AFG ₁	26
6.	Curva de calibración de AFG ₂	27
7.	Curva de calibración de AFM ₁	28
8.	Curva de calibración de AFM ₂	29
9.	Curva de calibración de AFP ₁	30
10.	Curva de calibración de AFL	31
11.	Prueba de Kruskal-Wallis para AFB ₁ .	38
12.	Prueba de Kruskal-Wallis para AFG ₂ .	39
13.	Prueba de Kruskal-Wallis para Aflatoxicol.	39
14.	Prueba de Kruskal-Wallis para AFP ₁ .	40
15.	Prueba de Kruskal-Wallis para AFM ₂ .	40
16.	Prueba de Kruskal-Wallis para AFB ₂ .	41
17.	Prueba de Kruskal-Wallis para AFG ₁ .	41
18.	Prueba de Kruskal-Wallis para AFM ₁ .	41

vi. Resumen

En México la mayoría de las botanas comerciales y de mayor consumo son elaboradas a base maíz nixtamalizado o de trigo por lo que su valor nutricional es considerado bajo debido a su alto grado de procesamiento. Sólo una pequeña cantidad de reportes se han centrado en la seguridad en contaminantes de las botanas o snack elaboradas a base de maíz. Las AF se han identificado en el campo, cosecha, transporte, almacén y en alimentos de animales y humanos, y producen muchos daños como hemorragias, vómitos, inmunodepresión, son mutágenas y cancerígenos conocidos, y causan malformaciones en fetos y son abortivas. En México se han desarrollado legislaciones para regular el límite permitido de AF presentes en harina de maíz nixtamalizado mediante la NOM-247-SSA1-2008 la cual indica que el límite máximo de AF son $12 \mu\text{g kg}^{-1}$. Con la recopilación y el análisis de datos obtenidos con el experimento se logró identificar y cuantificar las AF totales en muestras de botanas de maíz de la Ciudad de México de las aflatoxinas AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂, AFM₁, AFM₂, AFP₁, y AFL, por el método de cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC). Aunque las cantidades por gramo, en algunas ocasiones son bajas, ya as AFt totales por ingerir un paquete de botanas suben en cantidades de riesgo. El promedio de los tipos de AF más altos son AFG₂ y AFM₂ que no son cancerígenos y aunque algunas muestras no rebasen los límites de tolerancia legales en México, las AF se unen y producen aductos con el ADN, ARN y proteínas, y causan mutaciones y cáncer. El consumo continuo de estas botanas elaboradas a base de maíz podría considerarse riesgoso para la salud debido a las altas cantidades de AF que contienen.

vii. Abstract

Most of the commercial and most consumed snacks in Mexico are elaborated with or without lime in maize, or wheat, with low nutritional value due to its processed degree. There are few reports on the security of contaminants in maize snacks. Aflatoxins act in the field, storage, warehouses, transportation, balanced feeds for animals or human foods. Aflatoxins produce bleedings or hemorrhages, vomits, diarrhea, immunosuppression, they are recognized mutagens and carcinogens and also produce malformations in fetuses, abortions, and miscarriages. The Mexican legislation to regulate aflatoxin tolerance level $12 \mu\text{g kg}^{-1}$, in maize flour is NOM-247-SSA1-2008.

The identification of the 4 basic aflatoxins (AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂) and 4 hydroxylated metabolites (AFM₁, AFM₂, AFP₁, Aflatoxicol (AFL)) and the HPLC quantification in maize snacks in Mexico were obtained. Although the total aflatoxins quantities per gram seem to be low, when you obtain them per package they are significative. The highest averages were AFG₂ and AFM₂ that are not carcinogenic even if they surpass the tolerance limits. Aflatoxins link to DNA, RNA and proteins forming adducts that are the active carcinogens. The continuous consumption of these maize snacks can be a risk due to the high amount they have per package.

1. INTRODUCCIÓN

Las botanas (snacks) son alimentos consumidos como aperitivos entre comidas o en reuniones sociales para satisfacer temporalmente el apetito. En México la mayoría de las botanas comerciales y de mayor consumo son elaboradas a base de harinas refinadas de maíz nixtamalizado o de trigo por lo que su valor nutricional es considerado bajo debido a su alto grado de procesamiento. Además, tienen aditivos para alargar su tiempo de anaquel, como antioxidantes y colorantes sintéticos (Fernández-Ibarra et al., 2018).

Los productores de botanas van desde empresas grandes, medianas y pequeñas. Algunos cuentan con marca comercial, otros maquilan para empresas más grandes. Los grandes productores de botanas abarcan poco más de 80% del mercado mexicano, el resto se reparte entre los pequeños y medianos comerciantes, que pueden tener una venta más local o regional.

Ríos (1989), clasificó en siete grupos los productos tipo botana de acuerdo con el proceso al que eran sometidos, en la tabla 1 se presenta dicha clasificación:

Tabla 1. Clasificación de botanas de acuerdo con su proceso de fabricación.

Proceso	Botanas
Frituras	Papas fritas, zanahoria frita, plátano frito, derivados de papa, chicharrón de cerdo, frituras de harina
Extruidos	Pellets de harina, corn-chips, extruidos de masa: corn-chips, collets
Troquelados	Botanas de tortilla
Recubiertos	Extruidos compuestos, cacahuates recubiertos
Explotados	Palomitas de maíz
Tostados	Cacahuates, habas, almendras, semillas de calabaza, semillas de girasol, garbanzos
Horneados	Pretzels

El mercado de las botanas en México ha crecido un 40,6% en los últimos 5 años, de 29.484 millones MXN, en el 2007, a 41.459 millones MXN en el 2012. Siendo dos grandes empresas las que concentran el 90% del mercado nacional, en primer lugar, el grupo Sabritas, filial de PepsiCo, que tiene una participación del 69,7%, en tanto que Barcel, propiedad de la panificadora mexicana Grupo Bimbo, tiene el 20,3% del mercado nacional. El 10% restante es para Bokados, propiedad de Arca Continental, con fuerte presencia en el norte del país, así como pequeños y medianos productores independientes (INEGI 2009).

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes.

2.2. Aflatoxinas

Las Aflatoxinas (AF) se descubrieron en 1960 cuando se importó pasta de cacahuete de Brasil hacia Inglaterra y murieron 100,000 pavos.

La palabra aflatoxina deriva del hongo productor de toxinas: *Aspergillus flavus* de donde se tomó la A del género y las primeras tres letras, fla, de la especie (*flavus*) y el término complementario, toxina, deriva del latín *toxicus*, de toxicum, 'veneno'.

2.2.1. Hongos productores

Las AF son micotoxinas producidas por cepas toxicogénicas de diferentes hongos, principalmente por tres especies de la sección *Flavi*: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* y *Aspergillus nomius* (Abarca et al., 2000). Otros hongos productores son las especies relacionadas, *A. nomius* y *A. niger* (Cornejo & Villarroel, 2007)

Se han detectado en diferentes cultivos: en el campo, cosecha, transporte, almacén y en alimentos de animales y humanos. Las AF producen muchos efectos secundarios adversos como hemorragias internas, inmunodepresión, y se consideran origen del cáncer, ya que son mutágenos reconocidos, que producen mutaciones puntuales, con efecto hepatotóxico y teratógeno, pues producen malformaciones múltiples en el desarrollo fetal (Bogantes- Ledezma et al., 2004).

Se pueden encontrar de modo natural en un gran número de productos agrícolas utilizados como materias primas en la preparación de alimentos para humanos y animales, que incluye granos, cereales, frutas frescas, frutos secos, nueces, semillas oleaginosas y lácteos o como contaminantes y residuos tóxicos de los productos en las explotaciones zootécnicas (leche, huevos, carnes) (Requena et al., 2005).

2.2.2. Tipos de Aflatoxinas

Las AF se encuentran dentro de las principales micotoxinas, existen aproximadamente 20 tipos diferentes, sin embargo, la AFB₁, AFB₂, G₁ y G₂ son las que se encuentran comúnmente en alimentos, principalmente en granos y frutos secos; mientras que las AFM₁ y M₂ son derivados metabólicos de las AFB₁ y AFB₂ respectivamente, estas se excretan en la orina y leche de mamíferos que han consumido alimentos contaminados. La AFM₁ excretada en la leche de vaca tiene propiedades tóxicas similares a las de la AFB₁, además se ha documentado que AFB₁ y AFM₁ son más tóxicas y cancerígenas que las otras (Londoño & Martínez., 2017).

2.2.3. Hidroxilados de aflatoxinas.

La AFM₁ es uno de los principales metabolitos hidroxilados de AFB₁, tiene alta potencia cancerígena y está clasificada como probable causa de cáncer en humanos, por lo que se clasifica en el grupo 2B de la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) (Caloni et al., 2006).

Cuando el hígado de mamíferos recibe a la AFB₁ requiere eliminarla por su toxicidad, y las hace solubles en agua al añadirle un grupo OH⁻, para eliminarlas por orina o leche. De la AFB₁ se forman otros metabolitos, como el aflatoxicol (18 veces menos tóxico que la AFB₁) y la AFB_{2a} (no tóxica). La concentración de AFM₁ en la leche variará según la concentración de AFB₁ en la ración, la cantidad y duración del consumo de alimento contaminado y el estado de salud del animal. También deberá considerarse que las concentraciones de AFM₁ variarán según el sistema metabólico del animal, lo que provoca que las concentraciones de AFM₁ en la leche varíen, de un día para otro y de una producción de leche a la siguiente (Gimeno, 2004).

2.2.4. Propiedades físicoquímicas de las AF (OPS, 1983)

Las AF son cristales sólidos de color blanco al amarillo, sin olor, sin sabor e incoloros, son poco solubles en agua y solubles en solventes orgánicos (metanol, cloroformo, acetona, acetonitrilo y dimetilsulfóxido). **Tabla 2.**

Tabla 2. Propiedades físicoquímicas de aflatoxinas y sus metabolitos (OPS,1983).

AF	Fórmula molecular	Peso molecular	Punto de fusión (°C)	Absorción UV (ε) ^c 360-362 nm	Emisión de fluorescencia (nm)	Referencias
B ₁ ^a	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	312	269-269	21,800	425	Asao et al.,1965.
B ₂ ^a	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	314	286-289	24,000	425	Chang et al., 1963
G ₁ ^a	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328	244-246	17,700	450	Asao et al.,1965
G ₂ ^a	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330 ^d	237-240 ^d	17,100	450	Hartley et al., 1963.
M ₁ ^a	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328	299	21,250 (357nm)	425	Holzapfel et al., 1966
M ₂ ^a	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330	293	22,900 (357nm)	--- ^f	
P ₁ ^b	C ₁₆ H ₁₀ O ₆	298	>320	11,200 (267 nm) 14,900 (342 nm)	--- ^f	Dalezios et al., 1971. Büchi et al., 1973
Q ₁ ^a	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328	--- ^e	17,500 (366 nm)	--- ^f	Masri et al. 1974 a,b
AFL	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	314	230-234 ^d	14,100 (325 nm)	425	Detroy & Hesseltine,1970

a. El coeficiente de absorción molar de las aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ se obtuvo de Rodricks et al. (1970) y el correspondiente a las aflatoxinas M₁ y M₂ se Stubblefield et al. (1972).

b. La P indica los productos fenólicos de la O-desmetilación de la aflatoxina B₁.

c. Compuestos en metanol, salvo la aflatoxina P₁ disuelta en etanol. Los datos sobre coeficientes de absorción molar de otros picos y las características de la absorción ultravioleta de las AF en otros solventes en los trabajos originales.

d. Datos de Butler (1974).

e. No disponible.

f. Fluorescencias violeta de AFM₂ y amarillo-verdosa de AFP₁ y AFQ₁ notificadas en los trabajos originales.

Las AF en solución son sensibles a la luz, se descomponen en el aire, oxígeno, soluciones alcalinas o de ácidos suaves y se nombran según el color de la fluorescencia que emana con luz UV de onda larga B₁, B₂, G₁ y G₂, se nombran por su color fluorescente bajo la luz ultravioleta (B: "blue"- azul y G: "green"- verde) (Novoa & Díaz, 2006).

Las especies de *Aspergillus flavus* originan las AFB₁ y AFB₂, y *A. parasiticus* que produce 4 las AFB y AFG.

2.2.5. Estructuras

En la figura 1 se muestra la estructura de las AF (Novoa & Díaz, 2006). Las AF son cumarinas ligadas a una unidad bifurano más un anillo de pentanona (AFB) o lactona (AFG) (Steyn et al., 1980).

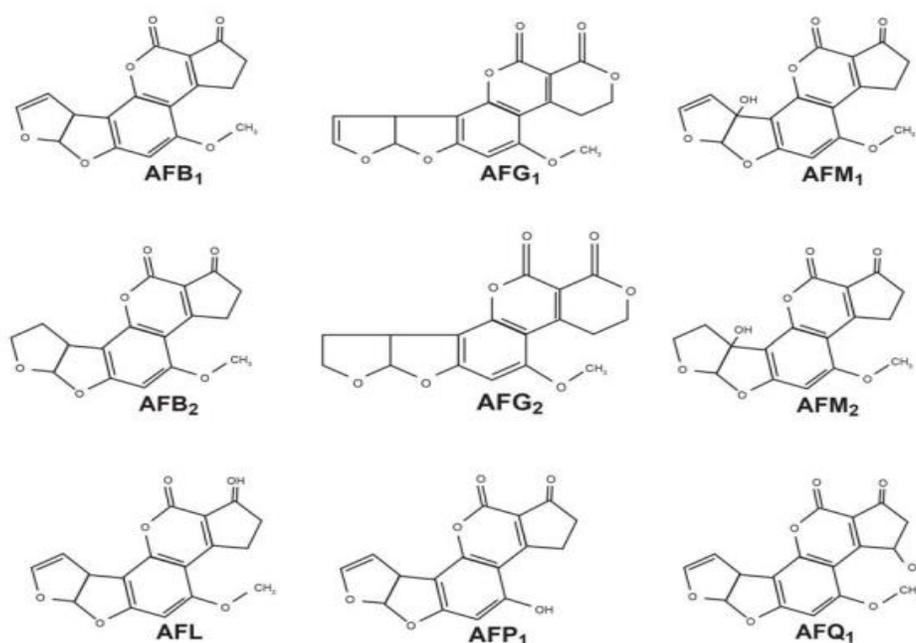


Figura 1. Estructura química de las aflatoxinas (Carvajal, 2013).

