



**UNIVERSIDAD DE CUENCA**

**“MAESTRÍA EN TOXICOLOGÍA INDUSTRIAL Y AMBIENTAL”**

**RIESGO TOXICOLÓGICO DE AFLATOXINAS PRESENTES EN  
MANÍ Y NUECES COMERCIALIZADOS EN LOS PRINCIPALES  
MERCADOS DE LA CIUDAD DE CUENCA**

**TESIS PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO  
DE MAGISTER EN TOXICOLOGÍA INDUSTRIAL Y  
AMBIENTAL**

**AUTORA: Dra. Diana Catalina Chalco Quezada**

**DIRECTORA: Dra. Silvana Patricia Donoso Moscoso MSc.**

**ASESORA: Bioq.Farm. Silvia Johana Ortiz Ulloa**

**CUENCA, ECUADOR**

**2014**



## RESUMEN

Las aflatoxinas son micotoxinas producidas por hongos del género *Aspergillus*, especialmente *flavus* y *parasiticus*, las cuales generan problemas agudos y crónicos para la salud de las personas, siendo el más grave el desarrollo de cáncer hepático producido por la AFB1. Lo preocupante es que pueden proliferar en muchos alimentos, entre ellos los frutos secos, que en la actualidad se consumen con cierto grado de frecuencia por su relación con la baja tasa de mortalidad por enfermedades cardiovasculares y por sus importantes propiedades nutritivas. El objetivo principal de esta investigación fue el de determinar el riesgo toxicológico al que están expuestos los consumidores, en función de la concentración de aflatoxinas en muestras de maní y nuez que se expenden a granel en los mercados de la ciudad de Cuenca, y de la dosis, frecuencia y forma de consumo de estos alimentos, información recolectada mediante encuestas a un segmento de la población. El método utilizado para la determinación de dichas toxinas fue el de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) acoplada a un detector de fluorescencia, previa purificación de la muestra mediante columnas de inmunoafinidad (CIA). Las concentraciones encontradas de aflatoxinas, tanto en las muestras de nuez como de maní no sobrepasaron los límites permitidos por las normas internacionales, a excepción de una muestra de maní que presentó un valor muy alto de AFG1 y AFB1, lo cual de alguna manera obliga a las entidades pertinentes a realizar muestreos y análisis permanentes y establecer normas ecuatorianas para control de aflatoxinas en los alimentos, acordes a nuestra realidad. El riesgo toxicológico, se determinó por el método de Simulación de Monte Carlo.

Palabras clave: maní, nuez, aflatoxinas, HPLC, riesgo toxicológico.



## ABSTRACT

Aflatoxins are mycotoxins produced by fungi of the genus *Aspergillus*, especially *flavus* and *parasiticus*, which produce acute and chronic problems for the health of the people, the most serious being the development of liver cancer produced by the AFB1. What is worrying is that they can proliferate in many foods, including nuts, which nowadays are consumed with some degree of frequency by its relationship with the low rate of mortality for cardiovascular diseases and their important nutritional properties. The main objective of this research was to determine the toxicological risk to which they are exposed consumers, depending on the concentration of aflatoxin in samples of peanut and nut that are sold in bulk in the markets of city of Cuenca, and the dose, frequency and form of these food consumption, information collected through surveys a group of the population. The method used for the determination of these toxins was High Performance Liquid Chromatography (HPLC) coupled with a fluorescence detector, prior purification of the sample by means of immunoaffinity column (IAC). Found concentrations of aflatoxins, both signs of walnut and peanut not exceeded the limits permitted by international standards, with the exception of a sample of peanut that I present a very high value of AFG1 and AFB1, which somehow forces relevant entities to carry out samplings and permanent analysis and establish standards Ecuadorian for control of aflatoxin in food according to our reality. The toxicological risk, was determined by the method of Monte Carlo simulation.

Key words: peanut, walnut, aflatoxins, HPLC, toxicological risk.



## ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN.....	2
ABSTRACT .....	3
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	4
ÍNDICE DE TABLAS .....	7
ÍNDICE DE FIGURAS.....	8
ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA .....	9
AGRADECIMIENTO .....	12
DEDICATORIA .....	13
CAPÍTULO I .....	14
INTRODUCCIÓN.....	14
CAPÍTULO II .....	18
FRUTOS SECOS Y AFLATOXINAS .....	18
2.1 FRUTOS SECOS.....	18
2.1.1 Definición .....	18
2.1.2 Importancia en la salud.....	18
2.2 MICOTOXINAS .....	20
2.2.1 Generalidades.....	20
2.2.2 Condiciones ideales para el crecimiento de micotoxinas.....	21
2.3 AFLATOXINAS.....	23
2.3.1 Antecedentes Generales .....	23
2.3.2 Aspergillus como agente productor de aflatoxinas .....	25
2.3.3 Condiciones de contaminación.....	26
2.3.4 Biosíntesis de aflatoxinas .....	27
2.3.5 Características químicas .....	29
2.3.6 Biotransformación de las aflatoxinas .....	30
2.4 TOXICIDAD DE AFLATOXINAS.....	32
2.4.1 Mecanismos de carcinogenicidad de la AFB1.....	34
2.4.2 Efecto mutagénico.....	36
2.4.3 Efecto tóxico.....	37
2.4.4 Asociación de AFB1 con otras enfermedades hepáticas.....	38



2.4.5 Biomarcadores de exposición a AFB1 .....	38
2.5 DETECCIÓN DE AFLATOXINAS .....	39
2.6 NORMATIVAS PARA AFLATOXINAS EN ALIMENTOS .....	42
2.6.1 Normativa Internacional .....	43
2.7 ACCIONES PARA EVITAR, CONTROLAR Y DESINFECTAR PRODUCTOS DE HONGOS Y AFLATOXINAS .....	44
2.8 EVALUACIÓN DE RIESGO .....	46
2.8.1 Determinación del peligro .....	47
2.8.2 Caracterización del peligro .....	47
2.8.3 Evaluación de la exposición .....	47
2.8.4 Caracterización del riesgo .....	48
CAPÍTULO III .....	49
METODOLOGÍA .....	49
3.1 TIPO DE ESTUDIO .....	49
3.2 DESARROLLO DE LA INVESTIGACIÓN .....	50
3.2.1 Población, muestra y muestreo .....	50
3.2.1.1 Población .....	50
3.2.1.2 Tamaño de la muestra y muestreo .....	50
3.2.2 Recolección de datos, métodos y técnicas .....	51
3.2.2.1 Aplicación de encuestas .....	51
3.2.3 Determinación de Aflatoxinas .....	52
3.2.3.1 Recolección de muestras .....	53
3.2.3.2 Materiales, equipos y reactivos .....	53
3.2.3.3 Procedimiento .....	54
3.3 VALIDACIÓN DEL MÉTODO .....	61
3.3.1 Especificidad .....	62
3.3.2. Linealidad .....	62
3.3.3. Sensibilidad .....	62
3.3.4. Recuperación (Recovery) .....	63
3.3.5. Exactitud .....	64
3.3.6. Precisión .....	64
3.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	64
3.5 SIMULACIÓN DE MONTE CARLO .....	66



3.6 EVALUACIÓN DEL RIESGO .....	66
CAPÍTULO IV.....	69
RESULTADOS.....	69
4.1 GENERALIDADES DE LA POBLACIÓN ESTUDIADA .....	69
4.2 PATRONES DE CONSUMO .....	69
4.3 RECORDATORIO DE 24 HORAS.....	75
4.4 FRECUENCIA DE CONSUMO .....	76
4.5 CARACTERÍSTICAS DEL MUESTREO PARA EL ANÁLISIS DE MICOTOXINAS.....	77
4.6 RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE AFLATOXINAS .....	78
4.7 RESULTADOS DE LA VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA.....	82
4.7.1 Curvas de calibración.....	82
4.7.2 Límite de detección .....	84
4.7.3 Recuperación.- .....	84
4.7.4 Precisión.- .....	85
4.8 ANÁLISIS PROBABILÍSTICO .....	86
4.9 EVALUACIÓN DE RIESGO .....	86
4.9.1 Resultados.....	87
CAPÍTULO V .....	92
DISCUSIÓN .....	92
CAPÍTULO VI.....	95
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	95
6.1 CONCLUSIONES.....	95
6.2 RECOMENDACIONES .....	97
BIBLIOGRAFÍA.....	99
ANEXOS.....	104



## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1: CLASIFICACIÓN DE LAS MICOTOXINAS SEGÚN LA IARC	34
TABLA 2: TD50, TDI, NOAEL PARA AFLATOXINAS	43
TABLA 3: NIVELES PERMITIDOS DE AFLATOXINAS EN ALGUNOS PAÍSES	44
TABLA 4: CONDICIONES PARA HPLC	60
TABLA 5: DISTRIBUCIÓN DE LA POBLACIÓN ESTUDIADA	69
TABLA 6: CONSUMO DE NUEZ Y MANÍ EN LA POBLACIÓN ESTUDIADA	70
TABLA 7: RELACIÓN EDAD - CONSUMO DE MANÍ Y NUEZ	70
TABLA 8: NUEZ: ENCUESTA 24HR - COMPARACIÓN EN PROMEDIO, DESVIACIÓN ESTANDAR Y MÍNIMO Y MÁXIMO	76
TABLA 9: MANÍ: ENCUESTA 24HR. COMPARACIÓN EN PROMEDIO, DESVIACIÓN ESTANDAR Y MÍNIMO Y MÁXIMO	76
TABLA 10: PROMEDIO DE FRECUENCIA DE CONSUMO (FFQ)	77
TABLA 11: DISTRIBUCIÓN DE MUESTRAS POR MERCADO	77
TABLA 12: CONCENTRACIÓN DE AFLATOXINAS EN MUESTRAS DE NUEZ POR MERCADO	78
TABLA 13: CONCENTRACIÓN DE AFLATOXINAS EN MUESTRAS DE MANÍ POR MERCADO	78
TABLA 14: TOTAL DE MUESTRAS POSITIVAS POR MERCADO	79
TABLA 15: NUEZ: NÚMERO DE MUESTRAS POSITIVAS, CONCENTRACIÓN PROMEDIO, DESVIACIÓN ESTANDAR Y RANGO	81
TABLA 16: MANÍ: NÚMERO DE MUESTRAS POSITIVAS, CONCENTRACIÓN PROMEDIO, DESVIACIÓN ESTANDAR Y RANGO	81
TABLA 17: VALIDACIÓN DEL MÉTODO: LÍMITE DE DETECCIÓN, LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN, PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN, REPETIBILIDAD INTRA-DAY E INTER-DAY	85
TABLA 18: NUEZ: DISTRIBUCIÓN AJUSTADA, MEDIA, MÍNIMOS Y MÁXIMOS DE LAS CONCENTRACIONES DE AFLATOXINAS ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) POR GRUPO DE ALIMENTO Y DE LA INGESTA DE MANÍ Y NUEZ ( $\text{kg}/\text{kg}$ pc/día)	89
TABLA 19: MANÍ: DISTRIBUCIÓN AJUSTADA, MEDIA, MÍNIMOS Y MÁXIMOS DE LAS CONCENTRACIONES DE AFLATOXINAS ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) POR GRUPO DE ALIMENTO Y DE LA INGESTA DE MANÍ Y NUEZ ( $\text{kg}/\text{kg}$ pc/día)	89
TABLA 20: RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN DE RIESGO DE EXPOSICIÓN A AFLATOXINAS POR LA INGESTA DE NUEZ Y MANÍ ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ pc/día)	90
TABLA 21: COCIENTE DE PELIGRO PARA LAS DIFERENTES AFLATOXINAS	90



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Aspergillus flavus	26
Figura 2: Aspergillus parasiticus	26
Figura 3: Biosíntesis de la Aflatoxina B1	28
Figura 4: Estructura de aflatoxinas B1,B2,G1,G2	30
Figura 5: Biotransformación de aflatoxinas	32
Figura 6: Esquema del proceso de purificación con columnas de inmunoafinidad	42
Figura 7: Muestras trituradas	54
Figura 8: Homogenizador y filtración de muestras	55
Figura 9: Centrífuga EBA-20	55
Figura 10: Sistema Manifold y columnas de inmunoafinidad	56
Figura 11: Generador de nitrógeno - secado	57
Figura 12: Vial con filtrado	57
Figura 13: Equipo para HPLC	61
Figura 14: Representación esquemática del estudio de evaluación de riesgo	67
Figura 15: Relación edad – consumo (g/día)	71
Figura 16: Formas de consumo de nuez: 15 - 18 años	71
Figura 17: Formas de consumo de nuez: 19 -34 años	72
Figura 18: Formas de consumo de nuez: 35 - 55 años	72
Figura 19: Formas de consumo de maní: 15 - 18 años	73
Figura 20: Formas de consumo de maní: 19 - 34 años	73
Figura 21: Formas de consumo de maní: 35 - 55 años	74
Figura 22: Preferencia de forma de consumo de nuez de acuerdo al sexo	74
Figura 23: Preferencia de forma de consumo de maní de acuerdo al sexo	75
Figura 24: Cromatograma muestra de maní # 11	80
Figura 25: Cromatograma muestra de maní # 28	80
Figura 26: Cromatograma muestra negativa	80
Figura 27: Muestras contaminadas con aflatoxinas, por mercado	82
Figura 28: Muestras contaminadas con aflatoxinas por alimento	82
Figura 29: Curva de calibración para AFG2	83
Figura 30: Curva de calibración para AFG1	83
Figura 31: Curva de calibración para AFB2	84
Figura 32: Curva de calibración para AFB1	84
Figura 33: Distribución - nuez	87
Figura 34: Distribución - maní	88



## ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA

AFs	Aflatoxinas
AFB1	Aflatoxina B1
AFB2	Aflatoxina B2
AFG1	Aflatoxina G1
AFG2	Aflatoxina G2
AOAC	Association of Analytical Chemist
Aw	Actividad de agua
ATSDR	Agencia para sustancias tóxicas y registro de enfermedades
CAE	Código Alimentario Español
CIA	Columna de inmunoafinidad
EFSA	Autoridad Europea de Seguridad alimentaria
FAO	Food and Agriculture Organization
FDA	Food and Drug Administration
FFQ	Encuesta frecuencia de consumo
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IARC	International Agency Research Cancer
NOAEL	Nivel sin efecto adverso observado
OMS	Organización Mundial de la Salud
PCR	Reacción en cadena de polimerasa
PBS	Buffer fosfato salino
TDI	Ingesta Diaria Tolerable
TD50	Dosis tóxica 50
UE	Unión Europea
24HR	Encuesta 24 horas



Universidad de Cuenca  
Clausula de derechos de autor

---

Yo, *Dra. Diana Catalina Chalco Quezada*, autora de la tesis "RIESGO TOXICOLÓGICO DE AFLATOXINAS PRESENTES EN MANÍ Y NUECES COMERCIALIZADOS EN LOS PRINCIPALES MERCADOS DE LA CIUDAD DE CUENCA", reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su Reglamento de Propiedad Intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de (título que obtiene). El uso que la Universidad de Cuenca hiciere de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autora.

Cuenca, Abril de 2014

Dra. Diana Catalina Chalco Quezada

0101975191



Universidad de Cuenca  
Clausula de propiedad intelectual

Yo, *Dra. Diana Catalina Chalco Quezada*, autora de la tesis "RIESGO TOXICOLÓGICO DE AFLATOXINAS PRESENTES EN MANÍ Y NUECES COMERCIALIZADOS EN LOS PRINCIPALES MERCADOS DE LA CIUDAD DE CUENCA", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, Abril de 2014

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Diana Chalco", written over a horizontal line.

Dra. Diana Catalina Chalco Quezada

0101975191



## **AGRADECIMIENTO**

A mi Dios, por permitirme cumplir con una meta más en mi vida.

Mi sincero agradecimiento a la Dra. Silvana Donoso Moscoso MgSc., Decana de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca y Directora de este trabajo, quien con su gran experiencia y conocimiento supo guiar de manera acertada esta investigación. Un especial agradecimiento a mi asesora, Bioq. Farm. Johana Ortiz Ulloa, investigadora del Laboratorio de Nutrición y Alimentos de la Universidad de Cuenca, quien a más de demostrar su gran vocación de maestra y su experiencia en la investigación científica, sobre todo fue la amiga y consejera incondicional.

Diana Chalco Quezada



## DEDICATORIA

El esfuerzo y la lucha constante por ser mejor, tanto en la parte profesional como en la humana, conllevan a la satisfacción personal y a la tranquilidad de vivir cumpliendo con los roles que nos corresponden como profesionales, padres y ciudadanos. Este trabajo va dedicado con mucho cariño a mi esposo, Hernán y a mis hijos Andrés y José Daniel, quienes son el impulso para seguir siempre adelante y que de una u otra manera me acompañaron en esta etapa de mi vida.

Diana Chalco Quezada



## CAPÍTULO I

### INTRODUCCIÓN

Las toxinas producidas por hongos, más conocidas como micotoxinas, se han convertido en el contaminante natural de alimentos más extendido a nivel mundial, causando un gran impacto negativo en la salud, en la seguridad alimentaria y en la economía de muchos países. En este grupo se encuentran las llamadas Aflatoxinas, producidas por hongos del género *Aspergillus*, especialmente las especies *flavus* y *parasiticus*, que se caracterizan por desarrollarse rápidamente en ambientes propicios para ello, temperaturas entre 14 y 35°C y humedad relativa entre 80 y 85%. El agente se encuentra en el suelo y crece rápidamente sobre materia en descomposición, por lo que puede atacar a los cultivos en el campo antes de la cosecha, también puede darse una contaminación postcosecha si los factores ambientales lo permiten y no es raro que haya una contaminación en las materias almacenadas por la infestación de insectos y roedores. (Cornejo & Villarroel, 2006)

Existen cuatro tipos importantes de aflatoxinas: G2, G1, B2 y B1, y los productos metabólicos adicionales M1 y M2. Se han asociado a varias enfermedades en ganado, animales domésticos y seres humanos. Las aflatoxinas han sido más tomadas en consideración para diferentes estudios toxicológicos, debido a que son más nocivas que otros tipos de micotoxinas, pues está comprobado que son carcinogénicas, además de presentar efectos mutagénicos y teratogénicos, lo cual se ha demostrado en estudios realizados en animales de laboratorio. (Cornejo & Villarroel, 2006). Estas toxinas de origen fúngico han sido consideradas por muchos autores como un problema de salud pública por sus efectos a largo plazo en la población expuesta de manera repetitiva. (Morris Navarro, 2011)



La principal vía de exposición a las aflatoxinas es la oral, mediante el consumo de alimentos contaminados con las toxinas. Los hongos capaces de sintetizar toxinas, colonizan los alimentos desde su producción en el campo, en la cosecha y/o en el manejo postcosecha y, cuando se dan las condiciones ambientales apropiadas, desarrollan las sustancias tóxicas, las cuales pueden permanecer en el alimento aun cuando éste sea sometido a tratamientos térmicos o de transformación para su posterior consumo. Adicionalmente, cuando los animales de cría para consumo humano se alimentan con productos contaminados pueden desarrollar patologías directamente y/o metabolizar las toxinas de manera que se originan otros metabolitos tóxicos, que finalmente son transmitidos, por ejemplo, a través de la leche destinada al consumo humano. En este sentido todos los alimentos y materias primas en los cuales los hongos toxicogénicos pueden desarrollarse, constituyen sustratos apropiados para la síntesis de micotoxinas y son susceptibles de presentarlas. (Morris Navarro, 2011)

Entre los productos en los que se ha encontrado la presencia de aflatoxinas, están los frutos secos y entre ellos especialmente las nueces y el maní, productos que actualmente se consumen de manera regular por sus propiedades nutritivas.

El presente estudio se enfocó en la determinación de los niveles de aflatoxinas en muestras de nueces y maní que se expenden a granel en los mercados de la ciudad de Cuenca, utilizando como método de análisis la Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detector de fluorescencia, previo el uso de columnas de inmunoafinidad (CIA) para la purificación de muestras. Por otro lado, se complementó la información con la aplicación de encuestas a un segmento de la población, en edades comprendidas entre 15 y 55 años, en las que se obtuvo información importante como la frecuencia, dosis y forma de consumo. Dichos datos fueron utilizados para la evaluación del riesgo toxicológico de la población, por medio de un análisis probabilístico.



La hipótesis planteada para iniciar la presente investigación fue:

- El contenido de aflatoxinas presentes en maní y nueces que se expenden en los mercados de la ciudad de Cuenca, está dentro de los valores permitidos por las normas nacionales e internacionales, por lo que su consumo no constituye un riesgo toxicológico para la población.

Además se propusieron los siguientes objetivos para demostrar dicha hipótesis:

#### OBJETIVO GENERAL

- Establecer el riesgo toxicológico para la población cuencana, por ingesta de aflatoxinas procedentes de maní y nueces que se expenden a granel en los principales mercados de la ciudad de Cuenca.

#### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar por HPLC la concentración de aflatoxinas en muestras representativas de maní y nueces que se expenden a granel, obtenidas en locales comerciales mayoristas situados en los principales mercados de la ciudad de Cuenca.
- Aplicar encuestas en un segmento de la población para determinar la frecuencia de consumo de este tipo de frutos.
- Comparar los resultados obtenidos con los valores establecidos en la normativa nacional e internacional vigentes y establecer si existe riesgo toxicológico para el ser humano.

Una vez culminado el estudio, se puede afirmar que se cumplieron a cabalidad los objetivos propuestos, lo que permitió comprobar en forma positiva la hipótesis planteada, ya que por una parte, la concentración de aflatoxinas (AFB1, AFB2, AFG1, AFG2), en las muestras analizadas de maní y nuez, se encuentran en niveles inferiores a los parámetros establecidos por las Normas Internacionales, que es de 2-5 $\mu$ g/kg, a excepción de una sola muestra de maní



que presentó un nivel alto de contaminación. Por otra parte, con los datos obtenidos en las encuestas realizadas a la población (dosis, frecuencia y forma

de consumo), se ratificó mediante la simulación de Monte Carlo, que no existe riesgo toxicológico para los consumidores.

Sin embargo, no se puede descartar la posibilidad de que en algún momento se pueda correr el riesgo de que se presenten muestras con un alto nivel de contaminación con aflatoxinas, por cuanto las condiciones agrícolas, de cosecha, de conservación y procesamiento están en continuo cambio.

Con la presente investigación se pretende que los resultados obtenidos constituyan un aporte para el conocimiento de algunos problemas de salud a nivel local creando conciencia en la ciudadanía; y que además, pueda servir como propuesta para nuevas investigaciones, cuya recopilación de datos constituyan la base para implementar políticas regulatorias en nuestro país que hasta la fecha no existen.



## CAPÍTULO II

### FRUTOS SECOS Y AFLATOXINAS

#### 2.1 FRUTOS SECOS

##### 2.1.1 Definición

El Código Alimentario Español (CAE) define los frutos secos como “aquéllos cuya parte comestible posee en su composición menos del 50 por 100 de agua”.

Una fruta seca es aquella que por la condición de su cáscara o por haber sido sometida a un proceso de desecación, es conservada durante todo el año para ser consumida. Por lo general estos frutos se consumen en cantidades pequeñas, pero aportan sustancias nutritivas de interés. Se trata de semillas oleaginosas cubiertas de una cáscara de dureza variable que proceden de determinadas plantas, entre los más consumidos encontramos a: almendras, avellanas, maní (leguminosa), nueces, pistachos, semillas de calabaza, semillas (pipas) de girasol y ajonjolí. (Vásquez, Cos, López, & Alcaraz, 2005)

##### 2.1.2 Importancia en la salud

Los frutos secos son muy ricos en algunos elementos beneficiosos para la salud. La grasa monoinsaturada (el ácido oleico y linoleico) presente en avellanas, almendras, nueces de macadamia y pistachos, y la grasa poliinsaturada (ácidos grasos omega 3) presente sobre todo en la nuez, hace que este tipo de alimentos constituyan una fuente de energía primordial, lo que implica un importante valor calórico. Aportan entre 5,6 y 6,4 Kcal por gramo de alimento. Todos ellos contienen cantidades apreciables de vitamina E,  $\beta$  carotenos, licopeno y otros componentes que tienen propiedades antioxidantes, lo que parece concederle un carácter protector frente a enfermedades, como ciertos tipos de cáncer, sobre todo intestinales. Poseen



la mayoría de las vitaminas B, que unidas a la cantidad de sales minerales fundamentadas en metales tales como el fósforo, potasio, el magnesio, el cobre, el hierro, etc. Su contenido en calcio ayuda a prevenir la osteoporosis, los que más calcio tienen son las almendras (240 mg/100 g) las nueces de Brasil (170 mg/100 g) y las avellanas (140 mg/100 g). Salvo las castañas, apenas aportan carbohidratos, pues éstos constituyen entre el 5 y 20% de su composición. (Nucis, 2005)

Su concentración en proteínas es elevada si se compara con el resto de alimentos de origen vegetal, aportan entre 13 y 26 g de proteínas / 100g de alimento; las nueces y las almendras son los que poseen mayor contenido de este tipo de nutrientes, incluso más que los huevos. La calidad de la proteína del cacahuete es menor, pero se puede complementar con el consumo de legumbres. (Nucis, 2005)

Los frutos secos son ricos en fibra, su contenido es de 6 a 15 g/100g de fruto seco y su ingesta produce un tránsito rápido de alimentos por el tracto intestinal. Una dieta rica en aquellos previene del estreñimiento y de enfermedades intestinales como la diverticulosis. La fibra tiene como misión retrasar la absorción de azúcar, lo que permite disponer de la energía progresivamente y durante más tiempo sin que sea convertida a grasas. Una ingesta adecuada de fibra dietética está relacionada con menor riesgo de enfermedad coronaria, menor incidencia de cánceres, mejor control de la diabetes y mejor control del peso corporal. (Nucis, 2005)

Reducen los niveles de colesterol total y colesterol LDL, contribuyendo así muy probablemente a una disminución a la incidencia y a la mortalidad por enfermedades cardiovasculares. Se destaca la elevada proporción de arginina, aminoácido precursor del óxido nítrico, un compuesto esencial en la función vascular. (Nucis, 2005)



Parece entonces demostrado el efecto beneficioso que tienen los frutos secos sobre la salud cardiovascular, por lo que se recomienda consumirlos en pequeñas cantidades en forma habitual, 30g – 40 g por día. (González Mora, 2010)

## 2.2 MICOTOXINAS

### 2.2.1 Generalidades

Los hongos son los principales responsables de las pérdidas que sufren anualmente los cultivos agronómicos, tanto antes como después de su recolección, además de ser una fuente de contaminantes tóxicos como son las micotoxinas. (Benítez Burraco, 2005)

La FAO ha estimado que en la actualidad el 25% de los cereales del mundo están contaminados con micotoxinas conocidas, mientras que un porcentaje mayor podría estar contaminado por toxinas aún no identificadas. No existe lugar en el mundo que escape a la contaminación por micotoxinas y su impacto negativo en la producción animal y en la salud humana. (Juárez Palafox, 2002)

La palabra micotoxina deriva de la palabra griega *mikes* que significa hongo y *toxina* que es igual a veneno. Se suelen formar al final de la fase exponencial o al principio de la fase estacionaria del crecimiento del moho. Son moléculas pequeñas, la mayor parte de estos metabolitos secundarios se originan en la ruta policetónica del tipo [R-CO-CH<sub>2</sub>-CO-CH<sub>2</sub>-CO-CH<sub>2</sub>-CO-CH<sub>2</sub>-CO-CH<sub>2</sub>-CO-CoA]. (Rodríguez & Vizcarra , 2012)

(González Mora, 2010, pág. 25) cita a Murphy (2006) quien define a las micotoxinas como tóxicos de origen biológico, producto del metabolismo secundario de los hongos, y están asociadas a hongos de los géneros *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*. Las micotoxinas involucradas en la cadena alimenticia pertenecen principalmente a estos tres géneros.



Las micotoxinas representan un peligro latente tanto para la salud humana como animal. Estas se pueden encontrar de modo natural en un gran número de productos agrícolas, utilizados como materias primas para la preparación de alimentos balanceados para animales o como contaminantes o residuos tóxicos de los productos de las explotaciones zootécnicas (leche, huevos carnes). La contaminación del producto puede ocurrir en cualquier punto de la cadena alimenticia, desde la cosecha, pasando por la recolección, almacenaje, transporte, elaboración y conservación. (Requena, Saume, & León, 2005)

Bolet y Socarráz (2005), mencionan que estos metabolitos son compuestos tóxicos que presentan bajo peso molecular y algo muy importante a tener en cuenta es que no pierden su toxicidad ni por tratamiento térmico ni por la acción de las enzimas del subsistema digestivo, siendo consideradas por esto de mayor acción tóxica que las bacteriotoxinas.

González (2010) cita a (Kleter, Prandini, Filippi, & Marvin, 2009) quien afirma que las aflatoxinas representan la categoría predominante de las micotoxinas (93% de las micotoxinas) y la mayoría de los informes (84%) corresponden a su aparición en frutos secos, particularmente en países como Irán (pistachos), aunque también en maní, almendras, avellanas y nueces de Brasil.

“Numerosa es la bibliografía que reporta al maní como el mejor sustrato para el desarrollo de aflatoxinas, que están consideradas como la materia más contaminante después de las radioactivas. Los órganos más afectados son el hígado, los riñones y el cerebro” (Bolet Astoviza & Socarráz Suárez, 2005)

### **2.2.2 Condiciones ideales para el crecimiento de micotoxinas**

La contaminación de los alimentos con micotoxinas depende de las condiciones ambientales, que pueden propiciar el crecimiento del hongo y por ende la producción de las toxinas. (Méndez Albores & Moreno Martínez, 2007)



Tapia (2011), indica que las condiciones ideales para el crecimiento de micotoxinas son más restringidas que las que permiten el desarrollo del hongo, y son las siguientes:

#### **a) Humedad ambiental o agua libre**

El parámetro más interesante es el agua libre o disponible. Los hongos se desarrollan a partir de valores de  $a_w$  de 0.7 – 0.85. Sin embargo el rango de producción de micotoxinas está entre 0.85 – 0.99, siendo nula o muy baja con un  $a_w$  inferior a 0.85.

#### **b) Temperatura**

La temperatura ideal para el desarrollo de hongos es entre 15 y 30°C, con valores óptimos de 20 - 25°C. Algunas especies como *Cladosporium herbarium* tiene un crecimiento aparente a -6°C; otras especies de *Penicillium* pueden desarrollarse en pescado congelado a -20°C. Algunas esporas (*Rhizopus nigricans*, *Aspergillus niger*) persisten después de su inmersión durante 77 horas en hidrógeno líquido a -253°C). Las condiciones ambientales para aflatoxinas son temperatura ambiente entre 8 y 44°C y una humedad relativa del 80%.

#### **c) pH y Oxígeno**

El desarrollo de colonias de hongos se produce a valores de pH entre 4 y 8. Sin embargo, algunas especies pueden desarrollarse a valores más altos o más bajos, modificando la acidez del medio durante el desarrollo de la colonia.

Los mohos suelen ser organismos aeróbicos que se desarrollan sobre la superficie del medio. Pero también algunas especies pueden desarrollarse en medios profundos, en medios líquidos, con una baja tasa de oxígeno, o incluso en atmósferas modificadas, con CO<sub>2</sub> y N<sub>2</sub>.



Un factor importante que también debe tomarse en consideración es el tipo de estrato. Los estratos vegetales aumentan la producción de micotoxinas más que los animales.

Algo muy interesante que se debe considerar es que la presencia de ciertos nutrientes son determinantes en la producción de micotoxinas, como son los carbohidratos y los ácidos grasos. Los azúcares glucosa, fructosa y sacarosa son los más adecuados para producción de aflatoxinas en el caso de *A. flavus*; mientras que la manosa y xilosa son mejores para *A. parasiticus*. (Gimeno & Martins, 2011)

En particular la presencia de almidón pareciera ayudar a la generación de micotoxinas, más aún la presencia de cadmio, magnesio y zinc, incrementan la producción de aflatoxinas. Los cereales, las semillas oleaginosas y los frutos secos son los alimentos más frecuentemente contaminados por aflatoxinas. Los productos contaminados con mayor frecuencia son maíz, maní y semilla de algodón. (Tapia, 2011)

## **2.3 AFLATOXINAS**

### **2.3.1 Antecedentes Generales**

El término Aflatoxina, es una palabra compuesta que deriva de: A del género *Aspergillus*; FLA por la especie *flavus* y TOXINA que significa veneno. (Juárez Palafox, 2002)

Las aflatoxinas son un grupo de compuestos que cobraron importancia a partir de la muerte repentina en Escocia (1960), de cien mil pavos alimentados con maní infectado con la especie fúngica *Aspergillus flavus* proveniente del Brasil. (González Mora, 2010)

Las aflatoxinas son sustancias altamente tóxicas, resultantes del metabolismo de algunas cepas de *Aspergillus flavus* y *parasiticus*. Son un grupo de aproximadamente 20 compuestos, sin embargo, existen cuatro tipos que son



más importantes para el ser humano porque son los que se encuentran normalmente en los alimentos: B1, B2, G1, y G2; y los productos metabólicos adicionales M1 y M2. Son producidas tanto en el campo como en almacenamiento. (González Mora, 2010)

Según estudios, todos los seres vivos son susceptibles a las aflatoxinas, por ejemplo algunas bacterias se inhiben en presencia de ellas, ciertas plantas verdes presentan albinismo y las semillas pierden su capacidad de germinación. Se ha reportado que se pueden presentar efectos a dosis que van de 0.5 a 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$  peso corporal de Aflatoxina B1. (Juárez Palafox, 2002)

La AFB1 es considerada la más frecuente y tóxica, y es producida tanto por *Aspergillus flavus* como *parasiticus*. La aflatoxina G1 y la G2 son producidas exclusivamente por *A. parasiticus*.

Las aflatoxinas son potentes carcinógenos, mutagénicos y teratogénicos, y son grandes destructores del sistema hepático. La más potente es la toxina B1 mientras que la M1 tiene una potencia diez veces menor. (Méndez Albores & Moreno Martínez, 2007) (González Mora, 2010)

La AFB1 es la más abundante y también la más tóxica, es el compuesto natural carcinogénico más potente que se conoce y está clasificada por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer, IARC por sus siglas en Inglés, en el grupo 1 por existir evidencias comprobadas en humanos. El órgano más afectado por las AFs es el hígado, existen varios estudios que relacionan el cáncer de hígado con la presencia de AFs en los alimentos. Además, hay que tener en cuenta otros efectos tóxicos como sus propiedades inmunosupresoras o su capacidad para interferir en factores nutricionales. Las AFs se encuentran sobre todo en cacahuetes y en maíz así como en una gran diversidad de alimentos producidos a partir de éstos. Pueden aparecer también en soja, sorgo, pistachos, frutos secos, cerveza, especias y leche (AFM1). Es muy frecuente la presencia de AFs en piensos para la alimentación de animales de granja. (Abrunhosa L., 2012)



La nomenclatura hace referencia a sus propiedades físico-químicas, ya que las de tipo B presentan fluorescencia azul (blue) y las de tipo G fluorescencia verde (green) cuando se les observa bajo luz ultravioleta a 365 nm. (Rojas Contreras & Wilches Florez, 2009)

“Las aflatoxinas son las sustancias cancerígenas y mutagénicas del hígado más potentes que se conocen. La amplia evidencia experimental muestra que las aflatoxinas son capaces de inducir el cáncer al hígado en muchas especies animales, incluyendo aves, peces y seres humanos”. (González Mora, 2010)

La manera más eficiente de controlar la presencia de las aflatoxinas en los alimentos es evitar su formación, ya que es casi imposible eliminarlas completamente de los alimentos mediante su procesamiento.

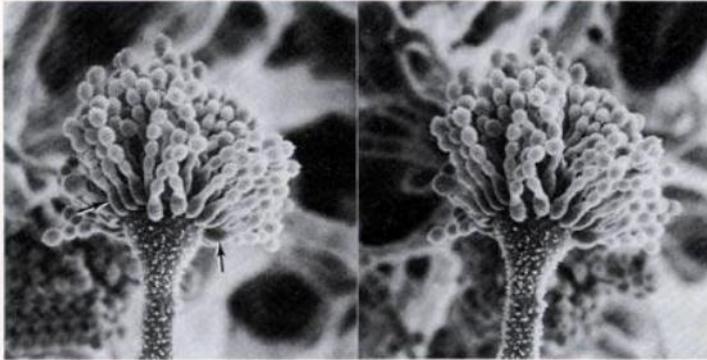
### **2.3.2 Aspergillus como agente productor de aflatoxinas**

*Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*, se encuentran en el suelo y crecen rápidamente sobre materia orgánica en descomposición. Sus colonias son generalmente amarillas, verde amarillo, amarillo-marrones, o verdes; granulares, aterciopeladas, o algodonosas; y tienen una saliente periférica blanca y un margen distintivo. Las aflatoxinas producidas por las especies del *Aspergillus* son ubicuas en climas húmedos y calientes. *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus* no pueden crecer o producir aflatoxinas en sustratos con actividad de agua menor de 0.7; humedad relativa menor a 70% y temperaturas por debajo de 10°C. (Cornejo & Villarroel, 2006)

Las condiciones óptimas de crecimiento para *A. flavus* y *parasiticus* son:

- Temperatura: 25 - 30°C
- Humedad relativa: 88 – 95%
- pH: 3.5 – 5.5
- CO<sub>2</sub>: 20%

Los dos hongos están estrechamente relacionados y crecen como saprófitos en los residuos vegetales de muchas plantas de cultivo y en el suelo. Se distribuyen en todo el mundo, con una tendencia a ser más común en países con climas tropicales que tienen rangos extremos de precipitación, temperatura y humedad. (Almudena, 2001)



**Figura 1. ASPERGILLUS FLAVUS**

Fuente: Almudena, A., 2001



**Figura 2. ASPERGILLUS PARASITICUS**

Fuente: Almudena, A., 2001

### **2.3.3 Condiciones de contaminación**

Los Aspergillus son muy comunes y dispersos en los ambientes, por lo que la contaminación con aflatoxinas puede ocurrir cuando los cultivos están en el campo (pre-cosecha), en periodo de cosecha y en el almacenamiento.



Según Bolet y Socarráz (2005), la contaminación con aflatoxinas está influenciada sobre todo por ciertos factores ambientales como:

- Dimensión: el tamaño de las aflatoxinas está entre 3 y 20 micras facilitando su dispersión a través del aire y su establecimiento en diversos sustratos donde puede crecer.
- Factores físicos: humedad, agua disponible, temperatura, zonas de microflora e integridad física del grano.
- Factores químicos: composición del sustrato, pH, nutrientes minerales y disponibilidad de oxígeno.
- Factores biológicos: presencia de vectores.

La sequía y la infestación por insectos, hacen que la contaminación precosecha con aflatoxinas sea probablemente alta. Mientras que la humedad relativa y temperaturas altas conducen a aumentar el crecimiento del hongo en el alimento almacenado y por tanto a la producción de altos niveles de aflatoxinas. En definitiva, el crecimiento de *Aspergillus* y la contaminación de los productos con aflatoxinas, son consecuencia de la interacción entre el hongo, el anfitrión y el ambiente. (Cornejo & Villarroel, 2006)

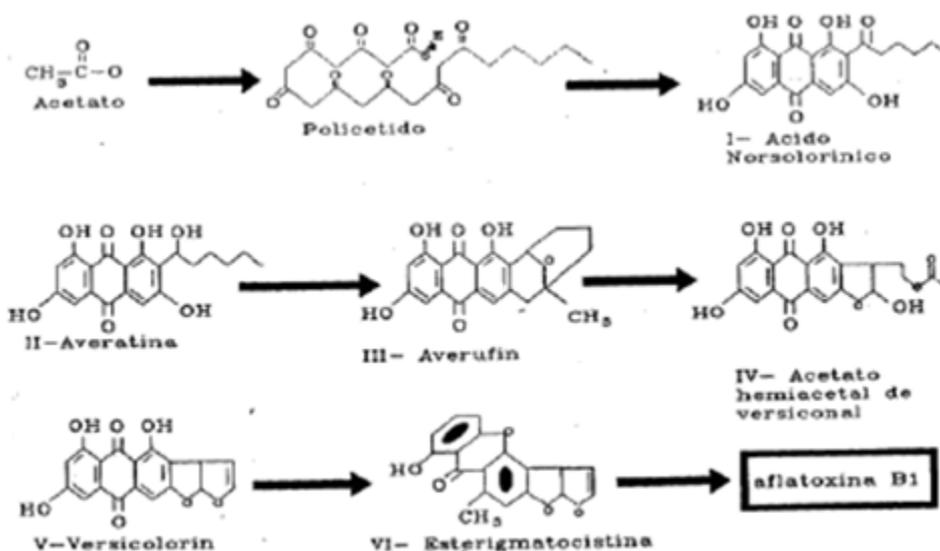
La exposición a las aflatoxinas también se produce por el polvo suspendido en el aire, generado durante la cosecha en el campo, la descarga de los granos, la limpieza de los silos y las operaciones de alimentación animal. Los polvos contaminados están asociados a un aumento de la incidencia de tumores de las vías respiratorias superiores. (Rendón Rocha, 2007)

#### **2.3.4 Biosíntesis de aflatoxinas**

La biosíntesis y el nivel de producción de aflatoxinas está influenciada por la composición de los nutrientes en donde crecen los hongos, se ha observado que los azúcares como glucosa, fructosa y sacarosa incrementan la biosíntesis de aflatoxinas provenientes de *A. flavus*. Mientras que la manosa y xilosa estimulan la producción de aflatoxinas en *A. parasiticus*, pero las inhiben en *A. flavus*. (Juárez Palafox, 2002)

Esta micotoxina se sintetiza por la ruta metabólica de los policétidos y las reacciones involucradas incluyen condensación, oxidación, reducción, alquilación y halogenación, llevando a la formación de una molécula que consiste en un anillo cumarín unido a una unidad bishidrofurano y a una ciclopentanona. Estos metabolitos se forman por la condensación del acetil-coenzima A y malonil-coenzima A, dando lugar al acetil-S coenzima A, la cual será la molécula iniciadora de la AFB1. Dentro de la vía biosintética, la formación de la versicolorina A es particularmente relevante, ya que es la primera molécula en la vía de la AFB1 que contiene un doble enlace en la posición 8,9 de la molécula del bisfurano. Este doble enlace es el blanco para la activación de una molécula altamente reactiva. (Guzmán de Peña, 2007)

Durante la síntesis ocurren al menos 23 reacciones enzimáticas y se han identificado 15 intermediarios, bien definidos estructuralmente. Los 25 genes involucrados en la mayoría de los pasos de interconversión han sido secuenciados, confirmados por interrupción génica y por estudios enzimáticos, están agrupados en una región del ADN de 70-kb. (Guzmán de Peña, 2007)



**Figura 3. BIOSÍNTESIS DE LA AFLATOXINA B1**

Fuente: Wang, J. 1993. Rodríguez, Vizcarra 2012.