2.2.6. Importancia de las aflatoxinas en la salud humana

Las AF son frecuentes en alimentos y se acumulan en los ácidos nucleicos y proteínas, producen efectos tóxicos agudos, en corto tiempo, o crónicos a largo plazo después de acumularse por meses o años, siendo estos últimos los más comunes (Martínez et al., 2013).

Se han reportado tanto la presencia de *Aspergillus flavus* como de AF en el maíz en estudios de Estados Unidos de América, China, India y México. En la India, se han encontrado altas cantidades, de 6.25 y 15.6 mg/kg de maíz, que provocan hepatitis aguda (Lindner, 1995).

En 1974, en la India, se documentaron 108 casos de daño por AF, donde los niños desarrollaron cirrosis al consumir 0.25 y 15 mg/kg de AF en maíz de su dieta. El síndrome de Reye, con encefalitis y degeneración grasa de vísceras en niños, se asoció con la ingestión de AF (Krishnamachari, et al., 1975).

En México, hay reportes sobre masa, maíz y la nixtamalización, pero unos pocos sobre botanas de maíz y sus AF contaminantes, pese a su alto consumo.

En Lagos, Nigeria se reportaron mohos aflatoxigénicos y AF en 25 bocadillos de maíz, maní, nueces, coco, y trigo, vendidos en la calle. El trabajo muestra que el 68 % de los refrigerios estaban contaminados con AF, el 75 % de los snacks a base de cacahuete, el 80 % de trigo y el 100 % con base de maíz (Ezekiel et al., 2012).

2.3. Exposición a las aflatoxinas

Se considera exposición **aguda** cuando se consumen niveles de AF altos en periodos de tiempo muy cortos, en la intoxicación por AF se observan lesiones hepáticas como coágulos, fragilidad capilar, hemorragia, tiempos prolongados de coagulación y membranas ictericas (Santos, 1999).

En la exposición **crónica**, los alimentos contaminados tienen bajos niveles de AF por debajo del límite máximo permitido, pero como se almacenan, también este hecho es motivo de preocupación, ya que el efecto del daño sobre el ADN es acumulativo en el genoma humano (Yunus et al., 2011).

2.4. Legislación

En México se han desarrollado legislaciones para regular el límite permitido de AF presentes en cereales para consumo humano y animal mediante la Norma Oficial Mexicana NOM-188-SSA1-2002, la cual indica que el límite máximo permisible de AF en cereales es de $20 \mu\text{g kg}^{-1}$, en el caso de observarse concentraciones desde 21 y hasta $300 \mu\text{g kg}^{-1}$, el cereal únicamente podrá utilizarse para consumo animal, de acuerdo con el Apéndice Normativo A (NOM-188-SSA1-Diario Oficial de la Federación 2002), mientras que la NOM-247-SSA1-2008 aporta las especificaciones sanitarias e indica que el límite máximo de AF en harina de maíz nixtamalizado y masa para tortillas es $12 \mu\text{g kg}^{-1}$ (NOM-247-SSA1-Diario Oficial de la Federación 2008).

3. OBJETIVOS

3.1. General

3.1.1. Conocer la cantidad de aflatoxinas presentes en botanas de maíz.

3.1.2. Específicos

Realizar un muestreo representativo.

Validación del método.

Análisis químicos de las AF de las muestras.

4. METODOLOGÍA

4.1. Muestreo

Se compraron 34 paquetes de botanas o muestras de diferentes marcas elaboradas a base de maíz, las cuales contenían otros ingredientes susceptibles de contener AF. Las muestras se obtuvieron de tiendas y centros comerciales de la Ciudad de México, en la **Figura 2** se presentan las muestras con sus nombres comerciales, marca, peso y contenido del paquete, ingredientes con posibilidad de contener AF y fotografía de su empaque del año 2023. **Tabla 3.**

Figura 2. Muestras de botanas elaboradas a base de maíz, marca, peso del paquete e ingredientes con riesgo a tener AF.



1. Cheetos torciditos.



2. Doritos 3D.



3. Runners.



4. Chipotes.



5. Takis fuego.



6. Crujitos.



7. Churrumais.



8. Rancheritos.



9. Fritos.



10. Tostachos.



11. Solchesitos.



12. Churritos.



13. ACT II.



14. Tostitos Xtra Flamin Hot.



15. Popcorn White cheddar.



16. Salmas horneadas.



17. Totopos con frijol.



18. Tostadas con tajín.



19. Churrumaiz flamas.



20. Cheetos poffs.



21. Tostadas horneadas.



22. POP karameladas



23. ACT II caramelo.



24. Tostadas con nopal.



25. Nopalia.



26. SUSALIA.



27. ACT II DeliX.



28. Totopos tricolor.



29. Palomitas Slim pop.



M30. Totopos.



31. Nopalia churros de nopal.



32. Doritos dinamita.



33. Totopos con nopal, linaza y ajonjolí negro.



M34. Veggi chips.

Tabla 3: Nombre, marca, peso del paquete e ingredientes con riesgo de tener Aflatoxinas.				
N°	Nombre de botana	Marca	Peso (g) por paquete	Ingredientes
1	Cheetos torciditos	Sabritas,	55 g	Quesos, chile, harina fina de maíz, cebada, soya, leche.
2	Doritos 3D.	Sabritas	50 g	Harina de maíz nixtamalizado, queso, chile, leche, soya, cebada.
3	Runners.	Barcel	62 g	Harina de maíz, leche, polvo de chile, huevo, cacahuete, soya
4	Chipotles	Barcel	55 g	Harina de maíz, leche, chile chipotle ahumado, soya, huevo, cacahuete.
5	Takis fuego	Barcel	70 g	Harina de maíz, soya, leche, huevo, cacahuete, chile.
6	Crujitos,	Sabritas	42 g	Harina de maíz nixtamalizado, queso, crema, soya, leche, cebada, chile.
7	Churrumais.	Sabritas	56 g	Harina de maíz nixtamalizado, chile, leche, soya, cereales.
8	Rancheritos	Sabritas	58 g	Harina de maíz nixtamalizado, chile, cebada, soya, leche.
9	Fritos	Sabritas	60 g	Harina de maíz nixtamalizado, chile, leche, soya, cereales.
10	Tostachos,	Barcel	65 g	Harina de maíz, mezcla de chile, soya, leche, huevo, cacahuete.
11	Solchesitos	Sol	100 g	Cereal, jarabe de maíz, queso, chile en polvo, soya, leche, cacahuete, ajonjolí.
12	Churritos	Mi carrito de la esquina	75 g	Harina de maíz, leche, soya, otros cereales.
13	ACT II cheese flavour	ACT II.	90 g	Palomitas, queso cheddar en polvo, crema, leche, soya.
14	Tostitos Xtra Flamin Hot	Sabritas	240 g	Maíz nixtamalizado, leche, soya, cebada.
15	Popcorn white cheddar	WISE	184 g	Maíz palomero, queso polvo, cacahuates, nueces, soya, leche.
16	Salmas horneadas	SANISSIMO	414 g	Harina de maíz blanco nixtamalizado.
17	Totopos con frijol	Milpa Real	300 g	Harina de maíz, nixtamalizado, frijol, ajonjolí.
18	Tostadas con tajín	MISSION	200 g	Harina de maíz, nixtamalizado, polvo tajín.
19	Churrumaiz flamas	Sabritas	185 g	Harina de maíz nixtamalizado, queso, soya, leche, cebada.
20	Cheetos poffs	Sabritas	110 g	Sémola y jarabe de maíz, queso, cebada, leche en polvo, soya.
21	Tostadas horneadas	SANISSIMO	240 g	Harina de maíz blanco nixtamalizado
22	POP karameladas	Barcel	90 g	Maíz palomero, jarabe de maíz, soya, leche, huevo, cacahuete.
23	ACT II caramelo	ACT II	175 g	Maíz palomero, leche, soya
24	Tostadas con nopal	Señor Cactus	200 g	Harina de maíz nixtamalizado, nopal.
25	Nopalia	KUA	175 g	Soya, harina de maíz, nixtamalizado, proteína de leche, ajonjolí nopal.
26	SUSALIA	Alimentos Susalia	200 g	Harina de maíz nixtamalizado
27	ACT II Deli X	ACT II	150 g	Maíz palomero, chocolate, harina de maíz, leche, soya, huevo, nueces
28	Totopos tricolor	La costeña,	280 g	Harina de maíz nixtamalizado
29	Palomitas Slim pop	Slim Pop	110 g	Maíz palomero, chile guajillo, pimentones seco y dulce.
30	Totopos	Del Hogar	320 g	Harina de maíz nixtamalizado, ajonjolí.
31	Nopalia churros de nopal	KUA	200 g	Chile, harina de maíz nixtamalizado, nueces, soya, cacahuates, nopal.
32	Doritos dinamita	Sabritas	160 g	Maíz nixtamalizado, quesos, leche, soya, cereales
33	Totopos con linaza.	Milpa Real,	300 g	Harina de maíz nixtamalizado, ajonjolí negro, nopal
34	Veggi chips	Nature's heart	142 g	Aceite de girasol alto oleico

4.2. Validación el método

La validación del método es un criterio importante para realizar mediciones confiables y se consideraron los criterios de Linealidad (curvas de calibración), Límite de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ), Porcentaje de recuperación, selectividad.

4.2.1. Linealidad. Curvas de calibración.

Para disolver a la AF, se inyectó 1 mL de una solución de benceno con acetonitrilo (98:2 v/v) al vial con cada estándar puro de AF (AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂, AFM₁, AFM₂, AFP₁, AFL) de Sigma (AOAC, 2006).

Para medir 1000 ng de cada AF, se toma una cantidad al azar de AF disuelta, se coloca en un vial ámbar con 1 mL de metanol HPLC y se mezcla en un agitador orbital (Vortex G-560, Bohemia, N.Y., EEUU) por 30 seg. Se mide la absorbancia con un espectrofotómetro (Genesys 10uv Thermo Electron Corporation, USA). Para calibrar el equipo de utilizó como blanco una celda de cuarzo con 1 mL de metanol HPLC (Tecsiquim SA de CV) que se usó, para evitar que la absorbancia del solvente interfiera con la absorbancia de la solución estándar. En una segunda celda de cuarzo se agrega 1 mL de la solución estándar de cada AF por separado, y se introduce en el espectrofotómetro a una absorbancia de 325-362 nm según la AF. Se obtuvieron 7 concentraciones de 1 µg mL (= 1000 ng), una de cada estándar de AF pura empleando la siguiente ecuación:

$$\text{Concentración } (\mu\text{g/mL}) = \frac{\text{Absorbancia de AF} \times \text{Peso molecular de la AF}}{\text{Coeficiente de extincipon de la AF}}$$

Después se sacó la inversa de x (1/x), para preparar una solución stock de 1 µg mL⁻¹ (= 1000 µL) en MeOH, de cada AF para realizar las concentraciones seriadas. Se implementó la siguiente fórmula:

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

De la solución base ó stock de 1000 µL se obtuvieron 7 concentraciones con base 10 en 7 viales: 100 ng, 10 ng, 1 ng, 0.5 ng, 0.1 ng, 0.05 ng y 0.01 ng.

Se toman 100 µL de la solución anterior y se completa con 900 µL de metanol HPLC para llevar el volumen a 1000 µL.

Todas las concentraciones se evaporan a 40 °C en un horno (Novatech BTC 9100, Guadalajara, Jal. México) durante un día, luego se derivatizan, para aumentar la fluorescencia (Kok, 1994), y se inyectan al cromatógrafo de líquidos ó HPLC.

4.2.2. Parámetro de Límites de Detección (LOD) y de cuantificación (LOQ).

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

4.2.3. Porcentaje de recuperación.

Es la cantidad de AF recuperada de una muestra adicionada y sometida al método analítico completo, nos permite evaluar la eficiencia del método entero y se expresa como porcentaje. Para su realización se fortificaron 1 g de muestra con 50, 100 y 200 ng de AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂, AFM₁, AFM₂, AFP₁, y AFL, por separado, y se les aplicó el método completo. Para conocer la cantidad de estándar de AF que se iba a agregar a la columna de inmovilización, se calculó con la siguiente fórmula:

$$\frac{5 \text{ mL} * V1}{100 \frac{\text{ng}}{\text{mL}}} = V2$$

Donde:

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

1000 ng mL⁻¹ es el estándar de AF.

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

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

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

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

Después de haber obtenido su área (μL) y concentración, se hizo un ajuste al 100% para conocer la cantidad recuperada de las AF en las muestras que se detectaron en el análisis químico. Este criterio es de suma importancia ya que nos permite realizar el ajuste de concentración de AF en las muestras y así obtener los resultados reales de las mismas.