### 2.3.5 Características químicas

Las aflatoxinas son inodoras, insípidas e incoloras. Son solubles en metanol, cloroformo, acetona, acetonitrilo; poco solubles en agua e hidrocarburos. Son termoestables, alcanzando un punto de ebullición por encima de los 200°C. Son estables en los alimentos y resistentes a la degradación bajo procedimientos de cocción normales. Es difícil eliminarlas una vez que se producen. (Urrego Novoa & Díaz, 2006)

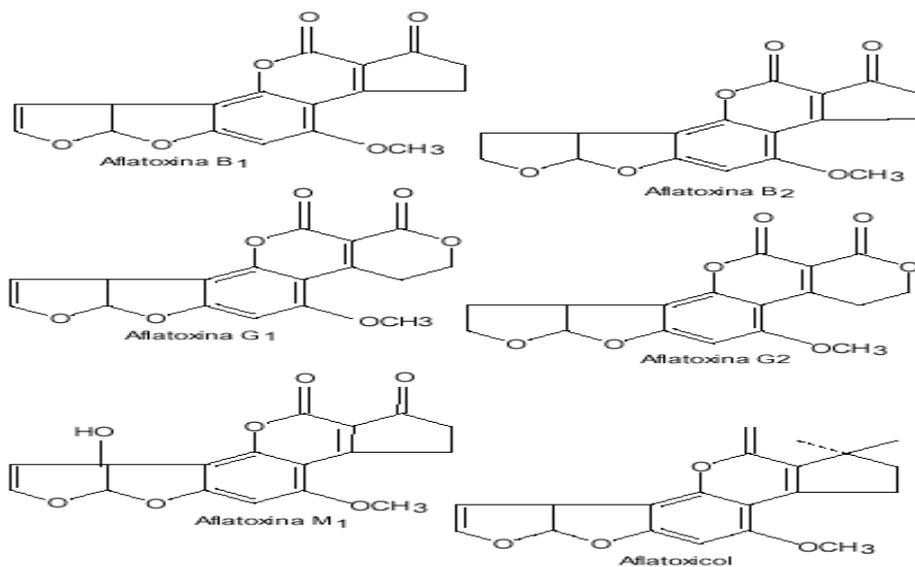
Tienen la propiedad de fluorescencia al ser expuestas a la luz ultravioleta de longitud de 365 nm. Todas presentan un efecto teratógeno, mutágeno y cancerígeno. (Peña, S.D. 1990)

Químicamente son compuestos derivados de las isocumarinas (bifuranocumarinas), que pueden estar acopladas a un grupo de ciclopentanona (AFs B1 y B2) o a un anillo lactónico (AFs G1 y G2). Las aflatoxinas son un grupo de hepatocarcinógenos pertenecientes a la familia de las difurano-cumarinas, se clasifican en dos grandes grupos de acuerdo a su estructura química; la serie 1 difuro-cumaro-ciclo-pentanonas (AFB1, AFB2, AFB2A, AFM1, AFM2, AFM2A y aflatoxicol) y la serie 2 difuro-cumaro-lactonas (AFG1, AFG2, AFG2A, AFGM1, AFGM2, AFGM2A y AFB3) (Juárez Palafox, 2002)

Las más importantes son B1, B2, G1 y G2; las aflatoxinas M1 y M2 son respectivamente productos hidroxilados del metabolismo oxidativo de las aflatoxinas B1 y B2. Estos metabolitos pueden eliminarse en la leche (tanto en humanos como en animales). Las aflatoxinas B2, G1 y G2 son menos frecuentes y casi nulas en ausencia de AFB1.

Pueden causar toxicidad aguda y crónica en los animales. Los síntomas pueden incluir fiebre, vómito e ictericia. El daño agudo del hígado puede ser fatal en casos severos. Las aflatoxinas de la serie 1 son en general mucho más tóxicas que las de la serie 2. La aflatoxina B1 ha sido clasificada en el grupo 1 por la IARC (International Agency Research Cancer) como carcinógeno cuyo

órgano blanco es el hígado. La AFB1 es más frecuente en maíz, maní, nueces, arroz, cereales y torta de algodón. (Urrego Novoa & Díaz, 2006)



**Figura 4. ESTRUCTURA DE AFLATOXINAS B1, B2, G1, G2**

Fuente: FAO: Alimentación y Nutrición, 1991

### 2.3.6 Biotransformación de las aflatoxinas

Rojas y Wilches (2009), mencionan en su investigación que el mecanismo de acción de las aflatoxinas en el organismo toma la siguiente secuencia:

- Penetración a las células y a sus núcleos.
- Combinación con el ADN.
- Reducción de la síntesis de ARN, especialmente del m-ARN.
- En pocos minutos bloquean la proteosíntesis y a causa de la inhibición del m-ARN también se inhibe la mitosis.
- La inhibición de la mitosis es seguida por la muerte celular.

Para que la acción tóxica de la aflatoxina ocurra es necesario que ésta tenga un cambio metabólico, el cual ocurre cuando la AFB1 llega al hígado de los seres que la ingieren. Dicho cambio ocurre en las células hepáticas.



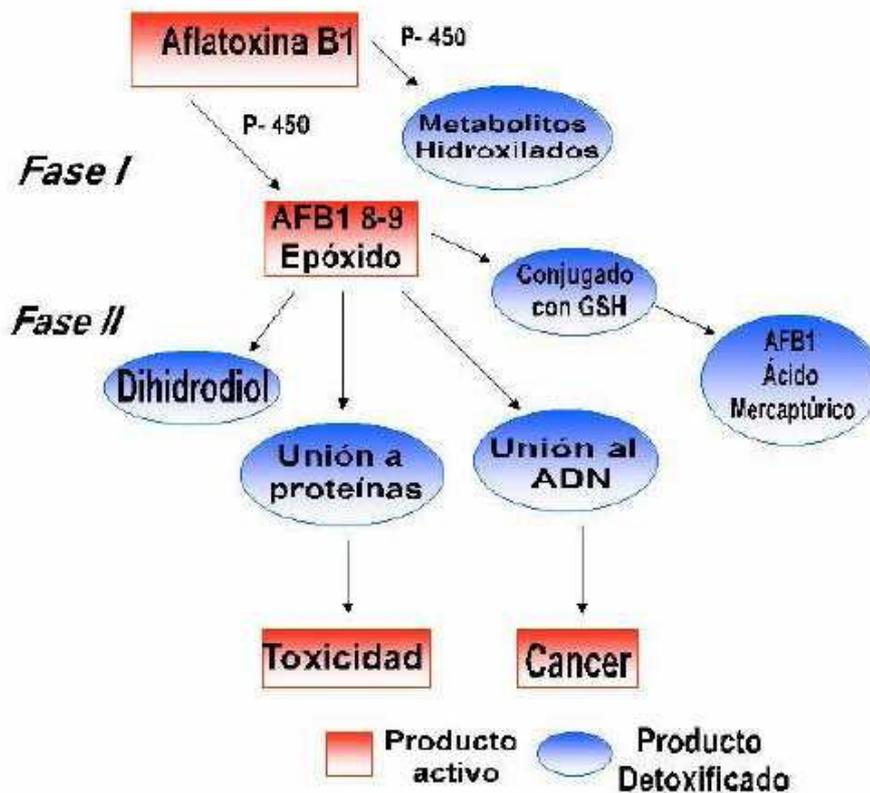
Además indican que la AFB1 pasa por dos fases:

**Fase I:** Las aflatoxinas son absorbidas en el tracto gastrointestinal debido a su alta liposolubilidad. Cuando las personas ingieren aflatoxina B1, ésta es absorbida en el intestino y es llevada vía porta hasta el hígado, allí es metabolizada por el citocromo p-450 de los hepatocitos produciendo derivados reducidos y oxidados que supuestamente no presentan actividad carcinogénica. Resultando el AFB1 exo 8-9 epóxido, el cual al ser altamente inestable se une con el nitrógeno de la guanina, produce un aducto con el ADN y transversiones de guanina a timina. Este aducto abre su anillo imidazol y forma una molécula más estable química y biológicamente, la aflatoxina B1 (formamidopirimidina), quien es la causante de errores posteriores en la transcripción del ADN.

Adicionalmente se puede configurar un aducto con la albúmina y con la lisina, razón por la cual estos compuestos sirven a nivel clínico para determinar el consumo de aflatoxina B1.

**Fase II:** En la siguiente fase se busca estabilizar e inactivar al epóxido, hidrolizándolo y conjugándolo con glutatión (GSH) para formar aflatoxina-glutatión conjugado que será excretado por la orina como ácido mercaptúrico, combinándose con proteínas a los diferentes tejidos y provocando las diferentes clases de intoxicaciones, además de los efectos carcinogénicos. (Rodríguez, Sala, & Salazar, 2008)

El tiempo de vida media plasmática para la AFB1 es de 36,5 minutos, su volumen de distribución es del 14% del peso corporal y el aclaramiento renal es de 1,25 l/kg/h. Aproximadamente el 80% de la dosis total de AFB1 se excreta en una semana. La AFM1 se excreta en las 48 horas siguientes a la ingestión y representa entre el 1-4% de la AFB1 ingerida. (Urrego Novoa & Díaz, 2006)



**Figura 5. BIOTRANSFORMACIÓN DE AFLATOXINAS**

Fuente: Fundación Vasca para la Seguridad Agroalimentaria (2007)

## 2.4 TOXICIDAD DE AFLATOXINAS

Según Camean (2008), las micotoxicosis comprenden tres formas de intoxicación:

- Primaria aguda: se produce cuando se consumen concentraciones altas o moderadas de micotoxinas y causan manifestaciones específicas como síndrome de enfermedad aguda o muerte.
- Primaria crónica: se presenta cuando se ingieren niveles bajos a moderados de micotoxinas y son causantes de enfermedades específicas. El efecto más grave sucede en el ADN.
- Indirecta: cuando se ingiere concentraciones muy bajas de micotoxinas y aumentan la sensibilidad a otras enfermedades e infecciones. (Camean & Repetto, 2008)



La toxicidad de la aflatoxinas ha sido demostrada en diferentes especies de animales y en el hombre, y decrece en el orden de B1 a G2, o sea, B1>G1>B2>G2. La susceptibilidad de sufrir una aflatoxicosis está relacionada con la rapidez de penetración de las aflatoxinas en el hepatocito. Las funciones comunes de la célula hepática se verán alteradas cuando logren atravesar la membrana y se introduzcan en el núcleo, el cual capta 1/3 del total de las aflatoxinas que ingresan en el tejido hepático. En primer lugar se unen al ADN e inhiben la síntesis del ARN, derivándose una marcada disminución de la síntesis de proteína. (Caballero Torres & Otero Fernández-Trebejo, 2008)

La AFB1 es considerada un carcinógeno humano además de genotóxica. Otras enfermedades relacionadas posiblemente con la exposición a AFB1 incluyen hepatitis tóxica y fibrosis hepática, atrofia del crecimiento en niños y síndrome de Reye (encefalopatía combinada con degeneración grasa del hígado).

La exposición a altos niveles de aflatoxina produce una aguda necrosis, cirrosis, y cáncer de hígado, con hemorragia, daño agudo al hígado, edema, alteración en la digestión, en la absorción o en el metabolismo de los nutrientes.

Las exposiciones crónicas subclínicas no lideran tan dramáticamente los síntomas como la aflatoxicosis aguda. Los niños, sin embargo, son particularmente afectados por la exposición a AFs con detención del crecimiento. La exposición crónica también presenta un alto riesgo de desarrollar cáncer de hígado, debido a que el metabolito AFM<sub>1</sub> puede intercalarse químicamente en el ADN y en la alquilación de bases a través de su epóxido. Sin embargo, solamente la aflatoxina B1 es considerada por la IARC con suficiente evidencia como carcinogénico. (Cornejo & Villarroel, 2006).

Además de los efectos carcinogénicos, la aflatoxina y sus metabolitos pueden afectar cualquier órgano. El órgano blanco principal es el hígado, sin embargo puede producir otras patologías como alargamiento de la vesícula, daño en el sistema inmune, nervioso o reproductivo.



En cuanto a la toxicidad crónica, la IARC clasifica varias micotoxinas como carcinógenas o potencialmente carcinógenas para el hombre, de acuerdo a los siguientes grupos:

- Grupo 1: El agente es carcinógeno en humanos
- Grupo 2A: Agente probablemente carcinógeno en humanos; existe limitada evidencia sobre humanos pero suficiente con animales.
- Grupo 2B: Agente posiblemente carcinógeno; la evidencia en humanos es limitada y tampoco hay suficiente evidencia con animales de experimentación.
- Grupo 3: El agente no es clasificable como carcinógeno para humanos, y no puede incluirse en otro grupo.
- Grupo 4: el agente probablemente no es carcinógeno en humanos; la evidencia disponible, tanto de humanos como de experimentación animal así lo sugiere.

**Tabla 1. CLASIFICACIÓN DE LAS MICOTOXINAS SEGÚN LA IARC**

<b>Micotoxinas</b>	<b>IARC</b>
Aflatoxinas	1
Afltaoxina M1	2B
Citrinina	3
Fumonisina B1	2B
Ocratoxina A	2B
Toxinas derivadas de <i>Fusarium graminearum</i> , <i>F. culmorum</i> (zearalenona, deoxinivalenol)	3
Toxinas derivadas de <i>Fusarium sporotrichioides</i> (toxina T-2)	3
<b>Fuente: (IARC, 2002)</b>	

#### **2.4.1 Mecanismos de carcinogenicidad de la AFB1**

El primer paso al asignar el rol de la AFB1 en cáncer humano es la elucidación de los mecanismos que llevan a la mutagenicidad, primer evento en la iniciación del tumor.



La molécula AFB1-8,9 epóxido es la responsable de la actividad carcinogénica y mutagénica de la AFB1. La formación del epóxido requiere la presencia de un doble enlace entre los carbonos C8-C9, por esta razón las aflatoxinas B2 y G2 son prácticamente atóxicas en comparación con las aflatoxinas B1 y G1. La AFM1, aunque presenta el doble enlace entre los carbonos C8 y C9, es dos órdenes de magnitud menos tóxica que la AFB1 en cuanto a carcinogenicidad se refiere. (Guzmán de Peña, 2007)

La AFB1-epóxido presenta dos conformaciones: una endo y una exo. La forma endo posee aproximadamente 500 veces más poder mutagénico que la forma exo. El fenómeno de mutagenicidad puede explicarse mediante la formación de un compuesto estable por la unión covalente con el nitrógeno N-7 de los residuos guanil del DNA (o RNA) mediante la inducción de depurinación y escisión de la hebra lo que puede inducir mutación en células somáticas. Esta formación de ligandos o aductos persistentes se lleva a cabo en regiones del DNA ricas en guanina. En el proceso de replicación del DNA, el complejo formado se intercala causando mutación, la guanina sufre transversión a timina; esto ocurre en el codón 249 del gen p53 (este gen está implicado como punto de chequeo durante la síntesis y reparación del DNA. Si el daño no se repara, esta misma proteína induce apoptosis). (Urrego Novoa & Díaz, 2006)

Después de la formación de la AFB1-epóxido pueden formarse dihidrodioles (8,9 – dihidro-8,9-dihidroxi-aflatoxina B1) metabolitos de la AFB1 que se unen a proteínas celulares mediante la formación de bases de Schiff induciendo daño celular y eventualmente muerte celular; es importante resaltar que la AFB1-epóxido puede también formar aductos con los residuos de lisina de la albúmina y otras proteínas celulares. Cerca del 5% de la dosis ingerida de AFB1 se une a la albúmina. La AFB1-epóxido puede también reaccionar con glutatión mediante un mecanismo mediado por una glutatión-S-transferasa; esta conjugación de tipo competitivo representa el paso de detoxificación más importante con respecto a otros tipos de biotransformación en la obtención de metabolitos menos tóxicos de AFB1, incluyendo entre ellos aflatoxicol y otros derivados como la M1, P1 y Q. (Urrego Novoa & Díaz, 2006)



La comparación entre la activación y detoxificación de la AFB1-epóxido en diferentes especies animales provee la base para entender por qué las especies varían en su sensibilidad a los efectos tóxicos y carcinogénicos inducidos por la AFB1. En contraste con experimentos en roedores se ha evidenciado que en los humanos la CYP3A4 tiene una menor afinidad por la AFB1 y en cambio la enzima CYP1A2 posee una alta afinidad. La CYP1A2 se conoce por su capacidad para bioactivar muchos procarcinógenos a su forma carcinogénica activa.

Esto implica que las bajas concentraciones de AFB1 presentes en los alimentos pueden ser activadas por vía metabólica de CYP1A2 mientras que la CYP3A4 participa en procesos de biotransformación en donde predomina la detoxificación de los metabolitos de la AFB1. (Urrego Novoa & Díaz, 2006)

En conclusión, la activación de la AFB1, en el anillo furano, por la acción de las enzimas del microsoma hepático de los animales superiores, la convierten en un potente agente carcinogénico.

#### **2.4.2 Efecto mutagénico**

La mutagenicidad ha sido establecida previamente mediante ensayos con *Salmonella typhimurium* empleando la prueba de Ames. Los resultados obtenidos para varios tipos de *Salmonella* indican que la AFB1 requiere una activación para producir mutaciones. La ruta de activación es la conversión de AFB1 en el metabolito electrofílico AFB1-8,9-epóxido (anteriormente denominado AFB1 2,3 epóxido). (Urrego Novoa & Díaz, 2006)

Las mutaciones son importantes por dos razones: porque son heredables a la siguiente generación e involucra alteración en los genes y generan cáncer. La mutagenicidad de la AFB1 se ha demostrado utilizando bacterias, levaduras y células de mamíferos (incluyendo humanas), concluyéndose que esta sustancia es uno de los mutágenos más potentes, ya que en la *Salmonella* se inducen 8527 mutantes por cada  $\mu\text{g}$  de AFB1. (Guzmán de Peña, 2007)



AFB1 induce mutaciones puntuales de GC→TA ó GC→AT, los puntos más sensibles para la mutagénesis, fueron encontrados en las regiones del ADN más ricas en GC, las cuales también son las zonas más sensibles para la formación del aducto AFB-N<sup>7</sup>-Guanina. (Guzmán de Peña, 2007).

### **2.4.3 Efecto tóxico**

El efecto tóxico de la Aflatoxina en animales superiores es de dos tipos: agudo y crónico. El primer tipo se manifiesta como una hepatitis aguda, fiebre, depresión, falta de hambre y diarrea; el segundo tipo se manifiesta como un hepatocarcinoma, y los síntomas como vómito, dolor abdominal y hepatitis se van presentando paulatinamente hasta causar la muerte. (Guzmán de Peña, 2007).

Los síntomas más evidentes de la intoxicación por aflatoxinas, llamada aflatoxicosis, son la hipolipidemia, hipocolesterolemia e hipocarotenemia, asociados con esteatosis hepática severa y pérdida de peso. Este desbalance agudo del metabolismo de los lípidos puede ser resultado del bloqueo de residuos de lisina claves en la proteína B-100 de las lipoproteínas de baja densidad (LDL). Estos complejos lipoproteícos son muy importantes en la distribución de grasas a partir del hígado. Este estado anormal se mantiene y se refuerza por la subsiguiente modificación de las apoproteínas nacientes, las cuales a su vez se vuelven incapaces de recibir una nueva carga de lípidos mientras la aflatoxina continúe presente en el hígado. (Guzmán de Peña, 2007)

El sistema inmune también se ve afectado y se alteran las respuestas inmunes específicas e inespecíficas. Se disminuyen las funciones de los linfocitos y podría afectar también a los macrófagos que los asisten, los cuales juegan un papel importante en la defensa del huésped contra tumores y bacterias. (Guzmán de Peña, 2007).