4.2.4. Selectividad.

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

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

Donde:

t_0 es tiempo de retención basal.

$tr,2$ es tiempo de retención del segundo pico.

$tr,1$ es tiempo de retención del primer pico.

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

$$R_s = \frac{(tr,2 - tr,1)}{\frac{1}{2}(wb,1 + wb,2)}$$

Dónde:

$tr,2$ es tiempo de retención del segundo pico.

$tr,1$ es tiempo de retención del primer pico.

$wb,1$ es el ancho de la banda del primer pico.

$wb,2$ es el ancho de la banda del segundo pico

Depende de la selectividad, la eficiencia y la retención de los compuestos en estudio, se considera una separación aceptable de los dos componentes cuando esta resolución es mayor a uno ($R_s > 1$).

4.3. Análisis químico de las Aflatoxinas

Las AF se purificaron y concentraron con columnas de inmunoafinidad (Easi-Extract Aflatoxin, R-Biopharm Rhône LTD) con anticuerpos monoclonales anti-aflatoxinas totales específicos ligados a agarosa, que purifican y concentran las AF, y forman un complejo antígeno-anticuerpo, el resto de los compuestos de la muestra se eliminan con ayuda de agua destilada. Una vez capturada la muestra se eluye de la columna con metanol HPLC y se pasa al cromatógrafo para cuantificar las AF. Este método tiene un porcentaje de recuperación del 97 al 100%, y es el más preciso.

4.3.1. Extracción química de Aflatoxinas de botanas de maíz

Se implementó el método R –Biopharm (2021):

1. Se pesaron 50 g de muestra en una balanza granataria y 5 g de cloruro de sodio (J.T. Baker NaCl & SIGMA NaCl) y se vaciaron en una licuadora resistente a solventes de 1 L de capacidad (Waring Commercial Mod. MX1200XT31)
2. Se añadieron 100 mL de metanol (J.T. Baker) al 80% y se molieron a alta velocidad por 2 minutos.
3. Se repartió la mezcla en dos tubos Falcon de 50 mL c/u y se centrifugaron a 4000 rpm durante 10 min (ALC 4235 Cool Working System, Milán, Italia), se recuperó el sobrenadante de los tubos y se depositaron en frascos de vidrio, se etiquetaron y refrigeraron.
4. Para la extracción se utilizaron 20 mL de PBS ajustada a un pH de 7.4 para acondicionar las columnas de inmunoafinidad.
5. Para el filtrado se tomaron 5 mL de sobrenadante de cada muestra y se vació en un tubo Falcon de 50 mL, con 20 mL de PBS y se pasó por el agitador orbital (Vortex G-560, Bohemia, NY, EEUU.) por 10 seg.
6. Se pasaron los 25 mL a través de la columna de inmunoafinidad por gravedad para que las AF se fijaran al gel de agarosa.
7. Se lavó la columna con 20 mL de PBS a un flujo de aproximadamente 5 mL por minuto.
8. Por último, se eluyeron las AF de la columna a una velocidad de flujo de 1 gota por segundo usando 1.5 mL de metanol HPLC al 100%, se añadió 1.5 mL de agua destilada y se generó reflujo para romper y desnaturalizar el gel de agarosa y así pasen al eluido las AF unidas al gel. El eluido se recogió en un vial de vidrio ámbar de 3 mL para evitar que la luz dañe las AF's, posteriormente se secaron todos los viales a 40 °C en un horno (Novatech BTC 9100, Guadalajara, Jal. México) durante dos días.

4.3.2. Derivatización

Las muestras secas se resuspendieron con 200 μ L de acetonitrilo y para aumentar su fluorescencia se adicionaron 800 μ L de solución derivatizante, se preparó con 5 mL de ácido trifluoroacético (J.T. Baker USA) + 2.5 mL de ácido acético glacial (Merck, Naucalpan, México) + 17.5 mL de agua desionizada, para obtener la concentración final de la solución derivatizante de 20% (v/v), se agitó la mezcla en un agitador orbital (Vortex G-560, Bohemia, N.Y., EEUU) por 30 seg.

Los viales con la solución derivatizante se pusieron a baño maría por 10 min a una temperatura de 65 °C, (Akiyama *et al.* 2001, Kok, 1994). Se retiraron del baño maría y se llevaron a una temperatura ambiente para posteriormente inyectar 200 μ L en un inserto dentro de un vial ámbar de 1.5 mL y se colocaron dentro del cromatógrafo de líquidos, donde se mide por triplicado cada muestra, la aguja toma 60 μ L en cada inyección.

4.3.3. Cromatografía de líquidos

4.3.3.1. Fase móvil

En un recipiente de vidrio ámbar se colocaron 650 mL de agua destilada, 200 mL de acetonitrilo y 200 mL de metanol HPLC y se llevó a un volumen de 4 L, se pasaron de litro en litro por el desgasificador por 35 minutos en un matraz volumétrico de 1000 mL.

4.3.3.2. Cuantificación de AF por cromatografía de líquidos

El análisis de los extractos obtenidos de cada muestra se llevó a cabo en un equipo HPLC (serie 1200) con un auto muestreador (G1329A serie DE64761666), una bomba isocrática (G1310A serie DE62957044), detector de fluorescencia (G1321A serie DE60456380), todos de la marca Agilent Technologies y una columna cromatográfica Agilent VDS pher 100 C18-E 5 μ m, 150 x 4.6 mm. Se corrió el programa ChemStation 32 para HPLC.

4.4. Análisis Estadístico

Se realizaron las pruebas de Kruskal-Wallis, como método para determinar si existen diferencias significativas entre dos a más grupos independientes de datos. La prueba no paramétrica permitió identificar y comparar las diferencias existentes entre las concentraciones de AF de cada muestra.

La prueba de Dunn es una prueba post hoc que se utiliza para comparar las diferencias entre múltiples grupos en datos no paramétricos. Se utiliza tras rechazar la hipótesis nula de la prueba de Kruskal-Wallis, indicando que existen diferencias significativas entre al menos dos grupos.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Validación del método

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

5.2. Linealidad

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

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

Aflatoxina	LOD ng g⁻¹	Rango de Tiempos de Retención (min)	R²
AFB ₁	0.01	8.7060 a 9.4000	1.0000
AFB ₂	0.05	18.5833 a 18.8056	0.9989
AFG ₁	0.01	9.0240 a 9.3473	0.9988
AFG ₂	0.05	7.0030 a 7.1036	0.9998
AFM ₁	0.05	2.9020 a 3.0240	0.9917
AFM ₂	0.05	20.2080 a 22.4470	0.9946
AFP ₁	0.01	18.1267 a 18.3720	0.9898
AFL	0.01	4.4483 a 4.5223	0.9997

De la **Figura 3** a la **Figura 10** se presentan las curvas de calibración para cada AF, para conocer la linealidad de cada recta se calculó el parámetro de regresión lineal de cada recta y el coeficiente de correlación (R²). De la **Tabla 5** a la **Tabla 12**, se muestran las concentraciones con su respectiva área y tiempo de retención para cada AF.

5.2.1. Curva de calibración de AFB₁

Se muestran las concentraciones usadas para calcular la curva de AFB₁ (Tabla 5), tomando en cuenta Unidades de Luminiscencia y Tiempo de Retención de 7 concentraciones, cada una por triplicado, sin embargo, solo se reportan los valores promedios de las tres repeticiones para elaborar el gráfico (Figura 3).

Tabla 5. Curva de calibración de AFB₁

Concentración (ng mL ⁻¹)	Área (μL)	Tiempo de Retención (min)
100	56.8715	8.406
10	9.1923	8.551
1	4.6285	9.32666667
0.5	4.2182	9.21533333
0.1	4.1402	9.22233333
0.05	4.3353	9.27933333
0.01	4.2248	9.400

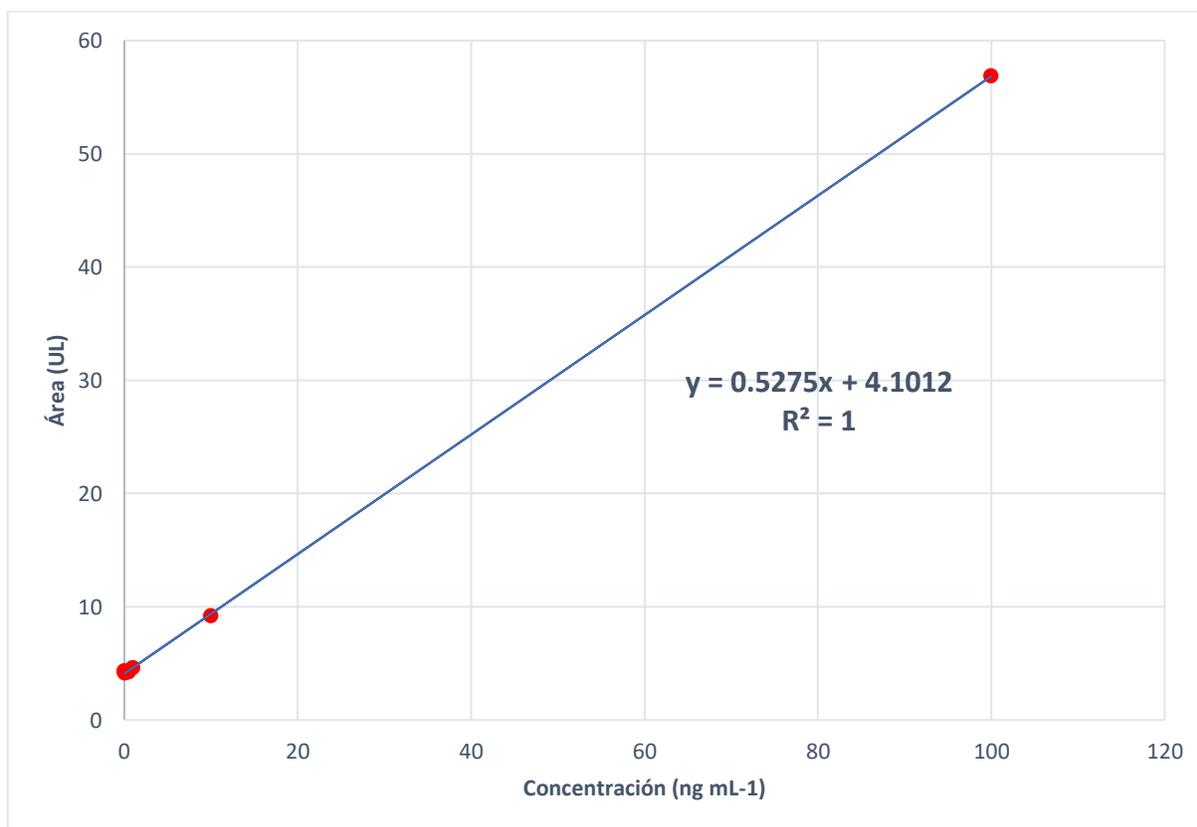


Figura 3. Curva de calibración de AFB₁

5.2.2. Curva de calibración de AFB₂

Las concentraciones usadas para calcular la curva de AFB₂ (**Tabla 6**), tomando en cuenta Unidades de Luminiscencia y Tiempo de Retención de 5 concentraciones, cada una por triplicado, sin embargo, solo se reportan los valores promedios de las tres repeticiones para elaborar el gráfico (**Figura 4**).

Tabla 6. Curva de calibración de AFB₂

Concentración (ng mL ⁻¹)	Área (μL)	Tiempo de Retención (min)
100	1711.1437	18.6560
1	86.8992	18.8057
0.5	52.7755	18.8000
0.1	15.0444	18.7690
0.05	8.4421	18.5833

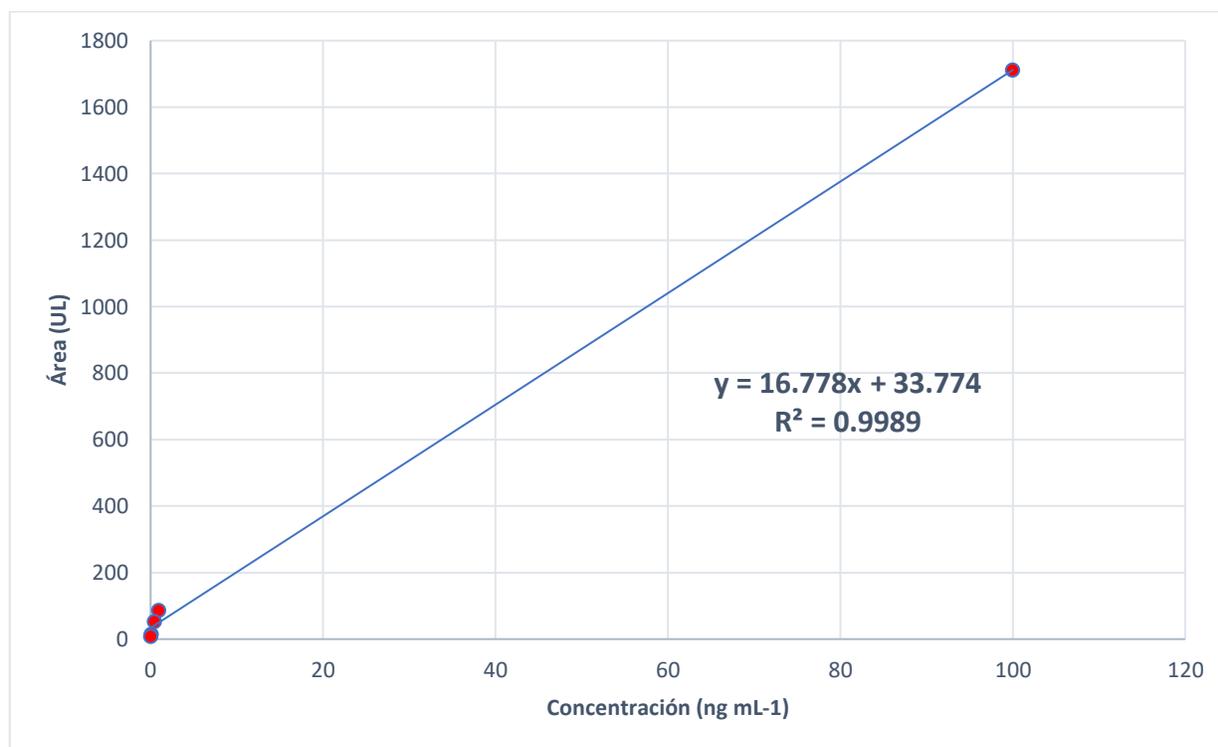


Figura 4. Gráfica Curva de calibración de AFB₂

5.2.3. Curva de calibración de AFG₁

Las concentraciones usadas para calcular la curva de AFG₁ (**Tabla 7**), según Unidades de Luminiscencia y Tiempo de Retención de 3 concentraciones, cada una por triplicado, sin embargo, solo se reportan los valores promedios de las tres repeticiones para elaborar el gráfico (**Figura 5**).

Tabla 7. Curva de calibración de AFG₁

Concentración (ng mL ⁻¹)	Área (μL)	Tiempo de Retención (min)
100	2.8572	9.3473
0.1	2.4256	9.0240
0.05	2.4311	9.0560
0.01	2.4421	9.0850

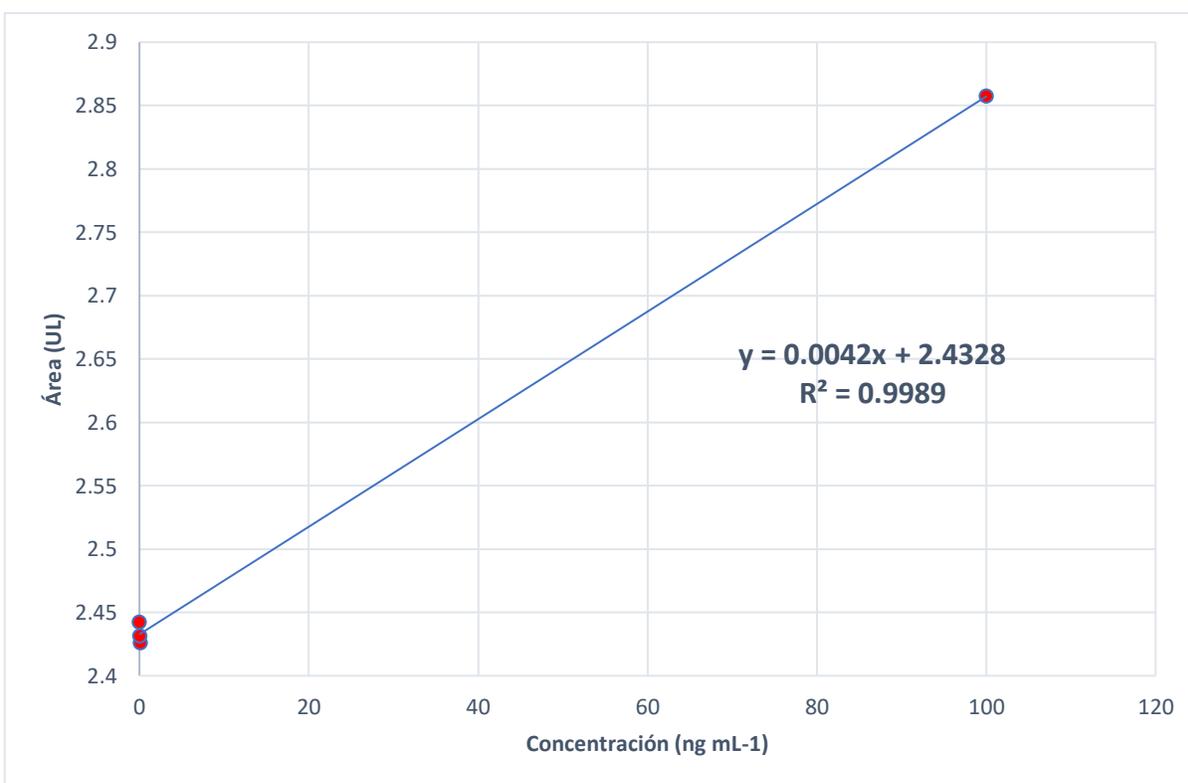


Figura 5. Gráfica Curva de calibración de AFG₁

5.2.4. Curva de calibración de AFG₂

Las concentraciones usadas para calcular la curva de AFG₂ (**Tabla 8**), por Unidades de Luminiscencia y Tiempo de Retención de 3 concentraciones, cada una por triplicado, sólo se reportan los valores promedios de las tres repeticiones (Figura 6).

Tabla 8. Curva de calibración de AFG₂

Concentración (ng mL ⁻¹)	Área (μL)	Tiempo de Retención (min)
100	4.2328	7.0393
10	0.5273	7.0030
0.1	0.2022	7.0367
0.05	0.1839	7.1037

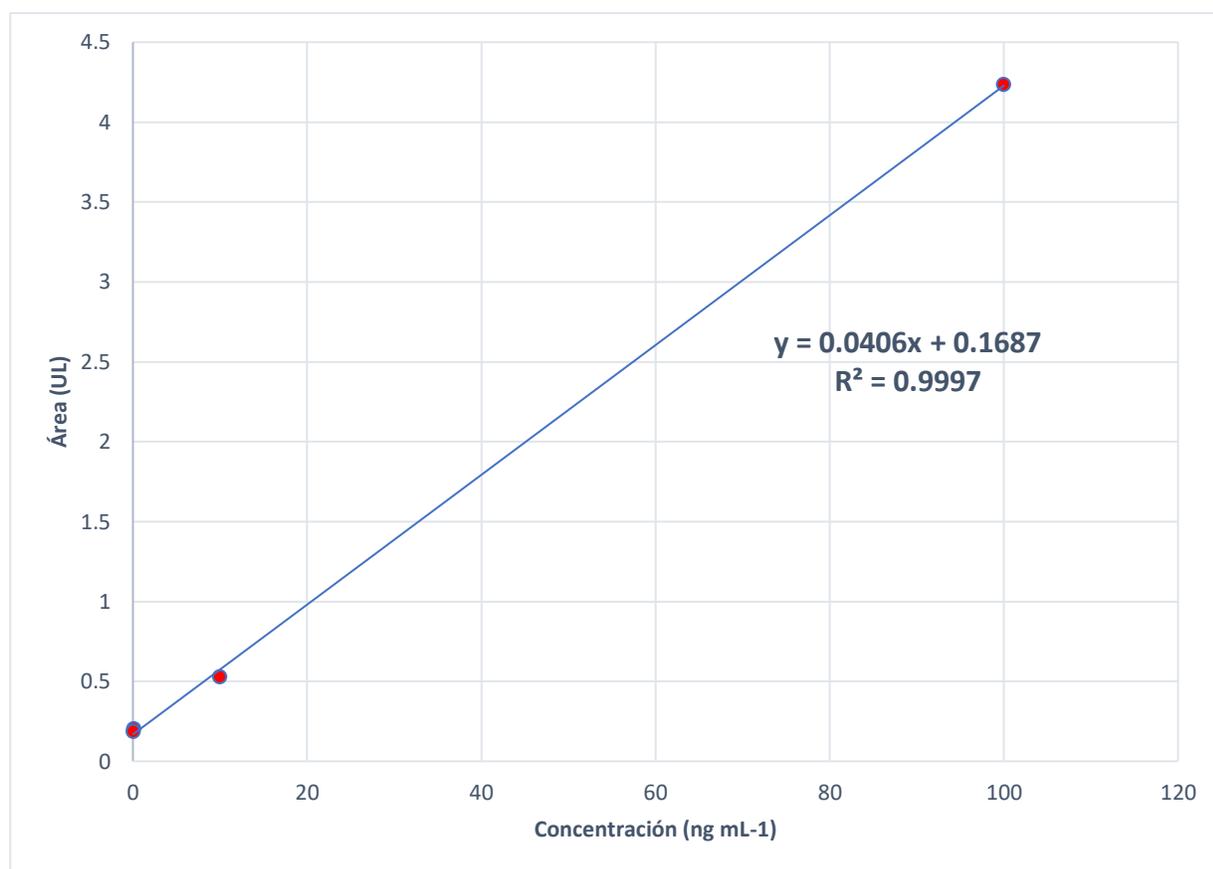


Figura 6. Gráfica Curva de calibración de AFG₂

5.2.5. Curva de calibración de AFM₁

Las concentraciones usadas para calcular la curva de AFM₁ (**Tabla 9**), tomando en cuenta Unidades de Luminiscencia y Tiempo de Retención de 6 concentraciones, cada una por triplicado, sin embargo, solo se reportan los valores promedios de las tres repeticiones para elaborar el gráfico (Figura 7).

Tabla 9. Curva de calibración de AFM₁.

Concentración (ng mL ⁻¹)	Área (μL)	Tiempo de Retención (min)
0.05	0.4250	3.024
0.1	0.6360	2.941
0.5	0.6960	3.008
10	2.4360	2.935
20	3.2960	2.971
40	6.4950	2.920

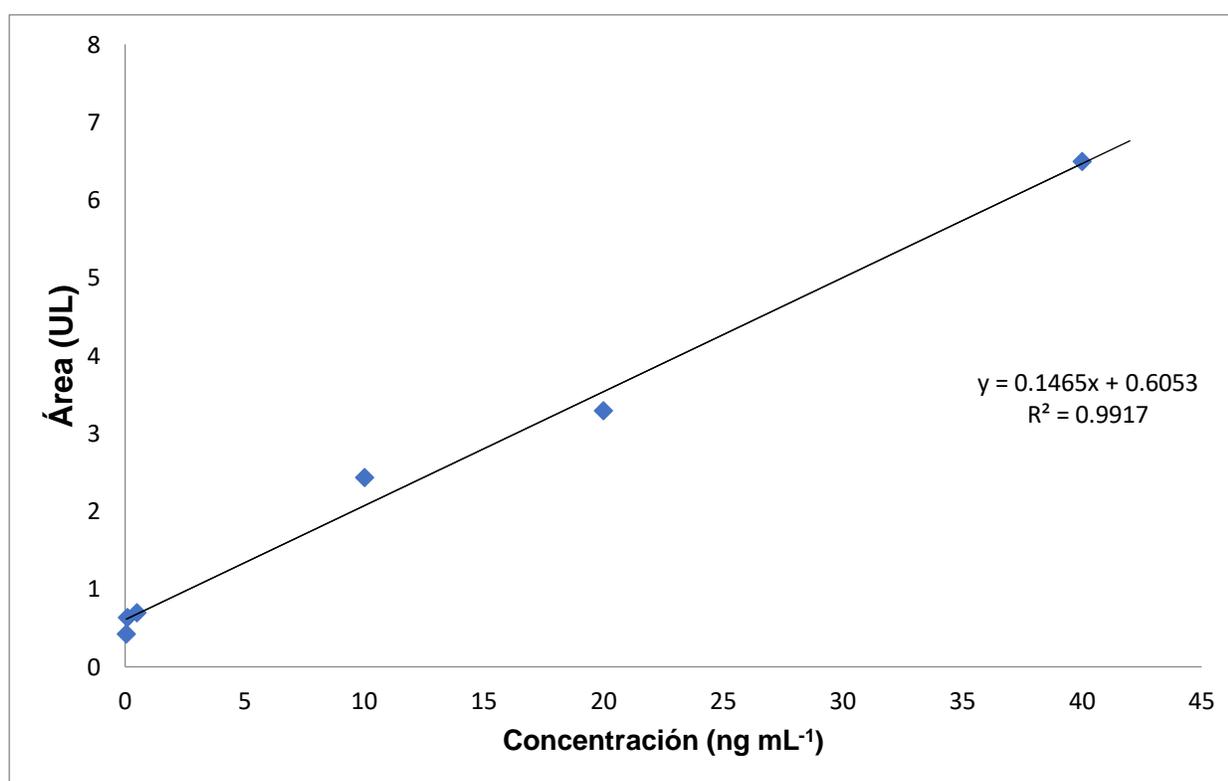


Figura 7. Gráfica Curva de calibración de AFM₁

5.2.6. Curva de calibración de AFM₂

Las concentraciones usadas para calcular la curva de AFM₂ (tabla 10), tomando en cuenta Unidades de Luminiscencia y Tiempo de Retención de 4 concentraciones, cada una por triplicado, sin embargo, solo se reportan los valores promedios de las tres repeticiones para elaborar el gráfico (Figura 8).

Tabla 10. Curva de calibración de AFM₂.