#### **2.4.4 Asociación de AFB1 con otras enfermedades hepáticas**

Las enfermedades de Kwashiorkor y Síndrome de Reye han sido relacionadas con la ingestión de AFB1. Los síntomas de la primera son hipoalbuminemia, hígado graso e inmunosupresión; en la segunda se presenta encefalopatía con degeneración grasa de las vísceras. La AFB1 fue encontrada en las necropsias del tejido hepático de 36 niños que fallecieron con la enfermedad de Kwashiorkor. Igualmente en varios pacientes de diferentes partes del mundo, que padecieron el Síndrome de Reye, tenían AFB1 en sus tejidos.

#### **2.4.5 Biomarcadores de exposición a AFB1**

La determinación de AFB1 libre refleja exposiciones en las 24 a 48 horas previas, en tanto los metabolitos AFM1, AFP1 indican medidas de detoxificación metabólica. Cuando se complementan con la detección mediante HPLC de aductos de ADN-AFB1-N7-Gua en orina, muestran la exposición reciente. De la misma forma un biomarcador para exposición crónica a aflatoxinas es la detección mediante aductos AFB1-albúmina en sangre. (Guzmán de Peña, 2007).

El aducto AFB1-N7-Gua en orina puede ser un buen biomarcador molecular del riesgo de daño por aflatoxinas y de su importancia como agente etiológico de cáncer hepático primario. (Urrego Novoa & Díaz, 2006)

La cuantificación por inmunoensayo del aducto AFB1-lisina en suero humano permite también determinar la exposición humana a la aflatoxina.

La relación entre la exposición a la AFB1 y el desarrollo de hepatocarcinoma quedó claramente ilustrada por las mutaciones que ocurren en el codón 249 del gen supresor p53. Esta mutación se ha encontrado en 53% de los casos de carcinoma hepatocelular de áreas con alta exposición dietética a AFB1. (Guzmán de Peña, 2007)



## 2.5 DETECCIÓN DE AFLATOXINAS

Existen diversos métodos para determinar la contaminación de un alimento con aflatoxinas, según se requiera rapidez, precisión, confiabilidad o reproducibilidad.

El muestreo y la preparación de la muestra siguen siendo una fuente de error considerable en la identificación analítica de aflatoxinas. Una característica común de todos los planes de muestreo es que la muestra primaria entera debe ser molida y ser mezclada de modo que la porción de prueba analítica tenga la misma concentración de toxina que la muestra original. (Cornejo & Villarroel, 2006)

Las aflatoxinas no están distribuidas homogéneamente en el grano, por lo que una toma de muestras que proporcione una idea correcta en un análisis de aflatoxinas es difícil. Aproximadamente solo un 3% de las semillas de un lote contaminado contienen aflatoxinas.

La FAO invita a tener en cuenta las siguientes consideraciones: la distribución de la concentración de las micotoxinas es un factor importante a considerar cuando se adoptan criterios reglamentarios de muestreo para los productos. La distribución puede ser muy heterogénea, como para las aflatoxinas del maní. La cantidad de granos de maní contaminados en un lote es habitualmente muy baja, pero el nivel de contaminación dentro del grano puede ser muy alto. De no tenerse los debidos cuidados para obtener una muestra representativa, la concentración de las micotoxinas en los lotes inspeccionados puede con facilidad estimarse erróneamente. Además, el consumo de maníes podría llevar a una única dosis accidental alta de aflatoxinas más que a una ingesta crónica a un nivel relativamente bajo. (FAO, 2004).

Los métodos para el análisis de las micotoxinas han ido evolucionando en busca de una mayor precisión en la identificación de estas sustancias en



alimentos, tejidos y fluidos orgánicos. Existen métodos presuntivos, cualitativos, semicuantitativos, cuantitativos y confirmatorios.

En los primeros años que siguieron al descubrimiento de las aflatoxinas el hombre tuvo interés en los métodos rápidos que le permitiera inspeccionar en corto tiempo un gran volumen de granos. Fue así como se publicó el uso de la lámpara ultra violeta para detectar la fluorescencia. (Requena, Saume, & León, 2005)

Juárez Palafox (2002) menciona algunos métodos para determinación de aflatoxinas:

Como método presuntivo se destaca la técnica de luz negra, la cual se usaba para cereales, que consiste en la exposición del grano quebrado a la luz ultravioleta (365 nm).

Entre los métodos cualitativos se encuentran los de minicolumna, muy utilizado para cereales y oleaginosas. El método involucra extracción química y cromatografía en columnas cortas de sílica gel o bien sílica en combinación con fluorisil y láminas de aluminio y la subsiguiente separación de una lámpara fluorescente.

La cromatografía en capa delgada (TLC) se toma como una herramienta valiosa en el análisis semicuantitativo o cuantitativo. Una desventaja de esta técnica es la gran variabilidad de los resultados.

Entre los métodos cuantitativos y que se ha adoptado como método oficial establecido por la Association of Analytical Chemist (AOAC), llegando a ser hoy en día uno de los métodos más sofisticados, la Cromatografía de Alta Precisión (HPLC) y la Reacción en Cadena de Polimerasas (PCR). Métodos muy efectivos pero que llegan a ser muy costosos, ya que requieren de materiales caros y personal capacitado.



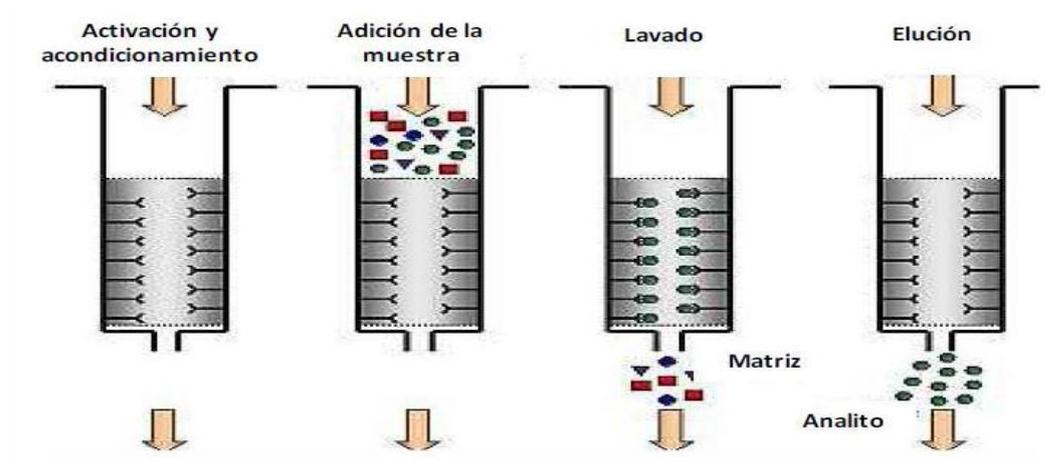
El Método de Cromatografía Líquida de alta resolución (HPLC con detector de fluorescencia) permite la determinación y cuantificación de aflatoxinas B1 – B2 – G1 –G2 en alimentos. (Cornejo & Villarroel, 2006). La estructura cumarínica de la aflatoxina y la presencia de grupos cetónicos en la molécula, le confieren dos propiedades importantes para la detección cromatográfica: la polaridad y la fluorescencia bajo la luz ultravioleta.

También pueden utilizarse métodos basados en ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), a pesar de que es aconsejable reconfirmar por alguno de los métodos señalados anteriormente cuando se encuentren resultados positivos, ya que ELISA utiliza anticuerpos policlonales que pueden dar "falsos positivos" (Gimeno, Alberto; Martins, María Ligia, 2005).

Para la determinación de Aflatoxina B1, hay métodos basados en la extracción en fase sólida (SPE) o por inmunoafinidad (IA), seguida de cromatografía líquida con detección de fluorescencia. Los métodos basados en SPE han sido validados para la determinación de AFB1 en alimentos para el rango 8 – 14 µg/kg y los basados en IA para el rango de 1-5 µg/kg. Para la determinación de aflatoxina M1 en leche hay un método disponible basado en IA seguido de cromatografía líquida, validado para el rango entre 0.02 – 0.1 µg/L.

En relación a las columnas de inmunoafinidad, estas son muy utilizadas y constituyen el estándar actual para la purificación de micotoxinas en análisis de alimentos. La columna está constituida por un gel con anticuerpos monoclonales anti-aflatoxinas inmovilizados. En el momento de adicionar la muestra se produce una reacción antígeno-anticuerpo lo que le confiere una alta selectividad. Así, la proporción de impurezas que quedan fijadas a la columna es pequeña, y estas se eliminan en una etapa de lavado con agua milliQ o PBS, para evitar cambios de pH que podrían afectar a la unión antígeno-anticuerpo. (Herrera Querol, 2012)

Para conseguir la elución de las aflatoxinas se utiliza metanol que rompe la unión de éstas con los anticuerpos.



**Figura 6. ESQUEMA DEL PROCESO DE PURIFICACIÓN CON COLUMNA DE INMUNOAFINIDAD**

Fuente: Herrera Querol, Laura. 2012

## 2.6 NORMATIVAS PARA AFLATOXINAS EN ALIMENTOS

### TD50, TDI y NOAEL para AFM1 y AFB1

La AFM1 y la AFB1 tienen una TD50 de 10,38 y 1,15 microgramos /kg pc/día, respectivamente, lo que hace suponer que la AFM1 es aproximadamente nueve veces menos carcinogénica que la AFB1. La TDI para la AFB1 está comprendida entre 0,11 y 0,19 ng (nanogramos)/kg pc/día, con un factor de seguridad de 5000 y un nivel de riesgo de 1/100000. Los valores de NOAEL para la AFM1 y la AFB1 son, < 2,5 y 0,75 microgramos/kg pc./día, respectivamente (Kuiper-Goodman, 1990; Kuiper-Goodman, 1994). Si dividimos el valor de TD50 correspondiente a la AFM1 por el factor de seguridad 5000, podríamos atribuir hipotéticamente un valor de TDI para la AFM1 de 2 ng/kg pc/día, lo que representa, aproximadamente, diez veces más de tolerancia que la AFB1 comparado con el mayor valor de TDI para la AFB1. (Fierro Aguilar, 2012) (Gimeno, Alberto; Martins, María Ligia, 2005)



**Tabla 2. TD50, TDI, NOAEL PARA AFLATOXINAS**

	AFB1	AFM1
TD50	1.15 $\mu\text{g}/\text{kg pc}/\text{día}$	10.38 $\mu\text{g}/\text{kg pc}/\text{día}$
TDI	0.11 – 0.19 $\text{ng}/\text{kg pc}/\text{día}$	2 $\text{ng}/\text{kg pc}/\text{día}$
NOAEL	0.75 $\mu\text{g}/\text{kg pc}/\text{día}$	2.5 $\mu\text{g}/\text{kg pc}/\text{día}$

**Fuente: Fierro Aguilar, 2012.**

En el año 2007, como consecuencia de la propuesta de fijar límites máximos en el Codex Alimentarius, la Comisión Europea solicitó a la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) una evaluación del riesgo ante la posibilidad de fijar límites máximos de aflatoxinas totales superiores a los 4  $\mu\text{g}/\text{kg}$  fijados por la legislación europea. El panel CONTAM de la EFSA concluyó entonces que subir el límite de 4  $\mu\text{g}/\text{kg}$  a 8 ó 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de aflatoxinas totales en almendras, avellanas y pistachos tendría poco impacto desde el punto de vista de exposición del consumidor, riesgo de cáncer y márgenes de exposición.

### 2.6.1 Normativa Internacional

Es importante señalar que estas reglamentaciones varían según las normativas de los países o las comunidades de comercialización internacional a las que pertenecen (Unión Europea, Mercosur, etc.). Sin embargo, no existe una única legislación internacional al respecto y en algunos países ni siquiera existen normativas vigentes para su control.

En Ecuador no existe una normativa de regulación para aflatoxinas ni un programa sistemático de vigilancia y monitoreo para la contaminación con hongos micotoxigénicos en alimentos de consumo humano y animal. (Vallejo López, 2012)



**Tabla 3. NIVELES PERMITIDOS DE AFLATOXINAS EN ALGUNOS PAÍSES**

	Venezuela	Chile	Unión Europea	España	FAO
AFs totales	20µg/kg	5 µg/kg	3 - 4 µg/kg	10 µg/kg	4 µg/kg
AFB1			1.5 - 2 µg/kg	5 µg/kg	2 µg/kg
AFM1	0.5 µg/kg	0.05 µg/kg			

Fuente: Normativas de los diferentes países.

### **2.7 ACCIONES PARA EVITAR, CONTROLAR Y DESINFECTAR PRODUCTOS DE HONGOS Y AFLATOXINAS**

Debido a que la contaminación de los alimentos y sus subproductos por aflatoxinas es inevitable, se han propuesto numerosas estrategias para su reducir la contaminación.

Todos los animales en la cadena alimenticia pueden ser afectados por la exposición a los alimentos y piensos contaminados, inclusive los humanos, quienes pueden estar expuestos directamente a las toxinas mediante manipulación y consumo de granos, frutos secos o indirectamente mediante consumo de compuestos no metabolizados o productos metabolizados tóxicos en carne contaminada o productos derivados de animales vivos como leche y queso.

Armijo y Calderón (2009), mencionan en su trabajo que se puede tratar de disminuir este tipo de contaminación, con las siguientes acciones:

- 1.- Realizar buenas prácticas agronómicas.
- 2.- Identificar y separar productos contaminados.
- 3.- Implementar un sistema de almacenamiento de productos en condiciones de humedad y temperatura controladas.
- 4.-Desinfectar productos contaminados.
- 5.-Desarrollar variedades con resistencia genética.



Además se pueden aplicar métodos físicos, de separación, de inactivación térmica, de irradiación, de extracción por solvente, por adsorción de la solución, por inactivación microbiana y por fermentación.

Cornejo y Villarroel (2006), mencionan que un grupo de diversos productos químicos se ha probado para evaluar su capacidad de degradar e inactivar las aflatoxinas. Algunos de ellos pueden destruir (o degradar) las aflatoxinas con eficacia pero son potencialmente inseguros debido a la formación de residuos tóxicos o a la perturbación del contenido nutriente y de las características organolépticas del producto.

Se puede utilizar mezclas de etanol, acetona, isopropanol, hexano, acetonitrilo, pero tiene un costo muy alto y es muy tóxico.

Dos tratamientos que han recibido atención considerable son la amoniación y la reacción con bisulfito del sodio. También se puede utilizar la ozonización.

Un nuevo tratamiento para la descontaminación de aflatoxinas es la adición de absorbentes químicos, tales como aluminosilicato hidratado de calcio y sodio (HSCAS) a la dieta de animales, el cual es muy afín a la AFB1 y ha permitido una eliminación del 80%. (Vallejo López, 2012). HSCAS posee la capacidad de atar y de inmovilizar firmemente las aflatoxinas en el aparato gastrointestinal de animales, dando por resultado una reducción importante en biodisponibilidad de la aflatoxina. (Cornejo & Villarroel, 2006)

El rango efectivo de temperatura para la descomposición de aflatoxinas es entre 237 - 306°C. El tostado o fritura a 150 - 200°C durante 30 minutos puede reducir la AFB1 en maíz en un 40 – 80%, lo cual puede aplicarse para los frutos secos. (Rodríguez & Vizcarra , 2012)

Irradiación: con rayos X y UV, microondas, infrarrojos y luz visible.

Métodos biológicos: se ha utilizado con gran eficacia *Flavobacterium aurantiacum* B-184, que degrada de forma irreversible las micotoxinas, pero los alimentos adquieren un color anaranjado por efecto de la fermentación. (Soriano del Castillo, 2007).



## 2.8 EVALUACIÓN DE RIESGO

El riesgo es la probabilidad de daño, enfermedad o muerte bajo circunstancias específicas. Puede expresarse en términos cuantitativos de probabilidad o puede expresarse cualitativamente como alto, bajo o insignificante. ( (Delgadillo Ubaldo, 2008)

Magan y Olsen (2004) menciona que el análisis de riesgo tiene tres componentes que son: evaluación, gestión y comunicación del riesgo.

La evaluación del riesgo es la actividad científica para valorar las propiedades tóxicas de una sustancia y las condiciones de exposición humana a dicha sustancia, tanto para cerciorarse de la posibilidad de que los expuestos tengan efectos adversos como para caracterizar la naturaleza de los efectos que puedan experimentar. Se presentan las siguientes etapas: determinación del peligro, caracterización del peligro, evaluación de la exposición y caracterización del riesgo.

El manejo del riesgo es un proceso para decidir si un riesgo evaluado es lo suficientemente significativo como para representar un problema de salud pública, y para establecer cuáles serían los medios adecuados para su control.

El diseño de estudio se basa en la combinación de los datos de consumo de los alimentos y los datos de contaminación de los alimentos. Los datos de consumo de los alimentos se obtienen por medio de encuestas en las que se solicita a la población observada, algunos datos personales (edad, estatura, sexo) y otros datos referentes a la frecuencia de consumo del alimento en cuestión, en este caso el maní y la nuez, para lo cual se aplican dos tipos de encuestas: recordatorio de 24 horas y frecuencia de consumo. Los datos de contaminación se obtienen determinando los niveles de micotoxinas en los alimentos estudiados. (FAO., 2006) (FAO, WHO,IPCS, 2009)



### **2.8.1 Determinación del peligro**

Determinación de los agentes físicos, químicos o biológicos que pueden causar efectos nocivos para la salud y que pueden estar presentes en un alimento o grupo de alimentos. (Magan, N.; Olsen, M., 2004)

Se seleccionan los alimentos que serán sometidos a estudio y que son consumidos de manera significativa por la población, en este caso son las nueces y el maní; en los cuales se va a determinar las aflatoxinas AFG2, AFG1, AFB2, AFB1.

### **2.8.2 Caracterización del peligro**

Se realiza una evaluación cualitativa y/o cuantitativa de la naturaleza de los efectos nocivos para la salud relacionados con agentes físicos, químicos o biológicos que puedan estar presentes en los alimentos. La caracterización del peligro combina la determinación de la presencia de un peligro con la probabilidad de que ocurra. El grado de exposición depende del nivel presente en el alimento, la cantidad de alimento consumido y el número de gente expuesta. (Magan, N.; Olsen, M., 2004)

Se diseñan las encuestas a aplicarse a un segmento de la población involucrada, con datos suficientes que brinden una información clara y detallada de la frecuencia de consumo de los alimentos en cuestión. Finalmente se da un tratamiento y gestión de los datos de consumo.

### **2.8.3 Evaluación de la exposición**

Se realiza una evaluación cualitativa y/o cuantitativa del nivel de ingestión probable de agentes físicos, químicos o biológicos a través de los alimentos. Es una combinación de los datos de exposición con los datos de consumo, mediante un análisis probabilístico. (FAO., 2006)



#### **2.8.4 Caracterización del riesgo**

Es la estimación cualitativa y/o cuantitativa, de la probabilidad de que se produzca un efecto nocivo y de su gravedad para la salud de una determinada población. Comparación con los niveles de referencia. (FAO., 2006)

#### **GESTIÓN DE RIESGO**

Es el proceso de identificar, evaluar, seleccionar e implementar acciones para la reducción de riesgos a la salud humana y al medio ambiente. Selección y aplicación de las posibles medidas de control apropiadas, incluidas las medidas reglamentarias. (FAO., 2006)

#### **COMUNICACIÓN DEL RIESGO**

Es el intercambio de información y criterios sobre los riesgos, entre personas encargadas de ello. (FAO., 2006)



## CAPÍTULO III

### METODOLOGÍA

#### 3.1 TIPO DE ESTUDIO

La presente investigación se basó en un diseño analítico no experimental, descriptivo de corte transversal.

Una investigación de tipo analítico no experimental es la que se realiza sin manipulación de las variables independientes. En una investigación no experimental se observan los fenómenos tal y como se dan en su contexto natural y luego son analizados. Se conoce también como investigación Ex Post Facto, término que proviene del latín, que significa después de ocurridos los hechos. La investigación no experimental es más natural y cercana a la realidad. (Hernández Sampieri, Fernández Collado, & Baptista Lucio, 2003)

Los diseños no experimentales pueden ser transversales, como es el caso de este estudio, ya que los datos se recopilan en un solo momento, siendo su objetivo describir variables y analizar su incidencia e interrelación en un momento dado. A su vez es descriptivo porque el estudio busca describir de modo sistemático las características de una población. Su meta no se limita a la recolección de datos, sino a la predicción e identificación de las relaciones que existen entre dos o más variables. Los investigadores no son meros tabuladores, sino que recogen los datos sobre la base de una hipótesis o teoría, exponen y resumen la información de manera cuidadosa y luego analizan minuciosamente los resultados, a fin de extraer generalizaciones significativas que contribuyan al conocimiento. (Hernández Sampieri, Fernández Collado, & Baptista Lucio, 2003).