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

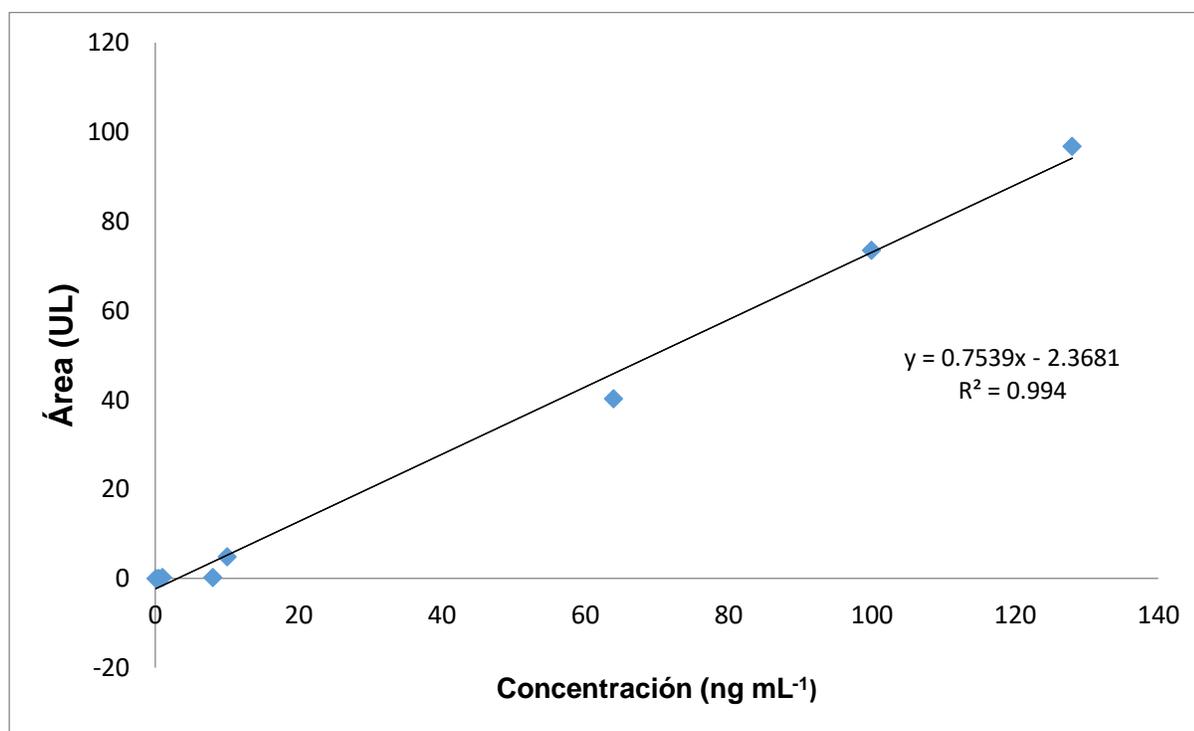


Figura 8. Gráfica Curva de calibración de AFM₂

5.2.7. Curva de calibración de AFP₁

Las concentraciones usadas para calcular la curva de AFP₁ (**Tabla 11**), tomando en cuenta Unidades de Luminiscencia y Tiempo de Retención de 4 concentraciones, cada una por triplicado, sin embargo, solo se reportan los valores promedios de las tres repeticiones para elaborar el gráfico (**Figura 9**).

Tabla 11. Curva de calibración de AFP₁

Concentración (ng mL ⁻¹)	Área (μL)	Tiempo de Retención (min)
10	3.8575	18.1267
1	2.7505	18.3720
0.5	2.5672	18.3257
0.01	2.4670	18.2680

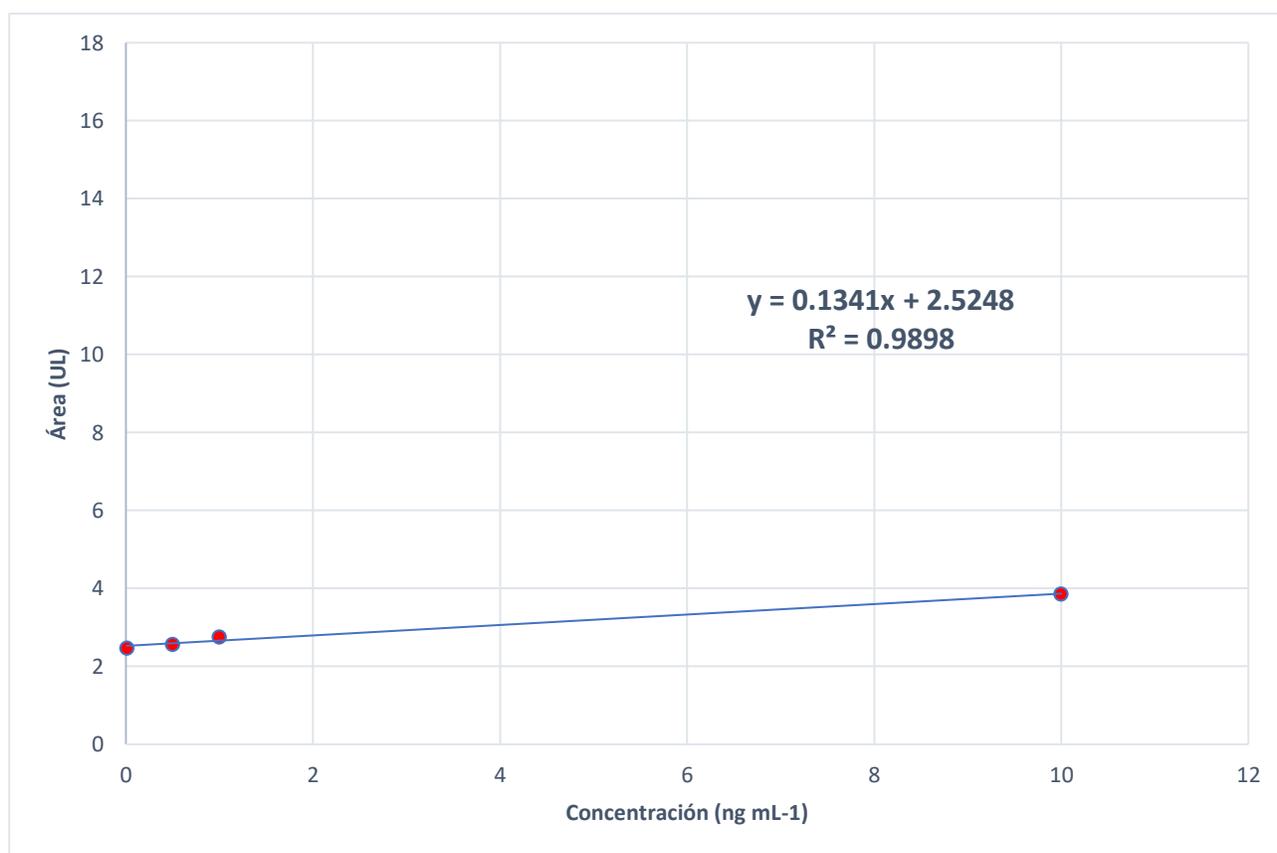


Figura 9. Gráfica Curva de calibración de AFP₁

5.2.8. Curva de calibración de AFL

Las concentraciones usadas para calcular la curva de AFL (**Tabla 12**), tomando en cuenta Unidades de Luminiscencia y Tiempo de Retención de 3 concentraciones, cada una por triplicado, solo se reportan los valores promedios de las tres repeticiones (**Figura 10**).

Tabla 12. Curva de calibración de AFL

Concentración (ng mL ⁻¹)	Área (μL)	Tiempo de Retención (min)
10	13.9158	4.4727
1	3.5181	4.4930
0.5	1.7590	4.4483
0.01	0.8540	4.5223

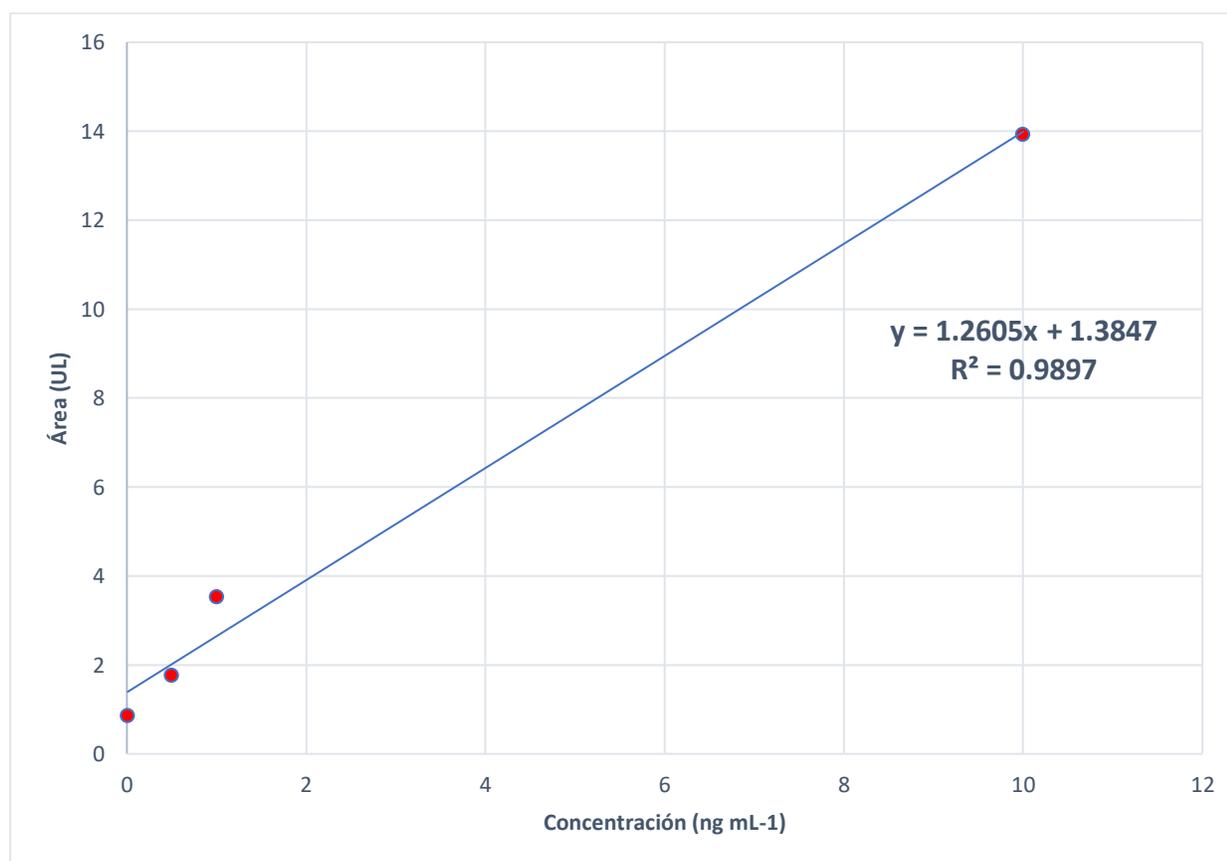


Figura 10. Gráfica Curva de calibración de AFL

5.3. Límite de detección

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

Tabla 13. Límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ) para cada AF.

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

5.4. Porcentaje de recuperación

El método de extracción presenta un porcentaje de recuperación del 85.8 al 100% para las 8 AF, esto quiere decir que el método fue eficiente. La Tabla 14 muestra los datos del porcentaje de recuperación en las botanas de maíz.

Tabla 14. Datos del experimento de Porcentaje de recuperación.

Aflatoxina	Contaminación basal	Concentración de AF (ng mL ⁻¹)	Concentración de AF recuperada (ng mL ⁻¹)	% de recuperación
AFB ₁	0	9.9	8.6	86.4
AFB ₂	0	9.9	8.5	85.8
AFG ₁	0	9.9	8.7	87.5
AFG ₂	0	9.9	8.7	87.8
AFM ₁	0	50	49.93	100
AFM ₂	0	200	196.4	98
AFP ₁	0	50	48.87	98
AFL	0	50	48.05	96

5.5. Selectividad

Se obtuvo una selectividad de 1.8998 lo que nos indica que el método analítico empleado es eficiente.

$$\alpha = \frac{(20.845 - 19.821)}{20.360 - 19.821} = 1.8998$$

Como el resultado fue 1.8998 que es mayor a 1 se considera que es correcto.

La resolución lograda fue de 1.7309:

$$Rs = \frac{(20.845 - 20.360)}{\frac{1}{2} (0.200939 + 0.523795)} = 1.7309$$

La cual se considera una separación aceptable de los dos componentes sin sobreposición de áreas de los picos.

5.6. Validación

Los resultados con los diferentes parámetros de recuperación (Linealidad, LOD, Porcentaje de recuperación, selectividad fueron correctos.

5.7. Resultados de AF en botanas de maíz.

Aunque las cantidades de AF por gramo, en algunas ocasiones son bajas, ya las AFt por paquete suben en cantidades de riesgo. El promedio de los tipos de AF más altos son AFG₂ y AFM₂ que no son cancerígenos pues no tienen la doble ligadura en el primer furano, esto es benéfico, dado que Eaton et al. (1994) establecen en la ruta de transformación de las AF, que los tipos AFG₂ y AFM₂ no se convierten nuevamente en AFG₁ y AFM₁.

El problema es, aunque algunas muestras no rebasen los límites de tolerancia legales en México, las AF se unen y producen aductos con el ADN, ARN y proteínas, y causan mutaciones y cáncer (Wang y Groopman, 1999).

En aquellos productos que en su empaque dicen tener chile, o derivados lácteos, en muchas ocasiones son pigmentos artificiales y naturales, lo que dificulta saber el origen de las AF. Las cantidades por paquete son extremadamente altas y habría que tener cuidado con su ingestión. Hay productos más limpios de AF como la muestra M1 (Cheetos torciditos), M2 (Doritos 3D), M4 (Chipotle), M8 (Rancheritos), M9 (Fritos), M15 (Popcorn White cheddar), M18 (Tostadas con tajín), M20 (Cheetos Poffs). La más limpia es M6 (Crujitos) con ingredientes normalmente con AF, y salió en cero lo que puede indicar que al producto le incorporan en su fabricación posiblemente a glucomananos para bloquear las AF, dado que los aluminosilicatos no están aprobados por FDA para la ingestión por humanos. Los glucomananos no tienen efecto dañino y de hecho ayuda a bloquear las AF. La M19 (Churrumaiz Flama, de Sabritas) el paquete de 185 g fue la muestra más contaminada con 14,496.6 ng por paquete.

Tabla 15. Ocho AF en botanas de maíz.

Aflatoxinas (ng g ⁻¹)										
Muestra	AF básicas				AF hidroxilados				AFt ng g ⁻¹	AFt ng g ⁻¹ por paquete
	AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂	AFM ₁	AFM ₂	AFL	AFP ₁		
M1	0	<LOD	0	0	0	<LOD	0	0	0.06	3.3
M2	<LOD	0	0	0	0	0	0	0	0.00	0
M3	0	0	0	0	0	1.22	0	0	1.22	75.6
M4	<LOD	<LOD	<LOD	0	<LOD	0	0	0	0.01	0.55
M5	0	0	0	0	0	1.79	0.01	0	1.80	126
M6	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00	0
M7	0	0	0	0	0	1.24	0	0	1.24	69.44
M8	0	0	0	<LOD	0	0	<LOD	0	0.04	3.32
M9	0	0	0	0	0	<LOD	0	0	0.04	2.4
M10	0	0	0	0	<LOD	2.11	0	0	2.16	140.4
M11	<LOD	<LOD	0	<LOD	0.6	3.44	0	0	4.04	404.0
M12	<LOD	<LOD	<LOD	0.1	0	2.14	0.01	<LOD	2.24	168
M13	<LOD	0	0	0	0	1.93	<LOD	0	1.93	173.7
M14	<LOD	0	0	0	0	0.80	0	0	0.75	180
M15	<LOD	<LOD	<LOD	0.02	0	<LOD	0	0	0.04	7.4
M16	<LOD	<LOD	<LOD	0.5	0	8.99	0	0	9.52	3,941.3
M17	<LOD	<LOD	<LOD	0.06	0	4.66	0	0	4.72	2,416
M18	<LOD	0	<LOD	0.02	0	<LOD	0	0	0.06	12
M19	<LOD	0	<LOD	77.00	0	2.39	0.01	0	78.36	14,496.6
M20	<LOD	<LOD	<LOD	0	0	<LOD	<LOD	0	0.04	4.4
M21	<LOD	0.01	0	0.1	0	2.34	<LOD	0	2.41	578.4
M22	<LOD	0.02	0	0	0	3.83	0	0	3.86	347.4
M23	0.01	<LOD	0	0	0	4.02	<LOD	0	4.02	703.5
M24	0.01	<LOD	<LOD	7.20	11.42	4.02	0	0	22.63	4,526
M25	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0.72	2.06	0	0	2.80	490
M26	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	5.00	2.58	0	0	7.61	1,522
M27	<LOD	0	<LOD	0.08	0	2.83	0.01	0	2.91	436.5
M28	<LOD	0	<LOD	0.10	0	3.71	0	0	3.82	1,069.6
M29	<LOD	<LOD	0	0	0	3.43	0.01	0	3.44	378.4
M30	<LOD	<LOD	<LOD	0	0.73	1.59	0	0	2.32	742.4
M31	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	22.00	3.37	0	0	24.95	4,990
M32	<LOD	0	0	<LOD	0	0.52	0	0	0.56	89.6
M33	<LOD	0.01	<LOD	0.05	0.03	2.93	0	0	3.01	903
M34	<LOD	0.01	<LOD	0	0	2.73	0	0	2.74	389.1
Promedio	<LOD	<LOD	<LOD	2.48	1.20	2.08	<LOD	<LOD	5.75	

Tabla 16. Concentración de hidroxilados (ng g⁻¹) de AF en 1g de muestra de botana de maíz.

Muestra	AF Hidroxilados (ng g ⁻¹)					AFt por paquete
	AFM1	AFM2	AFL	AFP1	AFt	
M1	0	0.04	0	0	0.04	2.2
M2	0	0	0	0	0	0
M3	0	1.22	0	0	1.22	75.6
M4	0.01	0	0	0	0.01	0.6
M5	0	1.79	0.01	0	1.80	126
M6	0	0	0	0	0	0
M7	0	1.24	0	0	1.24	69.4
M8	0	0	<LOD	0	<LOD	0.12
M9	0	0.04	0	0	0.04	2.4
M10	0.04	2.11	0	0	2.16	140.4
M11	0.57	3.44	0	0	4.01	401.0
M12	0	2.14	0.01	0	2.15	161.3
M13	0	1.93	<LOD	0	1.93	173.7
M14	0	0.75	0	0	0.75	180
M15	0	0.01	0	0	0.01	1.84
M16	0	8.99	0	0	8.99	3,721.9
M17	0	4.66	0	0	4.66	1398
M18	0	0.03	0	0	0.03	6
M19	0	2.39	0.01	0	2.39	442.2
M20	0	0.04	<LOD	0	0.04	4.4
M21	0	2.34	<LOD	0	2.34	210.6
M22	0	3.83	0	0	3.83	344.7
M23	0	4.02	<LOD	0	4.02	703.5
M24	11.42	4.02	0	0	15.43	3,086
M25	0.72	2.06	0	0	2.78	486.5
M26	5.00	2.58	0	0	7.58	1516
M27	0	2.83	0.05	0	2.83	424.5
M28	0	3.71	0	0	3.71	1,038.8
M29	0	3.43	0.01	0	3.43	37.7
M30	0.73	1.59	0	0	2.31	739.2
M31	21.56	3.37	0	0	24.92	4,984
M32	0	0.52	0	0	0.52	83.2
M33	0.03	2.93	0	0	2.96	88
M34	0	2.73	0	0	2.73	387.7
Promedio	1.18	2.08	0.001	0.0001	3.26	

Las muestras M16 (3,721.9 ng g⁻¹), M 24 (3,086 ng g⁻¹), M28 (1,038.8 ng g⁻¹) y M31 (4,984 ng g⁻¹) tuvieron cantidades altas de hidroxilados de AF, de los cuales no hubo AFP₁ y el AFL que sería el más peligroso, estuvo en cantidades traza. La M 31 tuvo cantidades altas de AFM₁ (21.56 ng g⁻¹) que ya causarían una mutación.

5.8. Análisis Estadísticos

5.8.1. Prueba de Kruskal-Wallis.

La estadística de Kruskal-Wallis es una prueba no paramétrica que se utiliza para determinar si existen diferencias significativas entre dos o más grupos independientes de datos ordinarios. Es similar a la prueba ANOVA unidireccional, pero se puede utilizar cuando los datos no cumplen con los supuestos de normalidad y varianzas iguales. La prueba implica clasificar los datos de todos los grupos juntos, calcular la suma de las clasificaciones para cada grupo y utilizar estos valores para calcular la estadística de prueba. El valor p resultante se puede utilizar para determinar si existe una diferencia significativa entre los grupos.

La expresión del estadístico de Kruskal-Wallis es:

$$H = \frac{12}{N(N+1)} \sum_{i=1}^k \frac{R_i^2}{n_i} - 3(N+1)$$

dónde:

- N es el número total de observaciones.
- k es el número de grupos.
- n_i es el número de observaciones en el i-ésimo grupo.
- R_i es la suma de rangos en el i-ésimo grupo

5.8.2. Prueba de Dunn

La prueba de Dunn implicó realizar múltiples comparaciones por pares entre grupos, utilizando un método basado en rangos para calcular la estadística de prueba y el valor p. La prueba tuvo en cuenta el problema de las comparaciones múltiples ajustando los valores p utilizando un método de corrección, como la corrección de Bonferroni. Los valores p resultantes se utilizaron para determinar qué grupos fueron significativamente diferentes entre sí.

La expresión del estadístico de la prueba de Dunn es:

$$t = \frac{\bar{R}_I - \bar{R}_J}{SE}$$

dónde:

- \bar{R}_I and \bar{R}_J son los rangos medios de los dos grupos que se comparan.
- SE es el error estándar de la diferencia entre los dos rangos medios, calculado como:

$$SE = \sqrt{\frac{N(N+1)}{6} \left(\frac{1}{n_i} - \frac{1}{n_j} \right)}$$

dónde:

- N es el número total de observaciones.
- ni y nj son los tamaños de muestra de los dos grupos que se comparan.

Como corrección para pruebas múltiples utilizamos el método de Storey, que se basa en la tasa mínima de descubrimiento falso (FDR) a la que una prueba determinada se considera significativa.

Para los datos de 34 muestras diferentes, cada una con tres repeticiones, obtuvimos la prueba de Kruskal Wallis para ver si existen diferencias en los niveles de ocho AF. Los resultados se muestran a continuación.

Tabla 17. Resultados prueba Kruskal Wallis..

AF	Estadística	df	p-valor
AFB ₁	73.7	33	0.00006
AFB ₂	43.6	33	0.1030
AFG ₁	42.9	33	0.1170
AFG ₂	49.6	33	0.0316
AFL	51.0	33	0.0238
AFP ₁	48.3	33	0.0419
AFM ₁	39.7	33	0.1970
AFM ₂	60.4	33	0.0025

AFB₁

En el caso de AFB₁, la prueba inicial de Kruskal-Wallis indica que existe una diferencia significativa entre los grupos. Sin embargo, cuando se realizan comparaciones múltiples corrigiendo múltiples pruebas, ninguna de las comparaciones mantiene significancia.

La gráfica que muestra el comportamiento de las muestras según las múltiples pruebas sin corrección puede ser útil para visualizar patrones de datos, pero no debe usarse para inferir significancia estadística.

La letra a significa que las muestras son estadísticamente iguales.

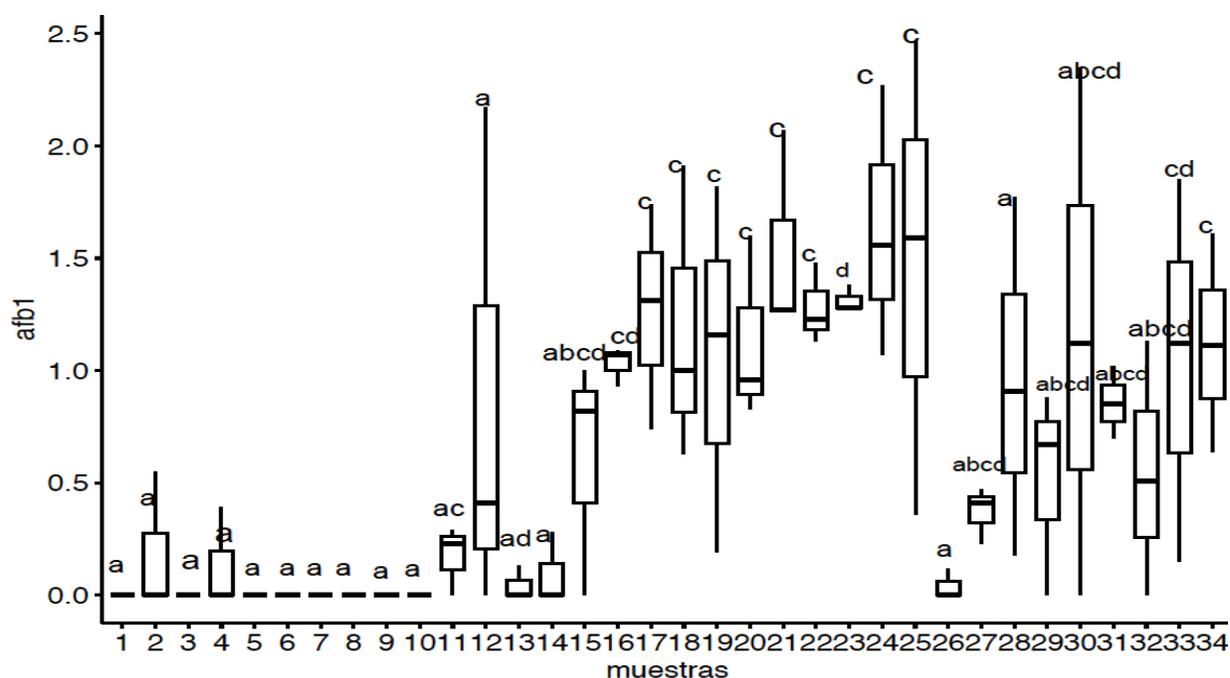


Figura 11. Prueba de Kruskal-Wallis para AFB₁.

El hecho más importante es que las muestras que no tienen la letra **a** son estadísticamente diferentes de cero.

AFG₂

En el caso de AFG₂, los resultados corregidos por FDR muestran que todas las muestras con concentraciones diferentes a cero son iguales, lo que significa que hay presencia de la aflatoxina o no.