Las variables a considerarse son: como variable independiente la concentración de aflatoxinas y como variable dependiente el riesgo toxicológico de la población de acuerdo al consumo de maní y nuez. Los indicadores del



estudio serán: los valores obtenidos de aflatoxinas mediante la técnica de la AOAC, los resultados de las encuestas aplicadas a la población, los resultados arrojados por el análisis estadístico, los resultados de riesgo toxicológico aplicado, la comparación de resultados con Normas Internacionales.

## 3.2 DESARROLLO DE LA INVESTIGACIÓN

El análisis experimental fue llevado a cabo en el Laboratorio de Alimentos y Nutrición de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca, en el período comprendido entre los meses de mayo y agosto del 2013.

### 3.2.1 Población, muestra y muestreo

#### 3.2.1.1 Población

El estudio se realizó en la ciudad de Cuenca, seleccionando como puntos de muestreo los cinco mercados de mayor afluencia de público, como son: mercado “El Arenal”, mercado “10 de Agosto”, mercado “12 de Abril, mercado “27 de Febrero” y mercado “9 de Octubre”.

#### 3.2.1.2 Tamaño de la muestra y muestreo

La muestra fue tomada en forma aleatoria estratificada de acuerdo al grado de afluencia de público en cada uno de los mercados. Un **muestreo aleatorio estratificado** es aquel en el que se divide la población en subpoblaciones o **estratos**, atendiendo a criterios que puedan ser importantes en el estudio. Para decidir el número de muestras que se tomaría por cada mercado, se basó en una investigación realizada anteriormente por el laboratorio de Alimentos y Nutrición de la Universidad de Cuenca, en el cual se hizo un análisis de preferencias de consumo en los mercados de la ciudad (Anexo 2). En base a lo cual se recolectaron sesenta muestras en total para ser sometidas al análisis



(treinta muestras de nuez y treinta muestras de maní), las cuales se distribuyeron en forma aleatoria estratificada.

Las muestras seleccionadas para el estudio fueron aquellas que se expenden a granel, que por lo general no guardan una manera correcta de conservación, ya que se mantienen en cajas abiertas a la intemperie sin ningún tipo de resguardo de los factores ambientales. El período de toma de muestras estuvo comprendido entre mayo y julio del año 2013.

### **3.2.2 Recolección de datos, métodos y técnicas**

#### **3.2.2.1 Aplicación de encuestas**

Se seleccionó en forma aleatoria segmentos de la población de la ciudad de Cuenca, comprendidos entre las edades de 15 a 55 años, y a su vez se dividió en estratos diferenciados por rangos de edades: de 15 a 18 años; de 19 a 34 años y de 35 a 55 años. En total se aplicaron 100 encuestas por producto (maní y nuez), de acuerdo a un modelo determinado en la investigación que permite obtener datos importantes para el estudio. (Anexo 1)

Con el fin de conseguir información relevante que nos ayude en la consecución de los objetivos planteados en la investigación, se aplicaron dos encuestas de consumo: recordatorio de 24 horas (24HR) y cuestionario de frecuencia de consumo (FFQ); además se solicitó a los encuestados datos personales como edad, sexo, talla, peso. (Anexo 1)

La encuesta de recordatorio de 24 horas, tiene como objetivo recolectar información lo más detallada posible respecto a los alimentos consumidos el día anterior (tipo, cantidad, modo de preparación). Esta técnica permite obtener estimaciones de la ingesta media de grupos de individuos. Sin embargo, como el consumo de alimentos presenta grandes variaciones de un día a otro, si se quisiera estimar la ingesta habitual de un individuo, será necesario realizar más de 1 recordatorio de 24 horas, por lo que se aplicaron dos encuestas de 24HR, con un intervalo de 15 días entre ellas.



Para que la recolección de la información sea más confiable se recurrió a medidas caseras o a la presentación de modelos de alimentos, que sirvan de referencia al encuestado para estimar las porciones consumidas. Estas medidas luego fueron transformadas a gramos.

Además es importante que una de las encuestas se realice en un día entre semana y la otra en un fin de semana ya que la dieta puede ser diferente; y, para complementar la información se debe formular una pregunta en la que se pueda conocer si la alimentación del día anterior fue como la de cualquier día o fue un día festivo o fue una dieta especial por enfermedad.

La encuesta de frecuencia de consumo (FFQ), tiene como objetivo evaluar el consumo habitual de ciertos alimentos en diferentes lapsos de tiempo (por día, semana, mes o año), y se debe establecer una lista de alimentos a evaluarse, en este caso serán las nueces y el maní, que pueden estar preparados en distintas formas. En esta encuesta deben registrarse también las cantidades aproximadas en las que se consumen dichos alimentos en los diferentes períodos de tiempo, expresándose en medidas caseras como ya se dijo anteriormente.

### **3.2.3 Determinación de Aflatoxinas**

La técnica utilizada se basó en las recomendaciones dadas por la AOAC para la determinación de aflatoxinas en alimentos. La técnica se fundamenta en los siguientes pasos: extracción, dilución, clean up, derivatización y el análisis por HPLC. La aflatoxinas fueron extraídas del producto a través de columnas de inmunoafinidad (IAC), las cuales poseen un gel en suspensión de anticuerpos monoclonales unido covalentemente a un soporte sólido, que son específicos para detectar las aflatoxinas B1, B2, G1, G2.



### 3.2.3.1 Recolección de muestras

Las muestras de maní y nuez fueron recolectadas en diferentes abacerías de los mercados, seleccionadas en forma aleatoria. Las muestras se compraron al granel en fundas plásticas, en una cantidad aproximada de 200 – 300 g por muestra, las mismas que fueron molidas mediante un procesador para alimentos previo al análisis. Cabe recalcar que las muestras fueron analizadas de una forma casi inmediata para evitar alguna posible alteración.

### 3.2.3.2 Materiales, equipos y reactivos

#### Materiales:

- Material de vidrio: frascos con tapa, embudos, tubos de ensayo, vasos de precipitación, probetas, pipetas de Pasteur, pipetas serológicas.
- Tubos Falcon 15 ml y de 50 ml
- Pera.
- Espátula
- Gradillas
- Soporte para embudos
- Manifold
- Papel filtro (Whatman # 4)
- Micropipetas 10-100  $\mu$ l, 100-1000  $\mu$ l
- Filtros de membrana PVDF 17 mm 0.45  $\mu$ m
- Jeringas de plástico desechable de 3 ml
- Viales de 2ml

#### Equipos:

- Balanza analítica
- Homogenizador horizontal (VWR-Advance Digital Shaker)
- Baño de María Marca Memerth.
- Centrifuga de mesa EBA-20 Marca Hettich
- Sistema de vacío, Marca Waters Milfor
- Purificador de agua Marca BarnStead International

- Baño Ultrasónico 5.7 lt. Marca Branson (desgasificador)
- Generador de Nitrógeno Marca Domnick Hunter
- Equipo HPLC

**Reactivos:**

- Solución metanol-agua (80:20, v/v)
- Cloruro de sodio
- PBS Buffer Fosfato pH 7,4. Se afora en un balón de 1 litro el contenido de un paquete de muestra seca de buffer fosfato pH 7,4 marca SIGMA en 1 litro de agua grado HPLC. 0.01M de buffer fosfato salino, 0.138 M de NaCl, 0.0027M de KCL a 25°C.
- Metanol (CH<sub>3</sub>OH) grado HPLC (Sigma-Aldrich)
- Acetonitrilo (CH<sub>3</sub>CN) grado HPLC (Sigma-Aldrich)
- Agua grado HPLC
- Columnas de inmunoafinidad EASI-EXTRACT® AFLATOXIN R- Biopharm Rhone LTD.
- Acido Trifluoracético (TFA)
- Hexano grado HPLC
- Solución acetonitrilo-agua (1:1 v/v)

**3.2.3.3 Procedimiento****a) Preparación de la muestra**

Las muestras recolectadas se procedieron a moler en un procesador de alimentos hasta conseguir un polvo más o menos fino.



**Figura 7. MUESTRAS TRITURADAS**

**b) Extracción**

- Pesar 20g de la muestra preparada.
- Adicionar 100 ml de la solución metanol-agua 80:20 v/v, (mezcla para extracción)
- Colocar 4 g de cloruro de sodio puro
- Mezclar vigorosamente en forma manual durante 1 minuto, y luego por 10 minutos en un homogenizador horizontal a temperatura ambiente a 300 rpm.
- Filtrar el extracto en papel filtro Whatman No. 4
- Centrifugar el filtrado por 10 minutos a 5000 rpm.



**Figura 8. HOMOGENIZADOR Y FILTRACIÓN DE MUESTRAS**



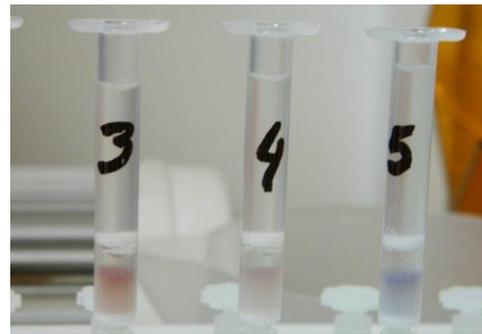
**Figura 9. CENTRÍFUGA EBA-20**

**c) Dilución**

- Tomar 5 ml del filtrado
- Adicionar 25 ml de buffer fosfato (PBS) pH 7.4

#### **d) Clean up**

- En el sistema de vacío Manifold, instalar las columnas de inmunoafinidad (IAC), las mismas que previamente deben ser acondicionadas a la temperatura ambiente.
- Prelavar las columnas con 1 ml de buffer fosfato pH 7.4
- Proceder a la filtración de los 30 ml de la muestra, a una velocidad de flujo de 2-3 ml por minuto. Es en este punto donde se produce la captura de la micotoxina.
- Lavar las IAC con 10 ml de PBS pH 7.4, seguido por 10 ml de agua grado HPLC, a una velocidad de flujo de 5 ml por minuto.
- Aplicar vacío por 5 – 10 segundos.
- Eluir la micotoxina, colocando 0.5 ml de metanol grado HPLC, dejar actuar por 1 minuto y eluir por gravedad.



**Figura 10. SISTEMA MANIFOLD Y COLUMNAS DE INMUNOAFINIDAD**

- Nuevamente colocar 0.5 ml de metanol grado HPLC, dejar actuar por 1 minuto, realizar un retrolavado (backflushing) con jeringa y eluir por gravedad.
- Lavar con 1 ml de agua grado HPLC (0.8 ml + 0.2 ml)
- Evaporar el eluido hasta sequedad bajo corriente de nitrógeno.



**Figura 11. GENERADOR DE NITROGENO - SECADO**

**e) Derivatización**

- Redissolver con 200  $\mu$ l de hexano y 200  $\mu$ l de ácido Trifluoracético (TFA)
- Colocar en baño maría a 65<sup>0</sup>C por 10 minutos.
- Evaporar a sequedad bajo corriente de nitrógeno.
- Reconstituir el residuo seco con 1000  $\mu$ l de una solución de acetonitrilo-agua (1:1 v/v)
- Desgasificar
- Filtrar con un filtro de 0.45  $\mu$ m
- Conservar a 4<sup>0</sup>C hasta el análisis.



**Figura 12. VIAL CON FILTRADO**

**f) Análisis de muestras por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) con detección de Fluorescencia.**

La cromatografía es un método que engloba a un conjunto de técnicas de análisis que se basan en la separación de los componentes de una mezcla,



para posteriormente identificarlos y cuantificarlos. Las técnicas cromatográficas son muy variadas pero en todas ellas hay una fase móvil que es un fluido (gas, líquido o fluido supercrítico) que se desplaza sobre una fase estacionaria que está inmovilizada en una columna o fijada sobre un soporte y que puede ser un sólido o un líquido fijado en un sólido.

El principio de la cromatografía se fundamenta en los equilibrios de concentración de los compuestos presentes entre dos fases no miscibles. Los componentes de la mezcla interactúan de distinta forma con la fase estacionaria y con la fase móvil. De este modo, los componentes atraviesan la fase estacionaria a distintas velocidades y se van separando.

En la HPLC, la fase móvil arrastra a la muestra con un flujo constante de presión proporcionado por una bomba hasta llegar al punto donde es introducida la muestra. Siguiendo el flujo de presión la lleva a una columna en donde se encuentra la fase estacionaria en donde los componentes la atraviesan a diferentes velocidades y se van separando. Posteriormente pasan a un detector que genera una señal que puede depender de la concentración y del tipo de compuesto.

El papel esencial de las bombas es impulsar a la fase móvil con presión y flujo constante, el proceso de inyección de la muestra en la actualidad es automática, las columnas que se utilizan normalmente son de acero inoxidable y el papel fundamental de los detectores es indicar el momento de aparición de los diferentes componentes que constituyen la muestra, calificarlo cuantitativamente como cualitativamente.

La velocidad de elución de los analitos de interés presentes en la fase móvil dependerá de la solubilidad de estos en la fase móvil y de la fuerza de interacción de dicho compuesto con la fase estacionaria. (Herrera Querol, 2012)

Para la aplicación de las técnicas cromatográficas se requiere conocer las características fisicoquímicas y la estructura molecular para una adecuada



separación y determinación de los analitos, ya que esto depende de su polaridad. Tanto la fase móvil como la fase estacionaria juegan un papel importante en la separación, lo que hace que la retención cromatografía sea el resultado del trinomio fase móvil/fase estacionaria/analito.

Se puede considerar que la separación se ha completado cuando en el cromatograma aparecen tantos picos como analitos existan en la mezcla objeto de análisis. El tiempo de retención de cada uno de los analitos es el tiempo que transcurre desde que se inyecta la muestra en el cromatógrafo hasta que el pico correspondiente a cada compuesto eluído alcanza su máxima altura. (Herrera Querol, 2012)

En este tipo de estudios, los proveedores recomiendan que se filtre y se desgasifique todo componente antes de ser introducido a un sistema de HPLC, esto con el propósito de evitar daños futuros.

#### ***g) Condiciones para el HPLC:***

- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución marca Agilent Technologies Serie 1200.
- Bomba cuaternaria, adecuada para el volumen de flujo constante de aproximadamente 1 ml/min
- Columna Cromatográfica Agilent ZORBAX C18 de fase reversa de 4,6 mm X 250 mm, tamaño de partícula 5  $\mu$ m con envase de octadecyl- silica gel.
- Unidad de control del equipo y tratamiento de los datos con el programa software Agilent Chemstation for LC and LC/MC systems (LCI200 online, LCI200 offline).

#### ***h) Preparación de estándares***

Para la cuantificación de las aflatoxinas se debe elaborar una curva de calibración a partir de estándares preparados con las toxinas puras.



- Soluciones estándar: Se adiciona 1 ml de acetonitrilo puro sobre el estándar de extracto seco puro de Aflatoxinas (1 mg) (Sigma) para lograr una concentración de 1 mg/ml. Se disuelven 500  $\mu$ l con 4,5 ml de acetonitrilo (dilución 1/10) para lograr de 0.1 mg/ml. Se transfieren alícuotas de 200  $\mu$ l a microtubos, se secan bajo una corriente de nitrógeno y se almacenan en refrigeración (4-8°C). Para reconstituir se añade 1 ml de acetonitrilo puro, obteniendo una concentración de 20  $\mu$ g/ml, de la cual se realizan diluciones posteriores para lograr las concentraciones necesarias para la curva de calibración.

**Tabla 4. CONDICIONES PARA HPLC**

Condiciones HPLC	AFs			
Tipo de columna	C <sub>18</sub> , 250 x 4.6 mm, 5 $\mu$ m			
Modo de elución	Gradiente			
Programa gradiente + Fase móvil	<b>Fase móvil</b>			
	<b>Solvente</b>	<b>A</b>	<b>C</b>	<b>D</b>
	<b>Minuto</b>	Agua/metanol//a.acético (89:10:1, v/v/v)	Acetonitrilo	Metanol
	0-1	59 %	16 %	25 %
	1-10	14 %	16 %	70 %
	10-14	14 %	16 %	70 %
	14-15	59 %	16 %	25 %
	20	59 %	16 %	25 %
Detección	<p><i>AFG<sub>2</sub></i> y <i>AFB<sub>2</sub></i>: Fluorescencia: <math>\lambda_{ex}</math>=365 nm ; <math>\lambda_{em}</math>= 455 nm</p> <p><i>AFG<sub>1</sub></i> y <i>AFB<sub>1</sub></i>: Fluorescencia: <math>\lambda_{ex}</math>=365 nm ; <math>\lambda_{em}</math>= 432 nm</p>			
Flujo constante	1.2 ml min <sup>-1</sup>			
Temperatura de columna	40°C			
Volumen de inyección	5 $\mu$ l (extracto filtrado)			

	AFG2	AFB2	AFG1	AFB1
Tiempo de retención (minutos)	3.1	4.6	3.7	5.6

Fuente: Laboratorio de Alimentos y Nutrición de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca

### OTRAS CONSIDERACIONES

- Las soluciones stock bien conservadas son estables por 1 año.
- Proteger las muestras, estándares y extractos de la luz ultravioleta.
- PBS (buffer fosfato salino) es adicionado al filtrado para purificación.
- La reacción con ácido trifluoracético para la pre-columna de derivatización da como resultado la formación de un hemiacetal (AFB<sub>1a</sub>, AFG<sub>1a</sub>) por adición de una molécula de agua al doble enlace del anillo furánico. La necesidad de la formación del hemiacetal (derivatización) se debe a que la AFB<sub>2</sub> y la AFG<sub>2</sub> son más fluorescentes que la AFB<sub>1</sub> y la AFG<sub>1</sub>, razón por la cual éstas necesitan derivatizarse para potenciar la fluorescencia y por lo tanto la señal en el equipo.



Figura 13. EQUIPO PARA HPLC

### 3.3 VALIDACIÓN DEL MÉTODO

Es el procedimiento para establecer pruebas documentales que demuestren científicamente que un método analítico tiene las características de desempeño



que son adecuadas para cumplir los requerimientos de las aplicaciones analíticas pretendidas. (Arriola, 2012; Herrera Querol, 2012)

En esta investigación se evaluaron los siguientes parámetros: especificidad, linealidad, precisión (repetibilidad intra e inter-día), límites de detección (LD) y límites de cuantificación (LQ).

**3.3.1 Especificidad.** Este parámetro estudia la capacidad del método de distinguir el analito de cualquier otra interferencia presente en las muestras que se analizan. Para verificar que ninguna interferencia coincide en la región de elución del analito de interés se analizaron estándares de Aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 en HPLC con el método de análisis. (Herrera Querol, 2012)

**3.3.2. Linealidad.** Es la capacidad de un método para obtener resultados directamente proporcionales a la concentración o cantidad de analito en un rango definido. Este parámetro es inherente a las técnicas instrumentales donde el analito genera una señal electrónica medida por el detector que se registra en el cromatograma. (Herrera Querol, 2012)

La linealidad viene representada a través de una recta de regresión lineal. Para la construcción de la curva de calibración se utilizaron patrones analíticos a distintas concentraciones. Para verificar la linealidad se calculó el coeficiente de correlación ( $R^2$ ) de la curva de calibración.

Para pruebas de linealidad se realizaron curvas de calibración de 9 puntos equidistantes de concentración que osciló entre 0.125-50 ng/ml.

**3.3.3. Sensibilidad.** Es la capacidad del instrumento o de un método para discernir o diferenciar pequeñas variaciones en la concentración de un analito. Existen dos parámetros relacionados con la sensibilidad: el límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LQ).



- **Limite de detección (LD):** Es la menor cantidad de un analito cuya señal pueda ser detectada con fiabilidad y bien distinguida de la del ruido. Un factor que afecta directamente a la exactitud y la precisión de un análisis es el ruido. Un parámetro que se utiliza para certificar la calidad de un método analítico es la relación señal/ruido (S/N), siendo S la señal correspondiente al compuesto objeto de estudio a un determinado nivel (medida en altura) y N la señal del ruido de fondo (midiendo la señal eléctrica que da en altura el ruido). Este valor se obtiene multiplicando 3 veces la señal sobre el ruido a partir de los datos de estimación lineal de las aéreas y concentraciones de la matriz de base.
- **Limite de cuantificación (LQ):** Es la menor cantidad de analito de la muestra que puede ser cuantitativamente determinado con una exactitud aceptable. Es un parámetro que se utiliza en el análisis cuantitativo para niveles bajos de analitos en matrices de muestra.

**3.3.4. Recuperación (Recovery).** Es el porcentaje de la concentración real de una sustancia recuperada durante un procedimiento analítico. La determinación del grado de recuperación para las aflatoxinas se realizó a partir de la contaminación de muestras puras a una concentración conocida de toxina, comparando el resultado con los datos recolectados en el HPLC para verificar el porcentaje de recuperación que detecta el equipo con respecto a la concentración inyectada.

Para pruebas de recuperación se contaminó a la muestra seca previo al proceso de extracción con una mezcla de solución estándar de las 4 aflatoxinas a una concentración de 5 µg/ml. Se agregaron 80 µl de solución estándar (equivalente a 400 ng de cada toxina) a 20 gramos de muestra y se dejó en contacto con la muestra toda la noche (14 horas). Con esta muestra se continuó con la extracción, y teóricamente, al final del análisis debería obtenerse un eluido que contenga una concentración de 20 ng/ml de cada toxina. Para hallar el porcentaje de recuperación, se calcularon los resultados



obtenidos en las muestras enriquecidas con las ecuaciones de la recta procedentes de las rectas de calibración.

**3.3.5. Exactitud.** La exactitud es el grado de concordancia entre el resultado del ensayo y un valor de referencia aceptado. La exactitud se calcula determinando la veracidad y la precisión (repetibilidad y reproducibilidad).

**3.3.6. Precisión.** Es el grado de concordancia entre ensayos independientes obtenidos bajo condiciones estipuladas.

Para determinar este parámetro se analizaron seis muestras de maní y seis muestras de nuez enriquecidas con 15 ng/ml de aflatoxinas, cada una y analizadas por 3 días consecutivos.

Los valores de precisión se establecieron en base a la desviación estándar relativa en condiciones de repetibilidad (RSDr %) obtenida al analizar una misma muestra varias veces, en un intervalo de tiempo corto, sin cambiar de equipo de medida, reactivos y analista.

La repetibilidad intra-day se determinó calculando la desviación estándar relativa de los resultados obtenidos al analizar tres muestras enriquecidas con 15 ng/ml de aflatoxinas, que fueron extraídas el mismo día, en el mismo laboratorio, equipo HPLC y analista. La repetibilidad inter-day se determinó calculando la desviación estándar relativa de los resultados obtenidos al analizar tres muestras enriquecidas con 15 ng/ml de aflatoxinas, que fueron extraídas y analizadas en tres días consecutivos.

### 3.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El método estadístico moderno se refiere a la Inferencia estadística, ésta se relaciona con el desarrollo de métodos y técnicas para obtener, analizar e interpretar datos cuantitativos de tal manera que la confiabilidad de las conclusiones basadas en los datos pueda ser evaluada objetivamente por



medio del uso de la probabilidad. La teoría de la probabilidad permite pasar de datos específicos a conclusiones generales, por eso desempeña un papel fundamental en la teoría y aplicación de la estadística.

Cuando se hace una inferencia estadística, debe procederse con cautela, ya que debe decidirse hasta qué punto pueden hacerse generalizaciones a partir de un conjunto de datos disponibles, si las generalizaciones son razonables o si sería preferible disponer de un mayor número de datos.

Para que un análisis estadístico sea confiable los datos obtenidos deben ser apropiados, existiendo algunas maneras de hacerlo y entre ellas está la utilización de datos publicados por fuentes confiables, la aplicación de encuestas y la experimentación.

El análisis estadístico se realizó utilizando el software Stata versión 10.0 que es un programa completo e integrado de estadísticas para investigadores de diferentes disciplinas, desde bioestadísticos hasta investigadores sociales y económicos.

En primer lugar se realizó un análisis descriptivo de las variables obtenidas en la encuesta, en el cual se determinó la media y la desviación estandar. Los resultados obtenidos se representó por medio de histogramas y gráficos de barras. Para correlacionar las variables categóricas se aplicó la prueba de Chi-cuadrado ( $X^2$ ) con un nivel de significancia del 5% ( $p > 0.05$ ). El test de ANOVA (análisis de varianza), se aplicó a situaciones complejas como relacionar poblaciones y saber si las diferencias son significativas.

En lo que respecta a las variables numéricas se aplicó la prueba t-student con el fin de comparar las medias de consumo de alimentos semanal frente a la presencia o ausencia de aflatoxinas planteando la hipótesis nula de la diferencia entre las medias igual a cero y la hipótesis alternativa de medias diferentes. Se consideran significativos los valores de p menores o iguales a 0.05 con respecto a la hipótesis alternativa.



### 3.5 SIMULACIÓN DE MONTE CARLO

Es una técnica cuantitativa que hace uso de la estadística y los ordenadores para imitar mediante modelos matemáticos el comportamiento aleatorio de sistemas reales no dinámicos. La clave de esta simulación consiste en crear un modelo matemático del sistema, proceso o actividad que se quiere analizar, identificando aquellas variables cuyo comportamiento aleatorio determina el comportamiento global del sistema. Una vez identificadas dichas variables aleatorias se lleva a cabo un experimento consistente en generar, con ayuda del ordenador, muestras aleatorias (valores concretos) para dichas variables, y luego analizar el comportamiento del sistema ante los valores generados. Tras repetir  $n$  veces este experimento, dispondremos de  $n$  observaciones sobre el comportamiento del sistema, lo cual nos será de utilidad para entender el funcionamiento del mismo. Obviamente, nuestro análisis será tanto más preciso cuanto mayor sea el número  $n$  de experimentos que llevemos a cabo. (Juan & Faulín, 2005)

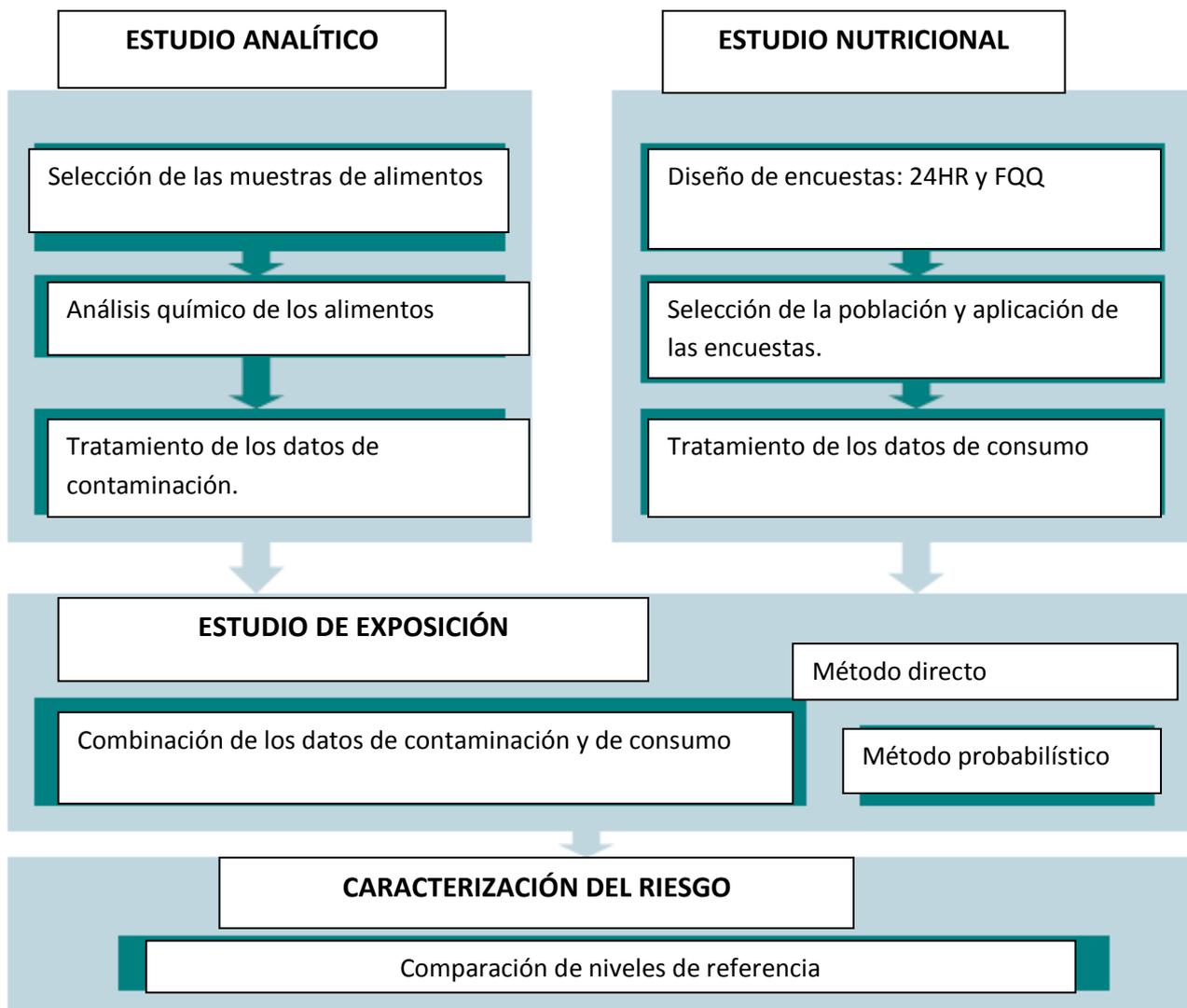
El modelo probabilístico es la forma que pueden tomar un conjunto de datos obtenidos de muestreos de datos con comportamiento que se supone aleatorio.

### 3.6 EVALUACIÓN DEL RIESGO

La evaluación del riesgo de exposición se realizó utilizando modelos matemáticos de regresión logarítmica y regresión lineal, utilizando el **software simulación de Montecarlo**, con respecto a los datos de frecuencia de consumo, la presencia de aflatoxinas y su respectiva concentración. Seleccionando los que presentaban un nivel de significancia de  $p > 0.20$  como candidatos para la regresión logística y lineal múltiple.

La simulación de MonteCarlo es una técnica que combina conceptos estadísticos (muestreo aleatorio) con la capacidad que tienen los ordenadores para generar números pseudo-aleatorios y automatizar cálculos. Este método está presente en todos aquellos ámbitos en los que el comportamiento aleatorio o probabilístico desempeña un papel fundamental

La regresión logística se utiliza para analizar la probabilidad de que se presente contaminación de alimentos con aflatoxinas y la regresión lineal para establecer la relación numérica de las variables analizadas (alimento vs concentración aflatoxina) siendo ambas variables predictivas de la variable respuesta.



**Figura 14. REPRESENTACION ESQUEMÁTICA DEL ESTUDIO DE EVALUACIÓN DE RIESGO**

Fuente: Agencia Catalana de Seguridad Alimentaria. 2009.



**Cociente de peligrosidad:** Es la relación entre la dosis suministrada y la Ingesta Diaria Tolerable (TDI). Valores muy cercanos o por encima de la unidad indican valores inaceptables de riesgo asociado a la exposición.

**Margen de seguridad:** Es la relación entre el Nivel sin efecto adverso observado (NOAEL) y la dosis suministrada (percentil 95). Un valor superior a 1 indica que hay suficiente seguridad en el consumo.



## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS

#### 4.1 GENERALIDADES DE LA POBLACIÓN ESTUDIADA

La población estudiada vive en la ciudad de Cuenca y estuvo conformada por 100 personas, 57 hombres y 43 mujeres de diferentes edades, los mismos que se categorizaron por rangos de edades: 15 – 18 años (adolescentes), 19 – 34 años (jóvenes) y de 35 – 55 años (adultos).

**Tabla 5. DISTRIBUCIÓN DE LA POBLACIÓN ESTUDIADA**

SEXO	EDAD EN CATEGORIAS			TOTAL DE ENCUESTADOS
	15-18 años	19-34 años	35- 55 años	
<b>Masculino</b>	23 (74%)	18 (45%)	16 (55%)	57
<b>Femenino</b>	8 (26%)	22 (55%)	13 (45%)	43
<b>Total</b>	31(100%)	40 (100%)	29 (100%)	100

Los productos escogidos para esta investigación fueron maní y nuez que se expenden a granel en abacerías, de los cuales se analizaron 30 muestras de cada uno, 60 en total, las mismas que fueron recolectadas en forma aleatoria estratificada en cinco mercados de la ciudad de Cuenca. (Tabla 13)

#### 4.2 PATRONES DE CONSUMO

De un total de 200 encuestas (dos encuestas aplicadas a 100 personas), el 53% (n=107) afirman haber consumido maní en distintas preparaciones y en distintas porciones el día anterior a la entrevista, frente a un 31.5% (n=62) de



encuestados que consumieron nuez en distintas preparaciones y en diferentes porciones.

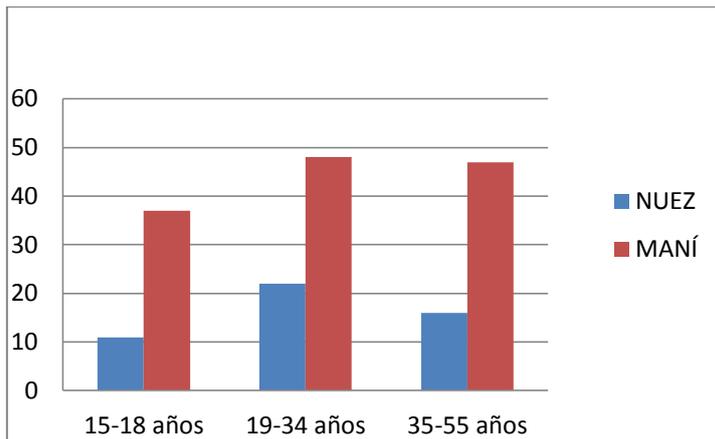
**Tabla 6. CONSUMO DE NUEZ Y MANÍ EN LA POBLACIÓN ESTUDIADA**

PRODUCTO	NUMERO DE OBSERVADOS	NUMERO DE CONSUMIDORES	PORCENTAJE
NUEZ	200	63	31.5%
MANÍ	200	106	53 %

También se evaluó mediante un test de Student, si el consumo de maní y nuez difería entre los distintos grupos de edad (Tabla 8), con los datos obtenidos en la encuesta de 24HR y se observó que existieron diferencias significativas entre el consumo de nuez y maní de acuerdo al grupo de edad. Según el test se puede afirmar que hay una preferencia notable por el consumo de maní en todas las categorías de edad, siendo más notoria la diferencia en los grupos de edades de 15 – 18 años y de 35 – 55 años.

**Tabla 7. RELACIÓN EDAD - CONSUMO DE MANÍ Y NUEZ**

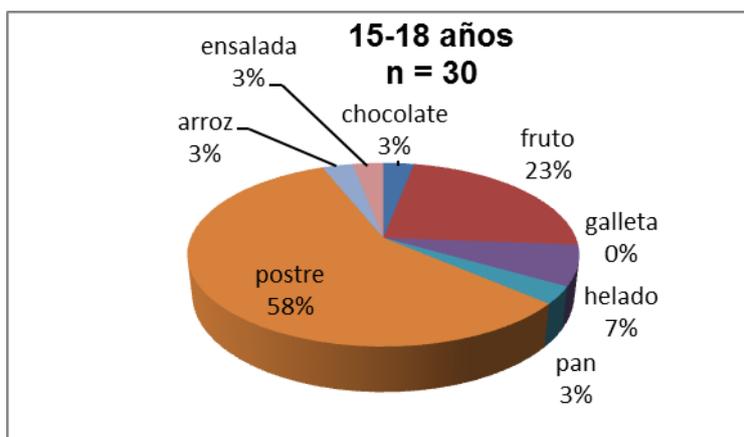
EDAD (años)	PRODUCTO	% OBSERV.	MEDIA (g)	DESV. ST.	INTERV.CONFIANZA 95%	Pr
15 – 18	NUEZ	31	11.31	7.29	8.63 – 13.98	<b>&lt;0.001</b>
	MANÍ	56	37.35	39.69	26.72 – 47.98	
19 – 34	NUEZ	20	22.38	16.49	14.66 – 30.10	<b>0.004</b>
	MANÍ	27	47.53	33.73	34.18 – 60.87	
35 – 55	NUEZ	12	16.13	9.69	9.97 – 22.28	<b>0.011</b>
	MANÍ	23	46.94	38.84	30.14 – 63.74	



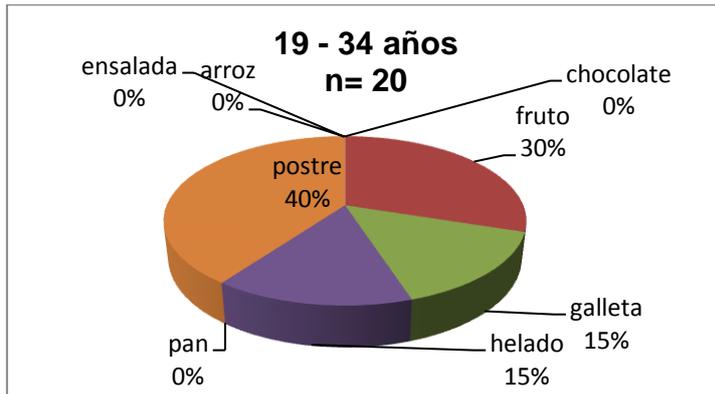
**Figura 15. RELACIÓN EDAD – CONSUMO (g/día)**

Un aspecto importante del estudio es que según los datos recogidos de las encuestas, las personas tienen un abanico de opciones para poder consumir tanto la nuez y el maní en diferentes preparaciones, y en muchas ocasiones las personas no se dan cuenta de que los están consumiendo ya que se encuentran combinados con otros alimentos.

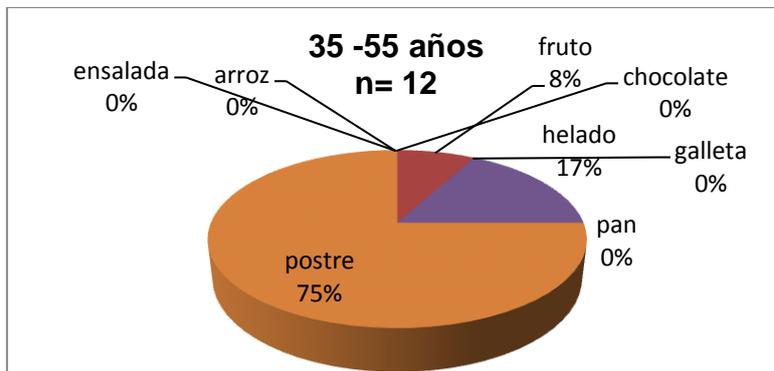
De acuerdo a los datos recogidos, la nuez se consume en galletas, helado, pan, postres, arroz, ensalada, etc. Se evaluó la preferencia de la forma de consumo de nuez por grupos de edad mediante la prueba de Chi<sup>2</sup>, sin encontrarse diferencias significativas ( $P=0,38$ ), sin embargo se pudo observar que en todos los grupos hay un mayor consumo de nuez en forma de postres, seguida del fruto como tal.



**Figura 16. FORMAS DE CONSUMO DE NUEZ: 15 - 18 AÑOS**



**Figura 17. FORMAS DE CONSUMO DE NUEZ: 19 -34 AÑOS**

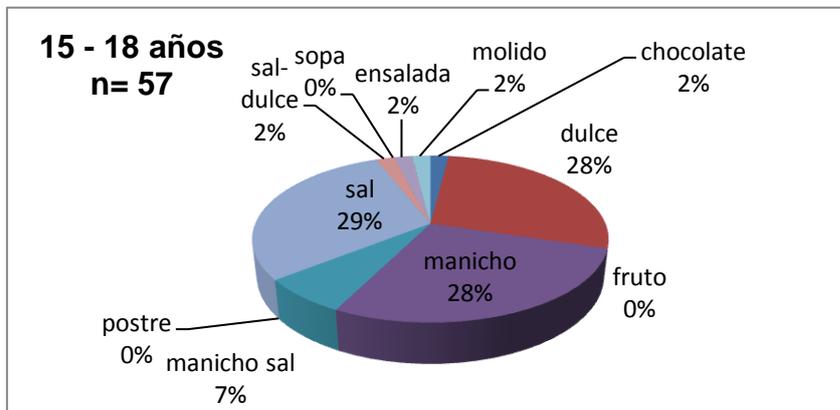


**Figura 18. FORMAS DE CONSUMO DE NUEZ: 35 - 55 AÑOS**

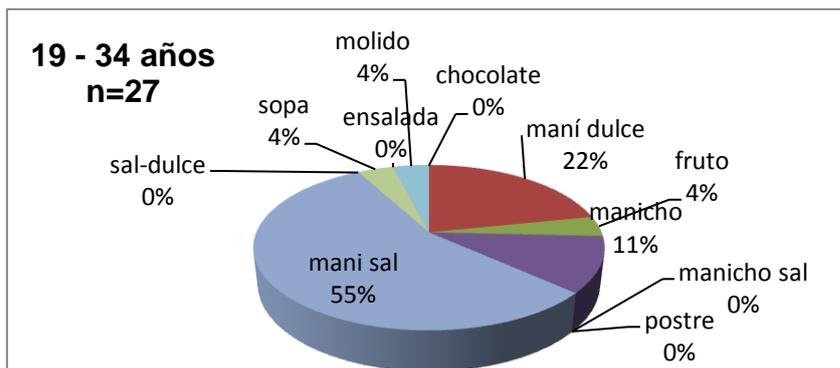
De la misma manera se hizo una evaluación a la población sobre las formas de preparación que se realiza con el maní y cuál de ellas es la preferida, por lo que según los datos recolectados en las encuestas, existe una gran variedad de formas de consumirlo, mayor a la nuez. Así pues, el maní puede consumirse como: chocolate, postres, ensalada, maní dulce, maní de sal, sopas, ensalada, molido, sal-dulce, etc. Luego de la prueba de Chi<sup>2</sup> se determinó que existen diferencias significativas ( $P= 0.008$ ) en lo que respecta a las formas de consumo y la edad, pero es notorio observar que las personas de todos los rangos de edad prefieren consumir el maní de sal, aunque en los adolescentes y adultos jóvenes también hay una preferencia por el manicho y el maní de dulce. Cabe indicar que el maní en nuestro medio es muy consumido por



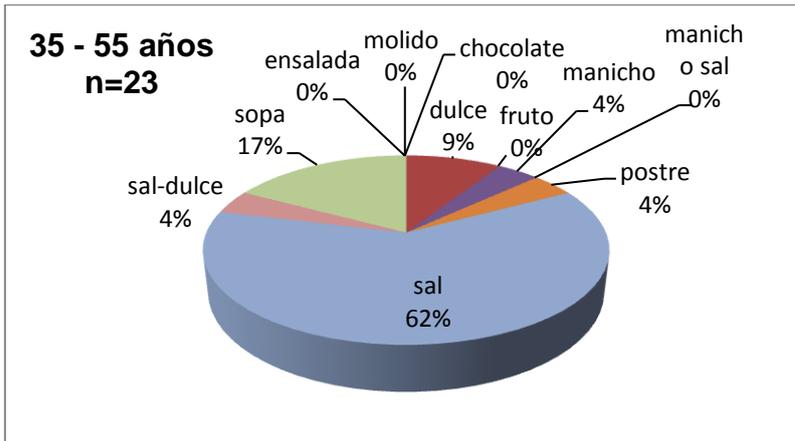
personas de todas las edades y en todos los niveles sociales, ya que en el país hay una buena producción en las provincias de Loja, Manabí, El Oro y Guayas; por otro lado, el costo es bajo comparado con la nuez, y se presta por sus características a una gran cantidad de preparaciones culinarias.