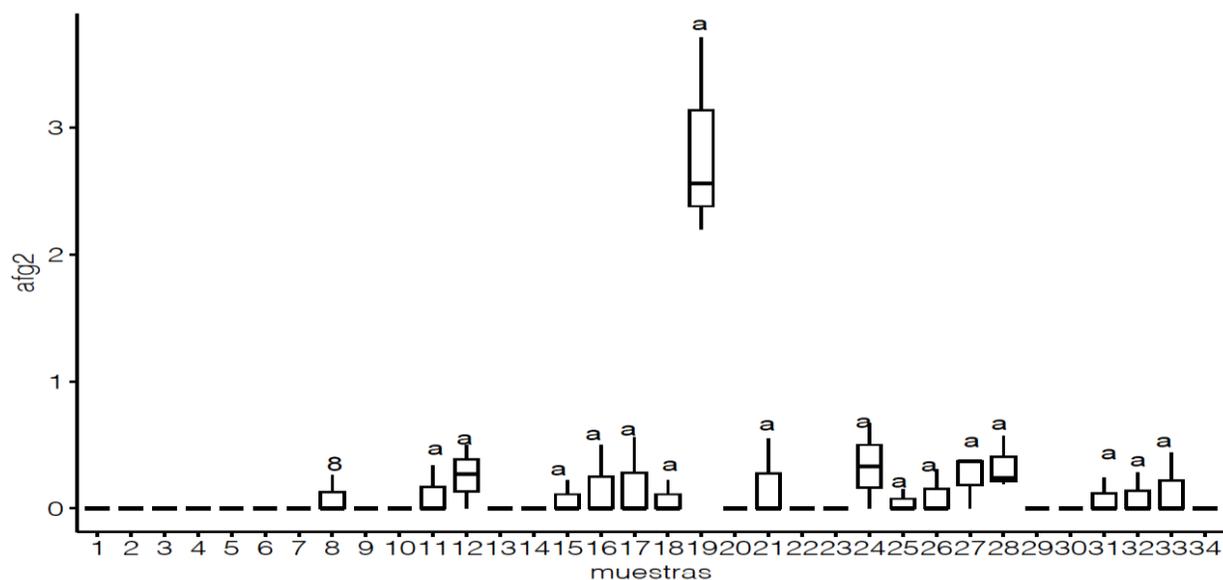


Figura 12. Prueba de Kruskal-Wallis para AFG₂.

Aflatoxicol

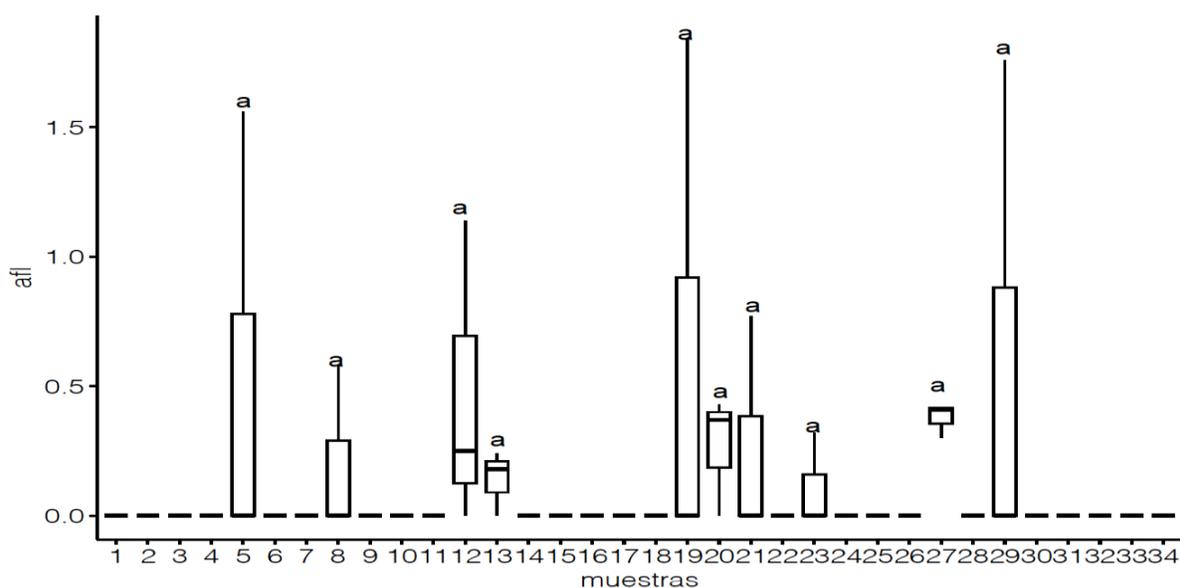


Figura 13. Prueba de Kruskal-Wallis para Aflatoxicol.

Los resultados corregidos por FDR muestran que todas las muestras con concentraciones diferentes a cero son iguales, significa que hay presencia de la AFL o no.

AFP₁

Para AFP₁, al corregir por comparaciones múltiples no encontramos diferencias, la gráfica representa los datos no corregidos. Toda muestra que no tenga la letra 'd' puede considerarse diferente de cero.

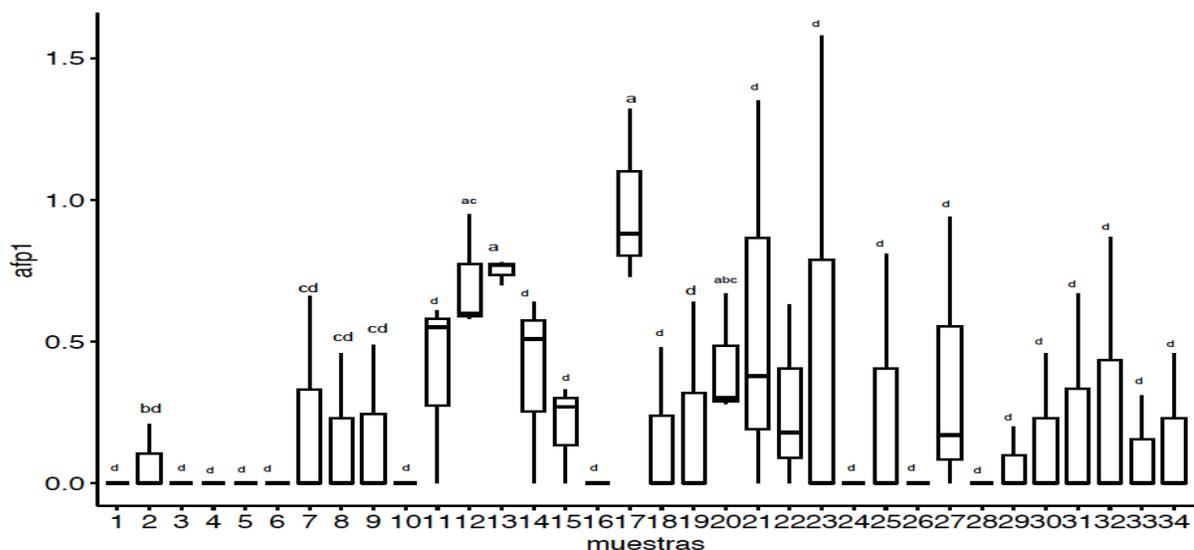


Figura 14. Prueba de Kruskal-Wallis para AFP₁.

AFM₂

Nuevamente, la corrección para pruebas múltiples hace que ninguna de las pruebas por pares sea significativa, por lo que presentamos los datos sin correcciones. La conclusión más importante es que las muestras 17 y 28 son diferentes de cero.

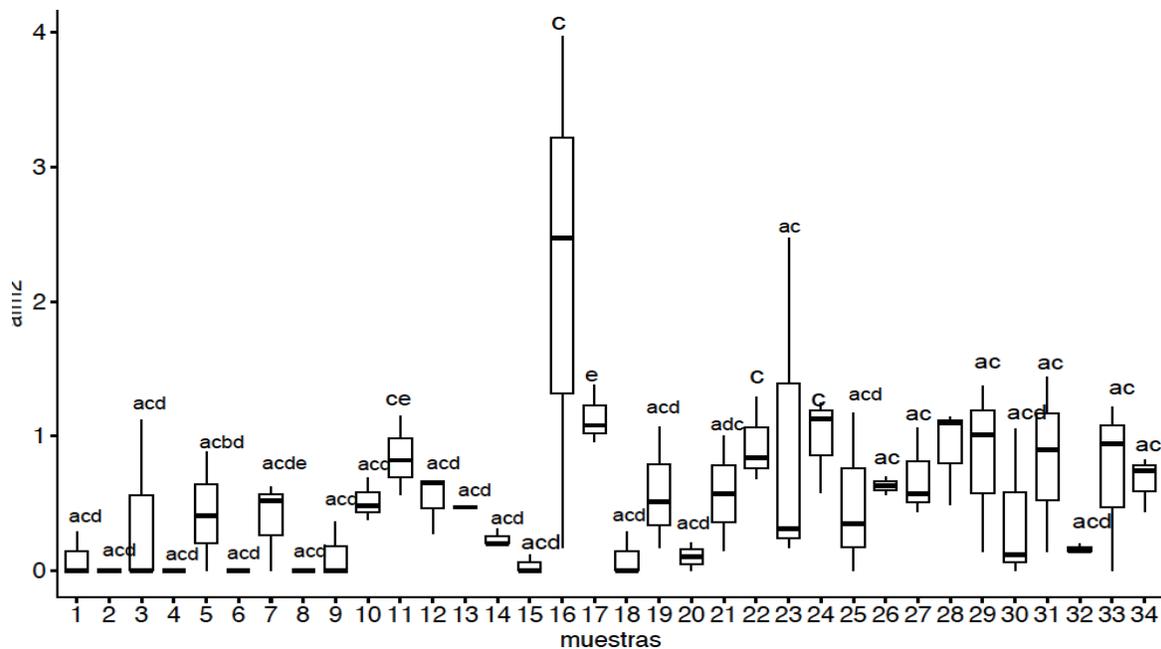


Figura 15. Prueba de Kruskal-Wallis para AFM₂.

Finalmente presentamos las gráficas correspondientes a AFB₂, AFG₁ y AFM₁.

AFB₂

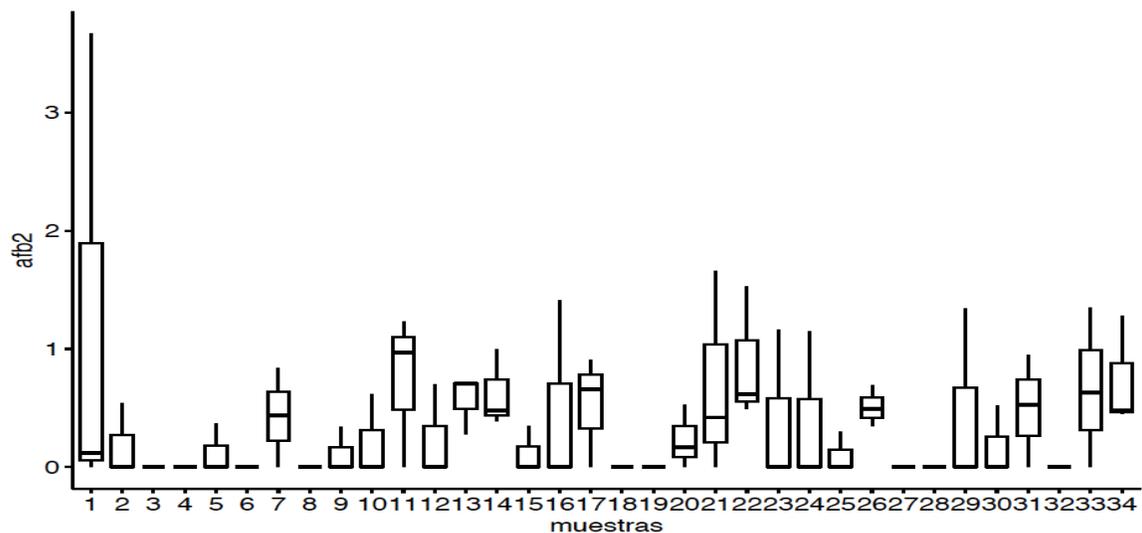


Figura 16. Prueba de Kruskal-Wallis para AFB₂.

No se pusieron letras como encabezados porque no hay una diferencia significativa.

AFG₁

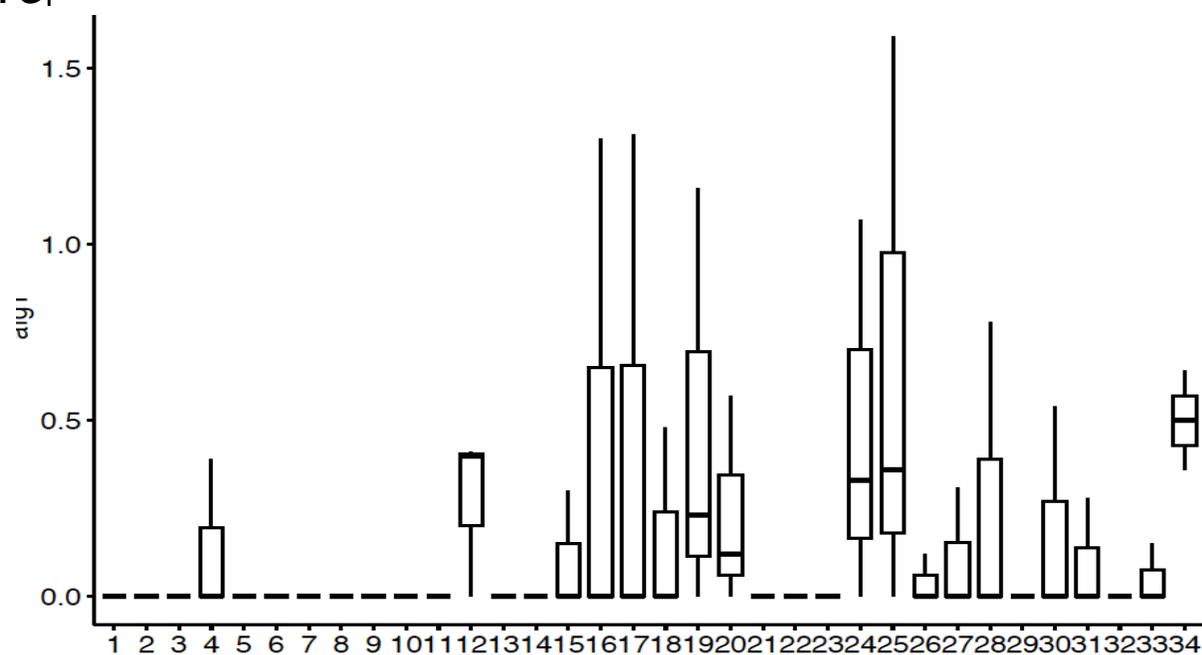


Figura 17. Prueba de Kruskal-Wallis para AFG₁.

AFM1

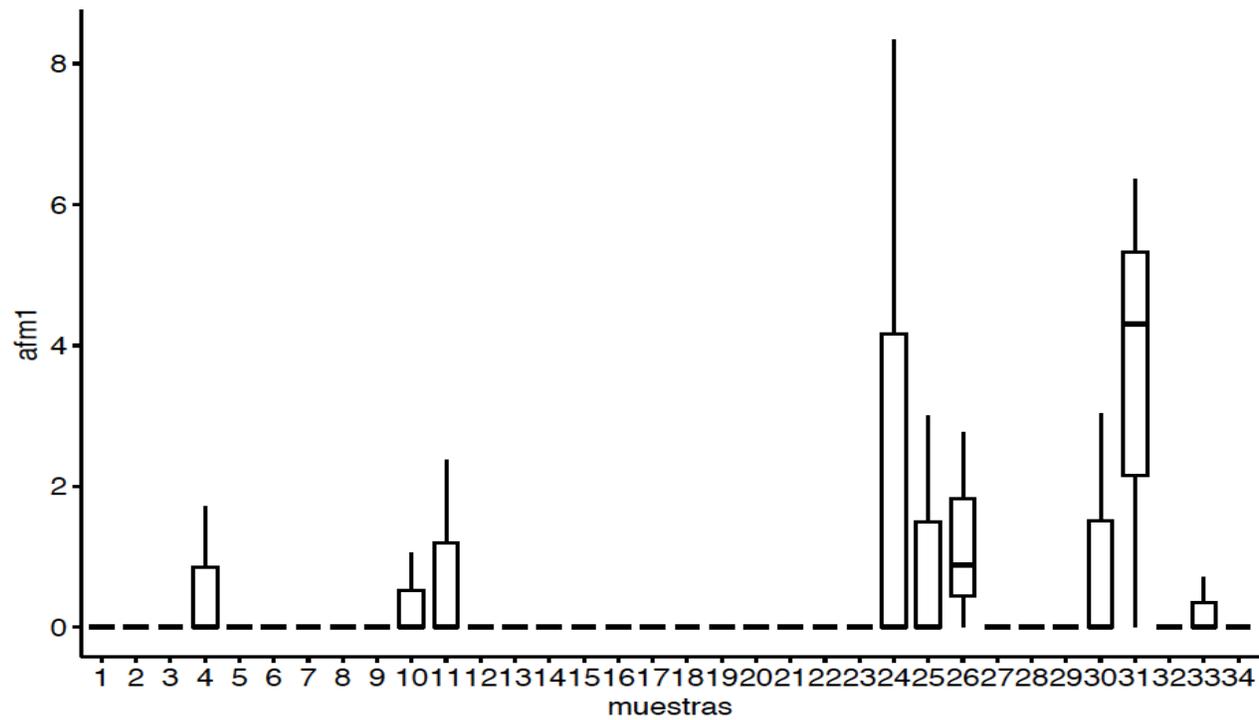


Figura 18. Prueba de Kruskal-Wallis para AFM_1 .

6. CONCLUSIONES

1. Se logró identificar y cuantificar las AF en muestras de botanas de maíz de la Ciudad de México
2. Los ingredientes reportados en el empaque son en su mayoría productos artificiales, pigmentos sintéticos y no corresponden a productos naturales, porque no aparecen las AF correspondientes en cada muestra.
3. El consumo continuo de estas botanas elaboradas a base de maíz podría considerarse riesgoso para la salud debido a las altas cantidades de AF que contienen ya por paquete.
4. La muestra 34 (Veggi Chips) no está elaborada a base de maíz y pese a estar elaborada de frutas y aceites, contiene cantidades de AF bastante elevadas.
5. Los Churrumais flamas (M19) resultaron ser la botana más contaminada con aflatoxinas, las cantidades de AFt es de 14,496.6 ng por paquete. Podemos concluir que presenta un riesgo al consumidor y un aporte importante de cancerígenos de alimentos.
6. Todos los empaques coincidían con el peso reportado e incluso algunos contenían más producto del que marcan en su envoltura.
7. Con excepción de las M24 Tostadas con nopal y M31 Nopalia, churros de nopal, ninguna contiene cantidades importantes de productos lácteos, lo que quiere decir que las botanas que dicen contener queso en realidad les agregan saborizantes artificiales.
8. Es importante conocer qué cantidad de estas botanas se consume desde edad temprana hasta adultos, pues es un riesgo para la salud.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abarca, L.M., Rosa Bragulat, M., Castellá, G., Accesi, F., Cabañes, F.J. 2000. Hongos productores de micotoxinas emergentes. *Revista Iberoamericana de Micología*. 17: S63-S68.
- Akiyama, H., Goda, Y., Tanaka, T., Toyoda, M. 2001. Determination of aflatoxins B1, B2, G1 y G2 in spices using a multifunctional column clean-up. *Journal of Chromatography A*, 932: 153-157.
- AOAC. 2005. Natural toxins in Official Methods of Analysis of AOAC international. Horwitz, W (Ed.). 17 th Edition. Trucksess, M.W. Chapter Editor. Chapter 49: Natural Toxins. Vol. II Food Composition Additives; Natural contaminants. Washington, D.C. USA. 1-42.
- Asao, T., Büchi, G., Abdel-Kader, M.M., Chang, S.B. Wick, E.L. y Wogan, G.N. 1965 Three structures of aflatoxins B and G1. *Journal of the American Chemistry Society*, 87:882-886.
- Bogantes-Ledezma, P. Bogantes-Ledezma, D. Bogantes-Ledezma, S. 2004. Aflatoxinas. *Acta Médica Costarricense*, 46 (4), 174-178.
- Büchi, G., Spitzner, D., Pagliarunga, S. & Wogan, G.N. 1973. Synthesis and toxicity evaluation of aflatoxin P1. *Life Sciences*, 13:1143-1149.
- Butler WH. 1974. Aflatoxin. Purchase IFH. *Mycotoxins*. Amsterdam: Elsevier. 1-28.
- Caloni, F., Stamatii A., Friggè G., De Angelis I. 2006. Aflatoxin M1 absorption and cytotoxicity on human intestinal *in vitro* model. *Toxicology Journal*, 47: 409-415.
- Chang, S.B., Abdel-Kader, M.M., Wick, E.L. & Wogan, G.N. 1963. Aflatoxin B2: Chemical identity and biological activity. *Science*, 142:1191-1192.
- Cornejo V.J., Villarroel G.O. 2007. Antecedentes generales sobre las aflatoxinas y otras micotoxinas y elementos a tener en cuenta para el diseño de prácticas correctas de cultivo y elaboración de nueces. Chile: Dpto. de Alimentos y Nutrición, Ministerio de Salud, División de Políticas Públicas Saludables y Promoción Departamento de Alimentos y Nutrición. 1-33.
- Cruz- Rueda, V. 2016. Curso de Validación de Métodos Analíticos. Centro de Capacitación. R.H. World SA de CV.
- Carvajal-Moreno, M. 2013. Transformación de la aflatoxina B1 de alimentos, en el cancerígeno humano, aducto AFB1-ADN. En *Revista especializada en ciencias químico-biológicas*. 109-120 pp. Ciudad de México: Depto. de Botánica, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Dalezios J.I., Wogan, G.N. & Weinreb, S.M. 1971. Aflatoxin P1: A new aflatoxin metabolite in monkeys. *Science*, 171:584-585.

- Detroy, R.W. & Hesselstine, C.W. 1970. Aflatoxicol: Structure of a new transformation product of aflatoxin B1. *Canadian Journal of Biochemistry*, 48:830-832.
- Ezekiel, C.N., Kayode, O.F., Fapohunda, S.C., Olorunfemi, M.F., Kponi, B.T. 2012. Mohos aflatoxigénicos y aflatoxinas en bocadillos vendidos en la calle en Lagos, Nigeria. *International Journal of Food Safety*, 14: 83-88.
- Fernández-Ibarra, R.P, García-Guerrero, D.C., de la Rosa-Millán, J., Chávez-Murillo, C.E. 2018. Botanas de Harina de Maíz Nixtamalizado y Hortalizas: Caracterización Nutricional Parcial, 3: 436-440.
- Gimeno, A. 2004. Aflatoxina M1 en la Leche. Riesgos para la Salud Pública, Prevención y Control. *Revista de la Associação Portuguesa dos Industriais de Alimentos Compostos para Animais (IACA)*, N° 49: 32-44.
- Hartley, R.D., Nesbitt. B.F. & O'Kelly, J. 1963. Toxic metabolites of *Aspergillus flavus*. *Nature*, 198:1056-1058.
- Holzapfel, C.W., Steyn. P.S. & Purchase. I.F.H. 1966. Insolation and structure of aflatoxins M1 and M2. *Tetrahedron Letters*, 25:2799-2803.
- Kayode OF, Sulyok M, Fapohunda SO, Ezekiel CN, Krska R, Oguntona CRB. 2013. Mycotoxins and Fungal metabolites in groundnut- and maize-based snacks from Nigeria. *Food Additives and Contaminants*, 6: 294-300.
- Kok, W. 1994. Derivatization reactions for the determination of aflatoxins by liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography B*, 659: 127-137.
- Krishnamachari ,K.A.V.R., Bhat, R.V., Nagarajan, V., Tilak, T.B.G.1975. Hepatitis or aflatoxicosis. *The Lancet*, 1: 1061-1066.
- Lindner, E. 1995. *Toxicología de alimentos*. 2ª Edición. 117-123. Ed. Acribia. Zaragoza, España.
- Londoño, E.M., & Martínez, M.M., 2017. Aflatoxinas en alimentos y exposición dietaria como factor de riesgo para el carcinoma hepatocelular. *Scielo.*, 16: 53-66.
- Martínez, M., María M., Vargas del Río, Liliana María, & Gómez Quintero, Verónica María. 2013. Aflatoxinas: incidencia, impactos en la salud, control y prevención. *Biosalud*, 12: 89-109.
- Masri, M.S., Haddon, W.F., Ludin, R.E. & Hsieh, D.P.H. 1974. Aflatoxin Q1: A newly identified major metabolite of aflatoxin B1 in monkey liver. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 22:512-514.
- Masri, M.S., Booth, A.N. & Hsieh, D.P.H. 1974b. Comparative metabolic conversion of aflatoxin B1 to aflatoxin M1 and aflatoxin Q1 by monkey, rat and chicken liver. *Life Science*,15:203-212.

- Peraica, M., Radic, B., Lucic, A. & Pavlovic, M. 1999. Efectos tóxicos de las micotoxinas en el ser humano. *Boletín de la Organización Mundial de la Salud: la revista internacional de salud pública*, 77:754-766.
- NOM-188-SSA1-2002. Control de aflatoxinas en cereales para consumo humano y animal. *Diario Oficial de la Federación*. 2002.
- NOM-247-SSA1-2008. Productos y servicios. Cereales y sus productos. Cereales, harinas de cereales, sémolas o semolinas. Alimentos a base de: cereales, semillas comestibles, de harinas, sémolas o semolinas o sus mezclas. Productos de panificación. Disposiciones y especificaciones sanitarias y nutrimentales. Métodos de prueba. *Diario Oficial de la Federación*. 2008.
- Novoa, J.U., Díaz, G. 2006. Aflatoxinas: mecanismos de toxicidad en la etiología de cáncer hepático celular. *Revista de la Facultad de Medicina*, 54: 108-116.
- OPS, Organización Panamericana de la Salud. 1983. *Criterios de la Salud Ambiental 11. Micotoxinas*. Publicación Científica 453. Organización Mundial de la Salud. Washington D.C. USA. 1-131.
- R-Biopharm Rhône LTD. 2021. Easi-Extract®. Product Code RP71/RP70N Glasgow UK, G20:12pp.
- Requena, F., Saume, E. & León, A. 2005. Micotoxinas: Riesgos y prevención. *Revista Zootecnia Tropical*, 23. ISSN 0798-7269.
- Ríos, O.R. 1989. *Tecnología de botanas*. Facultad de Química Universidad Autónoma de Querétaro, Tesis para obtener el título de IQA.
- Santos, O.M. 1999. Importancia y efectos de la aflatoxina en los seres humanos. Bucaramanga. *Revista de MEDUNAB*. 2:124-129.
- Steyn, P.S., Vlegaar, R., Vessels, P.L. 1980. The biosynthesis of aflatoxin and its congeners. *The biosynthesis of mycotoxins: a study in secondary metabolisms*. New York: Academic Press. 104-155. ISBN 0-12-670650-6.
- Wang, J-S. & Groopman, J.D. 1999. DNA damage by mycotoxins. *Mutation Research*, 424: 167-181.
- Yunus, A.W., Razzazi-Fazeli, E., Bohm, J. 2011. Aflatoxin B (1) in affecting broiler's performance, immunity, and gastrointestinal tract: a review of history and contemporary issues. *Toxins* 3: 566-590.