**Figura 19. FORMAS DE CONSUMO DE MANÍ: 15 - 18 AÑOS**

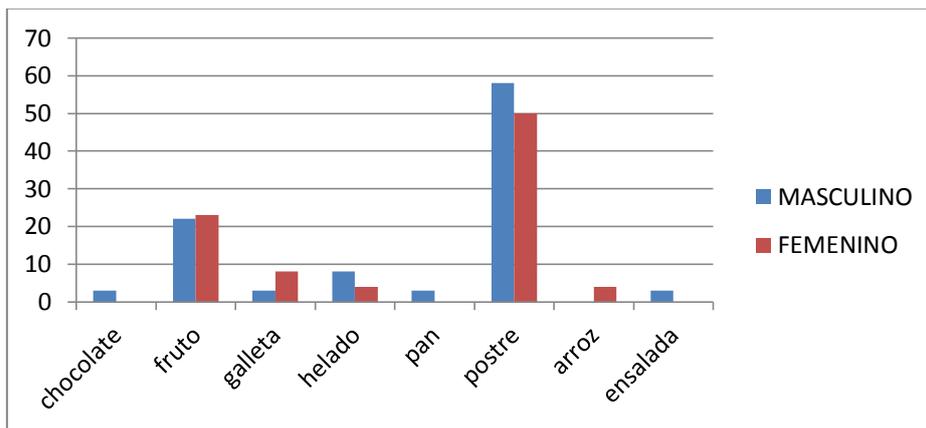


**Figura 20. FORMAS DE CONSUMO DE MANÍ: 19 - 34 AÑOS**



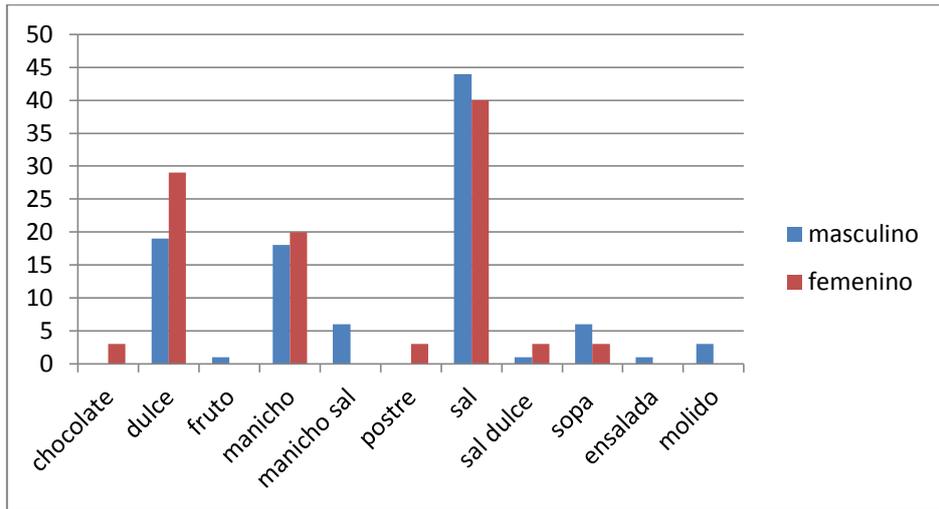
**Figura 21. FORMAS DE CONSUMO DE MANÍ: 35 - 55 AÑOS**

Se evaluó también, las preferencias entre hombres y mujeres en cuanto a la forma de preparación de la nuez (prueba de Chi<sup>2</sup>), obteniéndose como resultado que no hay diferencias significativas (P= 0.64), ya que se puede ver claramente que la prefieren consumir en postres.



**Figura 22. PREFERENCIA DE FORMA DE CONSUMO DE NUEZ DE ACUERDO AL SEXO**

Igual evaluación se realizó con el maní, y se pudo concluir que tanto hombres como mujeres prefieren consumirlo en forma de maní de sal, seguido por el maní de dulce; por lo que no existen diferencias significativas (P= 0.47)



**Figura 23. PREFERENCIA DE FORMA DE CONSUMO DE MANÍ DE ACUERDO AL SEXO**

#### 4.3 RECORDATORIO DE 24 HORAS

La encuesta de Recordatorio de 24 horas (R24H) es una encuesta que busca información con respecto a la alimentación del día inmediatamente anterior a la entrevista. Si esta encuesta se aplica por una sola vez no es representativa, por lo que se recomienda la realización de más de un cuestionario. En este caso se realizaron dos encuestas en un lapso comprendido en quince días. Se puede afirmar que los datos obtenidos en esta encuesta son bastante confiables.

En las tablas siguientes podemos observar claramente que prácticamente no hay diferencia significativa en el promedio de consumo en las dos encuestas de 24RH, tanto para la nuez ( $P = 0.96$ ) como para el maní ( $P = 0.52$ ), a pesar que la encuesta se realizó con diferencia de 15 días, por tanto podemos concluir que la información obtenida es bastante confiable y que las personas encuestadas tienen un consumo más o menos continuo de este tipo de frutos.



**Tabla 8. NUEZ: ENCUESTA 24HR - COMPARACIÓN EN PROMEDIO, DESVIACIÓN ESTANDAR Y MÍNIMO Y MÁXIMO**

PRODUCTO NUEZ	NUMERO DE OBSERVADOS	PROMEDIO (g)	DESV.STAND	Mínimo - Máximo
DIA 1	31/100	15.82	12.41	5.71 - 62.28
DIA 2	32/100	15.67	12.26	5.71 - 62.28

**Tabla 9. MANÍ: ENCUESTA 24HR. COMPARACIÓN EN PROMEDIO, DESVIACIÓN ESTANDAR Y MÍNIMO Y MÁXIMO**

PRODUCTO MANÍ	NUMERO DE OBSERVADOS	PROMEDIO (g)	DESV.STAND	Mínimo - Máximo
DIA 1	48/100	39.4	29.59	5.71 - 183.15
DIA 2	58/100	44.2	43.98	5.71 - 244.2

#### 4.4 FRECUENCIA DE CONSUMO

Este tipo de encuesta tiene como objetivo buscar información sobre la frecuencia con que un alimento es consumido durante un determinado período de tiempo y fue diseñada solamente para entregar información cualitativa respecto al consumo. Tiende a sobreestimar o subestimar las ingestas. Por lo tanto comparamos el consumo diario de FFQ con 24HR en días para establecer si hubo sobre o subestimación. En este caso ha resultado que hubo una subestimación.

La frecuencia de consumo se va a expresar en g/día para unificar la medida de tiempo estimado.

**Tabla 10. PROMEDIO DE FRECUENCIA DE CONSUMO (FFQ)**

PRODUCTO	NUMERO DE OBSERVADOS	PROMEDIO (g)	DESV.STAND	Mínimo - Máximo (g/día)
NUEZ	91/100	3.5	7.5	0.04 - 62.3
MANÍ	97/100	8.2	9.7	0.11 - 44.2

#### 4.5 CARACTERÍSTICAS DEL MUESTREO PARA EL ANÁLISIS DE MICOTOXINAS

Para esta investigación se recolectaron 30 muestras de nuez y 30 muestras de maní, compradas en forma aleatoria en diferentes abacerías de los cinco mercados seleccionados para el estudio. Las muestras fueron molidas en un procesador de alimentos y se analizaron en forma inmediata para evitar su alteración.

**Tabla 11. DISTRIBUCIÓN DE MUESTRAS POR MERCADO**

MERCADO	NUMERO DE MUESTRAS	
	MANI	NUEZ
10 de Agosto	4	4
27 de Febrero	3	3
9 de Octubre	3	3
12 de Abril	6	6
El Arenal	14	14
<b>Total de muestras</b>	<b>30</b>	<b>30</b>



#### 4.6 RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE AFLATOXINAS

Como ya se anotó anteriormente se analizaron 60 muestras, 30 de nuez y 30 de maní. En las tablas que se presentan a continuación se reportan las muestras de nuez y maní que resultaron positivas a las diferentes aflatoxinas con sus respectivos valores expresados en  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , además del mercado en donde se obtuvieron las mismas.

**Tabla 12. CONCENTRACIÓN DE AFLATOXINAS EN MUESTRAS DE NUEZ POR MERCADO**

Número de Muestra	Mercado	AFG2 $\mu\text{g}/\text{kg}$	AFG1 $\mu\text{g}/\text{kg}$	AFB2 $\mu\text{g}/\text{kg}$	AFB1 $\mu\text{g}/\text{kg}$
N-07	27 de Febrero	-	-	-	0,14
N-08	9 de Octubre	-	1,85	-	-
N-09	9 de Octubre	-	0,64	-	0,21
N-16	12 de Abril	-	-	-	0,14
N-18	El Arenal	-	-	-	1,39
N-20	El Arenal	-	0,42	-	0,2

**Tabla 13. CONCENTRACIÓN DE AFLATOXINAS EN MUESTRAS DE MANÍ POR MERCADO**

Número de Muestra	Mercado	AFG2 $\mu\text{g}/\text{kg}$	AFG1 $\mu\text{g}/\text{kg}$	AFB2 $\mu\text{g}/\text{kg}$	AFB1 $\mu\text{g}/\text{kg}$
M-01	10 de Agosto	-	-	-	0,21
M-02	10 de Agosto	-	1,1	-	0,25
M-10	9 de Octubre	-	0,63	-	-
M-11	12 de Abril	0,82	3,17	-	0,38
M-16	12 de Abril	-	2,03	-	0,41
M-18	El Arenal	-	1,93	-	-
M-23	El Arenal	-	1,12	-	-
M-24	El Arenal	-	1,67	-	-
M-27	El Arenal	-	-	-	0,31
M-28	El Arenal	-	616,87	-	14,96
M-29	El Arenal	-	1,23	-	-
M-30	El Arenal	-	1,46	-	-

Se puede observar claramente el alto índice de contaminación de la muestra de maní número 28, en donde el valor de AFG1 es de 616,87  $\mu\text{g}/\text{kg}$  y el de AFB1 es de 14,96  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , siendo los valores permitidos por las normas de 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$



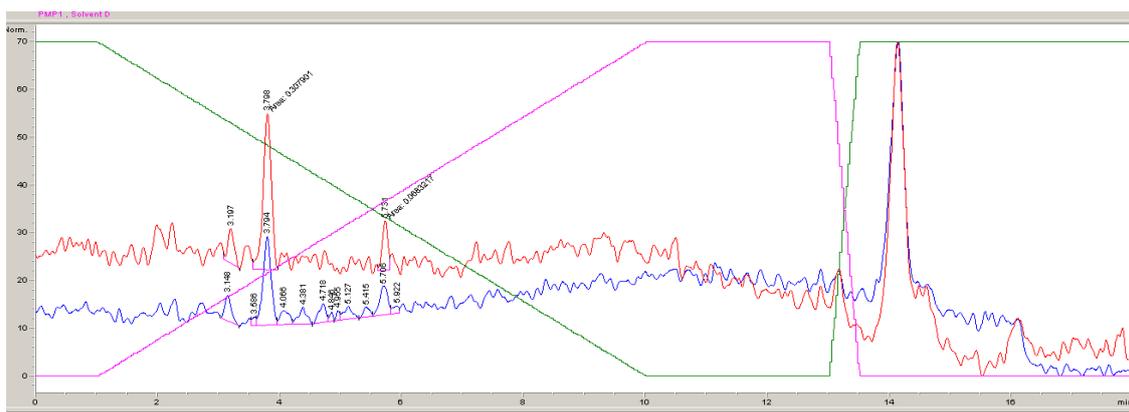
para las aflatoxinas totales y de 2  $\mu\text{g}/\text{kg}$  para la AFB<sub>1</sub>. El resto de valores están dentro de los rangos permitidos.

De acuerdo al estudio no hay diferencias significativas entre la contaminación con aflatoxinas totales (maní y nuez) con relación a los mercados ( $P= 0.8$ ), aunque se puede observar que en relación al número de muestras el mercado 9 de octubre presenta el más alto porcentaje de contaminación, lo que se puede observar en la siguiente tabla:

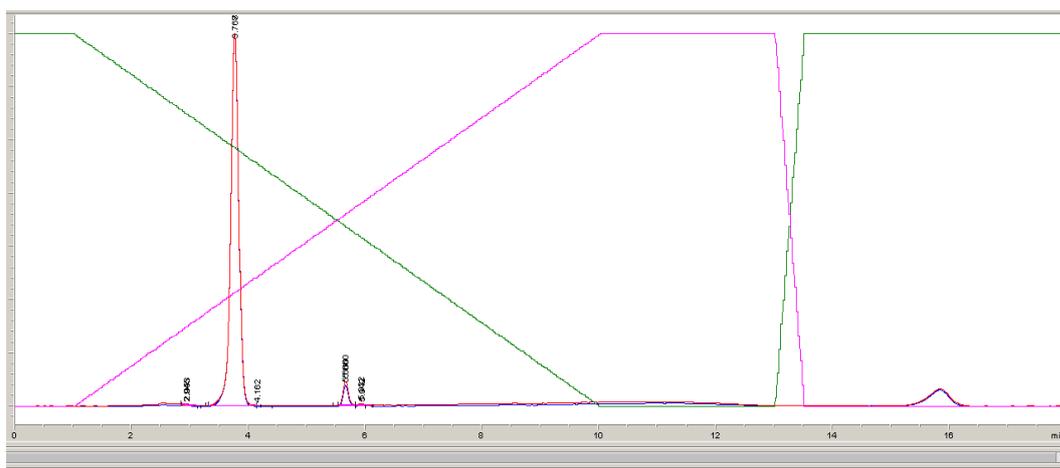
**Tabla 14. TOTAL DE MUESTRAS POSITIVAS POR MERCADO**

MERCADO	AFG <sub>2</sub>		AFG <sub>1</sub>		AFB <sub>2</sub>		AFB <sub>1</sub>		TOTAL	%
	NUEZ	MANÍ	NUEZ	MANÍ	NUEZ	MANÍ	NUEZ	MANÍ		
10 de Agosto	-	-	-	1	-	-	-	2	3/8	37.5
27 de Febrero	-	-	-	-	-	-	1	-	1/6	16.6
9 de Octubre	-	-	2	1	-	-	1	-	4/6	66.6
12 de Abril	-	1	-	2	-	-	1	2	6/12	50
El Arenal	-	-	1	6	-	-	2	2	11/28	39.28
TOTAL	0	1	3	10	0	0	5	6	25/60	41.66

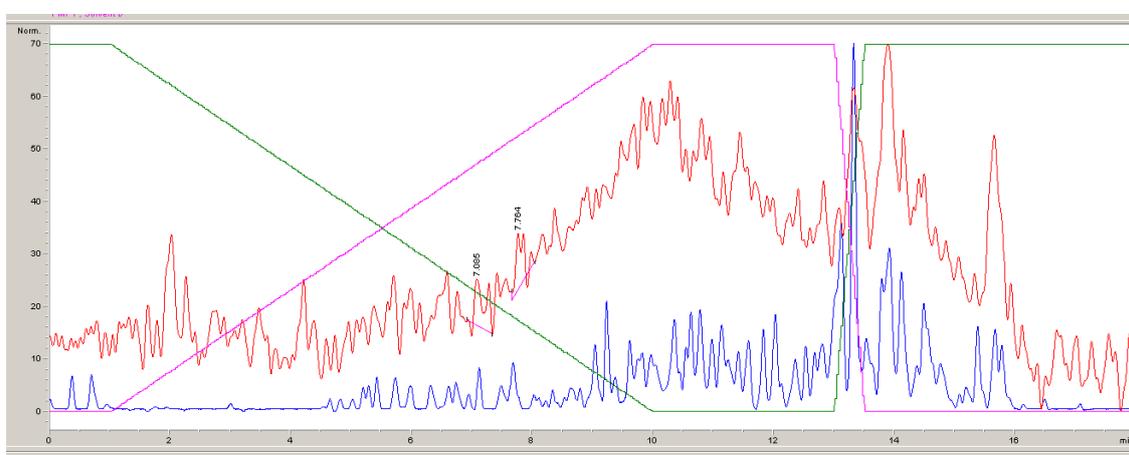
En las figuras 24, 25 y 26 se puede observar tres tipos de cromatogramas correspondientes a una muestra que presenta valores dentro de los rangos permitidos, la siguiente corresponde a la muestra de maní que presentó valores muy alejados de las normas vigentes, y por último podemos observar un cromatograma correspondiente a una muestra negativa.



**Figura 24. CROMATOGRAMA MUESTRA DE MANÍ # 11**



**Figura 25. CROMATOGRAMA MUESTRA DE MANI # 28**



**Figura 26. CROMATOGRAMA MUESTRA NEGATIVA**

Línea roja: AFG1 y AFB1

Línea azul: AFG2 y AFB2



**Tabla 15. NUEZ: NÚMERO DE MUESTRAS POSITIVAS, CONCENTRACIÓN PROMEDIO, DESVIACIÓN ESTANDAR Y RANGO**

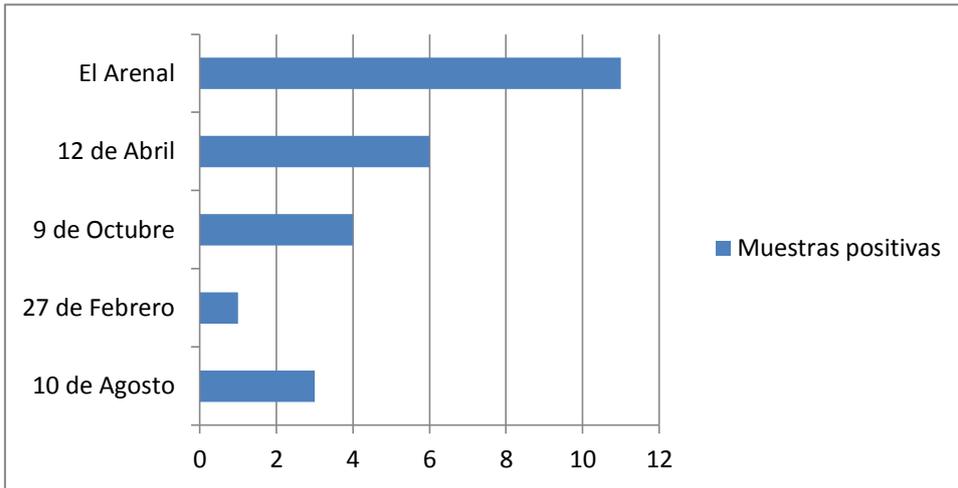
AFLATOXINA	Muestras contaminadas/total	Promedio $\mu\text{g}/\text{kg}$	Desviación estándar	Rango ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) Min – Max
AFG2	0/30	-	-	-
AFG1	3/30	0.97	0.77	0.42 – 1.85
AFB2	0/30	-	-	-
AFB1	5/30	0.416	0.545	0.14 – 1.39

**Tabla 16. MANÍ: NÚMERO DE MUESTRAS POSITIVAS, CONCENTRACIÓN PROMEDIO, DESVIACIÓN ESTANDAR Y RANGO**

AFLATOXINA	Muestras contaminadas/total	Promedio ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Desviación estándar	Rango ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) Min - Max
AFG2	1/30	-	-	0.82*
AFG1	10/30	63.12	194.56	0.63 – 616.87
AFB2	0/30	-	-	-
AFB1	6/30	2.75	5.98	0.21 – 14.96

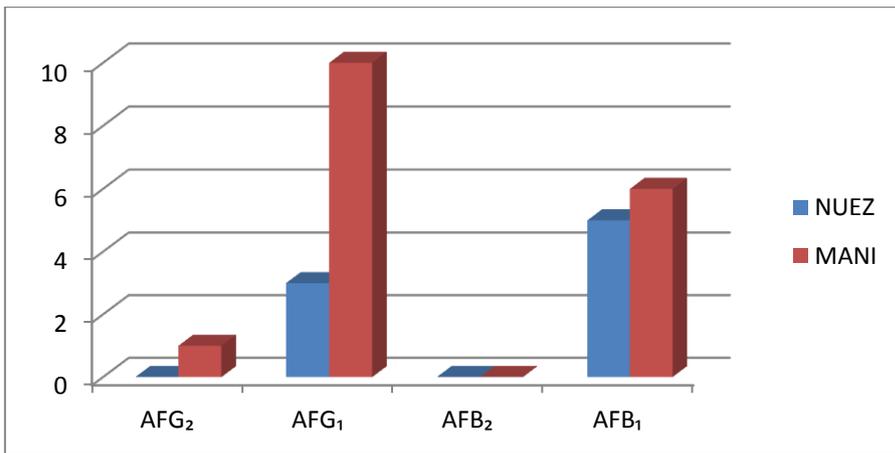
\* Dato único

El mercado El Arenal es el que mayor número de muestras positivas presentó, y el 27 de Febrero el menor número de muestras contaminadas.



**Figura 27. MUESTRAS CONTAMINADAS CON AFLATOXINAS, POR MERCADO**

El maní es el fruto seco que mayor número de muestras positivas presentó, comparado con la nuez.



**Figura 28. MUESTRAS CONTAMINADAS CON AFLATOXINAS POR ALIMENTO**

## 4.7 RESULTADOS DE LA VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA

### 4.7.1 Curvas de calibración.

Para el análisis cuantitativo es necesario elaborar una curva de calibración para cada una de las aflatoxinas que se van a analizar. (AFG<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub> y

AFB1), a partir de estándares de la toxina pura. Para lo cual se prepararon patrones de 0,5; 1,25; 2,5; 5; 12,5; 25 y 50 ng/ml. Se realizó la lectura a una longitud de emisión de 455 para AFG2 y AFB2, y de 432 para AFG1 y AF1<sub>1</sub>. Además se observó el tiempo de retención (RT) y el área respectiva de cada una de las aflatoxinas estudiadas.

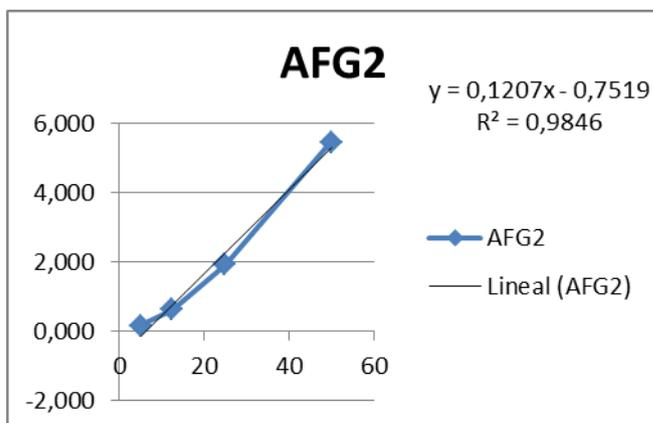


Figura 29. CURVA DE CALIBRACION PARA AFG2

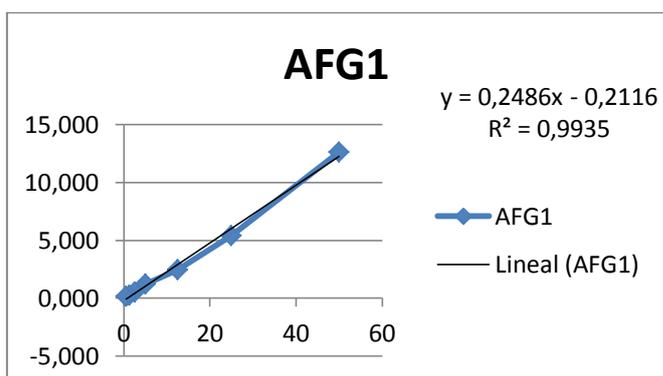
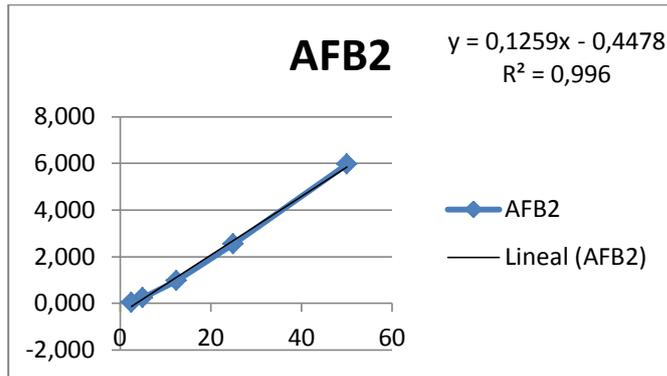
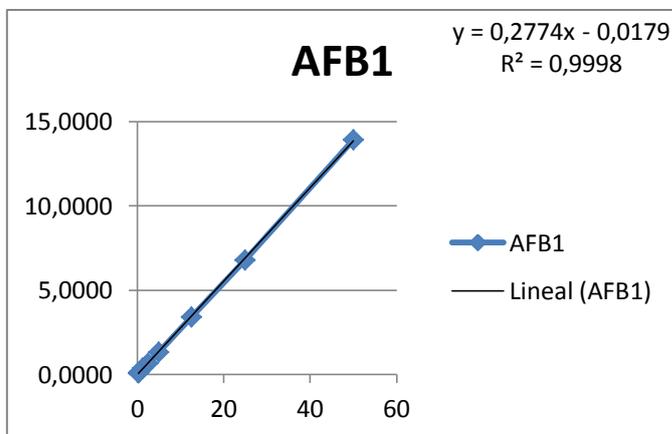


Figura 30. CURVA DE CALIBRACION PARA AFG1



**Figura 31. CURVA DE CALIBRACION PARA AFB2**



**Figura 32. CURVA DE CALIBRACION PARA AFB1**

**4.7.2 Límite de detección.-** De acuerdo a los cálculos realizados mediante curvas de calibración con patrones para cada una de las aflatoxinas a determinarse. Se debe expresar en ng/ml o en µg/ml.

**4.7.3 Recuperación.-** Se realizó a partir de la contaminación de las muestras con una concentración conocida de toxina, y luego se comparó el resultado obtenido con el porcentaje de recuperación que detecta el equipo con respecto a la concentración inyectada.



**4.7.4 Precisión.-** Para determinar este parámetro se analizaron seis muestras de maní y seis muestras de nuez enriquecidas con 15 ng/ml de aflatoxinas, cada una y analizadas por 3 días consecutivos. Los valores de precisión se establecieron en base a la desviación estándar relativa en condiciones de repetibilidad (RSDr %) obtenida al analizar una misma muestra varias veces, en un intervalo de tiempo corto, sin cambiar de equipo de medida, reactivos y analista.

La repetibilidad intra-day se determinó calculando la desviación estándar relativa de los resultados obtenidos al analizar tres muestras enriquecidas con 15 ng/ml de aflatoxinas, que fueron extraídas el mismo día, en el mismo laboratorio, equipo HPLC y analista. La repetibilidad inter-day se determinó calculando la desviación estándar relativa de los resultados obtenidos al analizar tres muestras enriquecidas con 15 ng/ml de aflatoxinas, que fueron extraídas y analizadas en tres días consecutivos. En regulaciones europeas para validación de métodos se acepta hasta el 20%.

**Tabla 17. VALIDACIÓN DEL MÉTODO: LÍMITE DE DETECCIÓN, LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN, PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN, REPETIBILIDAD INTRA-DAY E INTER-DAY**

	<b>AFG2</b>	<b>AFG1</b>	<b>AFB2</b>	<b>AFB1</b>
<b>LOD (ng/ml)</b>	0.35	0.24	0.44	0.14
<b>LQD (ng/ml)</b>	0.71	0.48	0.88	0.27
<b>RECUPERACION (%)</b>	65	62	69	74
<b>REPETIBILIDAD INTRADAY RSD (%)</b>	5,2	3,9	11,3	4,8
<b>REPETIBILIDAD INTERDAY RSD (%)</b>	11,9	7,5	6,6	5,9



#### 4.8 ANÁLISIS PROBABILÍSTICO

Para la evaluación del riesgo toxicológico de las aflatoxinas presentes en los frutos secos de maní y nuez, el estudio se basó en los datos de ingesta recolectados en la encuesta de recordatorio de 24 horas (2) y el cuestionario de frecuencia de consumo. Con este fin se realizó una estimación de la ingesta habitual de cada individuo (g/día), mediante el software MSM® (Multiple Source Method. Disponible a: <https://msm.dife.de/>), el mismo que tiene la gran ventaja de distinguir entre consumidores habituales de los no habituales.

Los datos de ingesta (del MSM) fueron expresados en kilogramos consumidos por peso corporal por día (Kg alimento/Kg peso corporal/día) en base a los datos recogidos de los pesos de los participantes. Para este fin se contó con una base de datos de 100 individuos, es decir el cálculo no se realizó con un peso promedio sino con cada uno de los pesos informados.

#### 4.9 EVALUACIÓN DE RIESGO

Los datos de ingesta y de contaminación por aflatoxinas fueron analizados en el software @Risk (@RISK 4.5.5 professional edition, Palisade, UK).

La evaluación de riesgo de exposición a aflatoxinas ( $\mu\text{g}/\text{kg}$  peso corporal/día) fue modelada en base a multiplicación de los datos de consumo (kg alimento/kg peso corporal/día) con los datos de contaminación ( $\mu\text{g}/\text{kg}$  alimento), mediante una simulación de Monte Carlo. La simulación fue aplicada con 5000 interacciones por lo cual es menor la incertidumbre y la variabilidad.

Para los datos de contaminación se eligió el escenario intermedio sugerido para la evaluación de riesgos de exposición de ingesta de sustancias químicas, es decir, asumir que los valores negativos obtenidos del análisis son iguales a  $0.5 \times \text{LOD}$ .

Se identificó el modelo de distribución que más se ajustó a los datos de ingesta y para los valores de contaminación de aflatoxinas (menor valor de  $\chi^2$ ). No se identificó el modelo de distribución para aquellos valores de contaminación cuando los valores positivos fueron  $<3$  (para el caso del AFG2 y AFB2) para lo cual se utilizó la media (promedio) de concentración.

### 4.9.1 Resultados

La función de la distribución ajustada de ingesta habitual (100 observaciones) proveniente del software MSM, tomando en cuenta los dos recordatorios de 24 horas y el cuestionario de frecuencia de consumo del maní previa a la evaluación de riesgo de exposición (en el software @t Risk), para el alimento NUEZ es la siguiente:

RiskInvgauss (0,0000502764; 0,0001011; RiskShift (-0,0000123154))

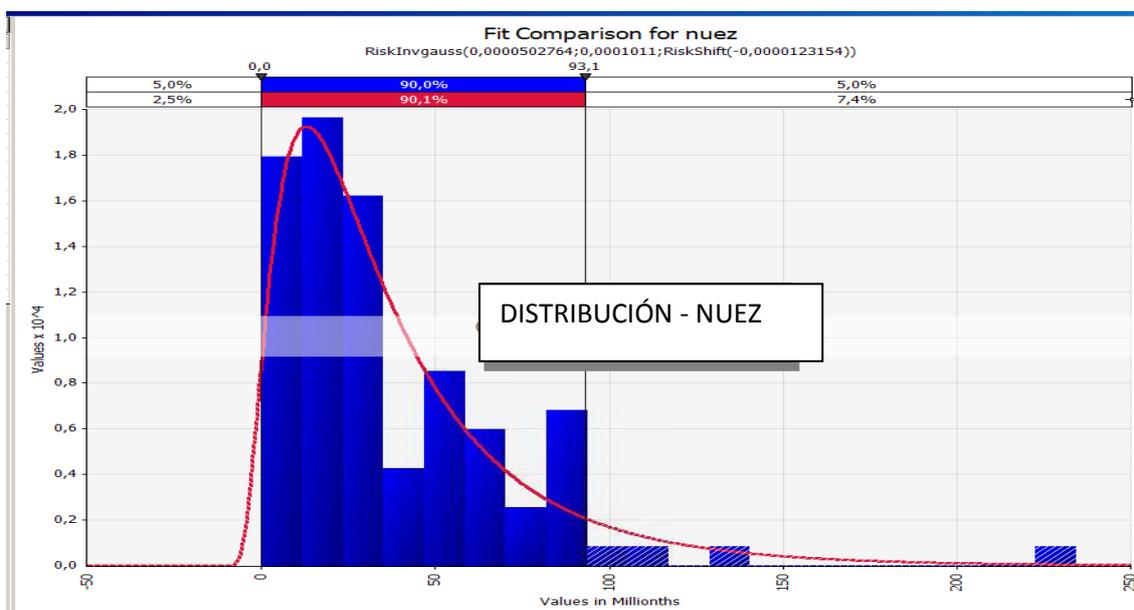
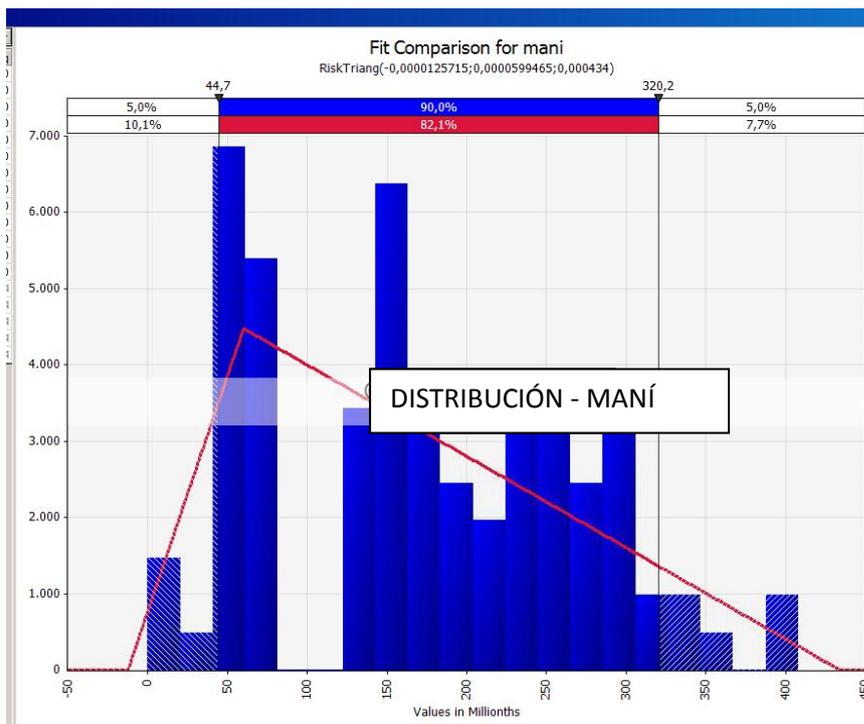


Figura 33. DISTRIBUCIÓN - NUEZ

La función de la distribución ajustada de ingesta habitual (100 observaciones) proveniente del software MSM, tomando en cuenta los dos recordatorios de 24 horas y el cuestionario de frecuencia de consumo del maní previa a la evaluación de riesgo de exposición (en el software @t Risk), para el alimento MANÍ es la siguiente:

RisktTriang(-0,0000125715;0,0000599465;0,000434)



**Figura 34. DISTRIBUCIÓN - MANÍ**



**Tabla 18. NUEZ: DISTRIBUCIÓN AJUSTADA, MEDIA, MÍNIMOS Y MÁXIMOS DE LAS CONCENTRACIONES DE AFLATOXINAS (ug/kg) POR GRUPO DE ALIMENTO Y DE LA INGESTA DE NUEZ (kg/kg pc/día)**

NUEZ	DISTRIBUCION	MINIMO	MEDIO	MAXIMO
<b>AFG2*</b>				
<b>AFG1</b>	RiskExtvalueMin(0,41698;0,59399)	-4,921	0,074	1,734
<b>AFB2*</b>				
<b>AFB1</b>	RiskExpon(0,057667;Riskshift(0,068078))	0,068	0,125	0,710
<b>INGESTA</b>		-7,01E-06	3,8E-05	3,48E-04

**Tabla 19. MANÍ: DISTRIBUCIÓN AJUSTADA, MEDIA, MÍNIMOS Y MÁXIMOS DE LAS CONCENTRACIONES DE AFLATOXINAS (ug/kg) POR GRUPO DE ALIMENTO Y DE LA INGESTA DE MANÍ (kg/kg pc/día)**

MANÍ	DISTRIBUCIÓN	MÍNIMO	MEDIO	MÁXIMO
<b>AFG2*</b>				
<b>AFG1</b>	RiskLoglogistic(-11,163;11822,6,8789)	-7,95	1,080	40,15
<b>AFB2*</b>				
<b>AFB1</b>	RiskExpon(0,53667;RiskShift(0,052111))	0,068	0,125	0,574
<b>INGESTA</b>		-1,10E-05	1,6 E-04	4,28E-04

\*Se utilizó el valor promedio en lugar de la distribución, pues el número de muestras positivas fue < 3

**Tabla 20. RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN DE RIESGO DE EXPOSICIÓN A AFLATOXINAS POR LA INGESTA DE NUEZ Y MANÍ (ug/kg pc/día)**

	MANÍ				NUEZ			
	AFG <sub>2</sub>	AFG <sub>1</sub>	AFB <sub>2</sub>	AFB <sub>1</sub>	AFG <sub>2</sub>	AFG <sub>1</sub>	AFB <sub>2</sub>	AFB <sub>1</sub>
<b>Media</b>	3,2 E-05	1,74 E-04	3,53 E-05	2,016 E-05	6,83 E-06	3,02 E-06	8,35 E-06	4,76 E-06
<b>DS</b>	1,95 E-05	6,61 E-04	2,15 E-05	1,63 E-05	6,37 E-06	3,92 E-05	7,79 E-06	5,24 E-06
<b>Min</b>	-2,2 E-06	-2,3 E-03	-2,43 E-06	-2,54 E-06	-1,26 E-06	-4,53 E-04	-1,54 E-06	-1,28 E-06
<b>Max</b>	8,55 E-05	9,65 E-03	9,42 E-05	1,306 E-04	6,26 E-05	3,22 E-04	7,66 E-05	6,30 E-05
<b>P5</b>	5,52 E-06	-6,16 E-04	6,08 E-06	2,88 E-06	4,08 E-07	-5,60 E-05	4,99 E-07	2,39 E-07
<b>P50</b>	2,89 E-05	6,42 E-05	3,18 E-05	1,61 E-05	5,06 E-06	2,80 E-06	6,19 E-06	3,19 E-06
<b>P95</b>	6,84 E-05	0,00132	7,53 E-05	5,15 E-05	1,92 E-05	5,80 E-05	2,35 E-05	1,46 E-05

### COCIENTE DE PELIGROSIDAD

Si la Dosis de Exposición (DE) es mayor que la Ingesta Diaria Tolerable (TDI) puede existir un probable daño para la salud, caso contrario los efectos son .improbables. En el presente estudio todas las dosis son menores al TDI.

Cociente de peligro (HQ) = Dosis de exposición / TDI

TDI = 0.11 – 0.19 ng/Kg pc/día

Como la DE está expresada en µg/Kg pc/día, entonces el TDI también debe expresarse en las mismas unidades (0.00011 – 0.00019 µg/Kg pc/día), y se ha tomado el promedio.

**Tabla 21. COCIENTE DE PELIGRO PARA LAS DIFERENTES AFLATOXINAS**

	COCIENTE DE PELIGRO	
	NUEZ	MANÍ
AFG2	0.045	0.21
AFG1	0.020	1.16
AFB2	0.056	0.23
AFB1	0.032	0.13

Como se puede observar en la nuez, para todos los tipos de aflatoxinas el coeficiente de peligro da un valor menor a 1, lo que significa que no hay amenaza para la salud.



En el caso del maní, la aflatoxina AFG1 es la única que da un valor de HQ mayor a 1, lo cual significa que hay probabilidad de efecto adverso para la salud de los consumidores. En todo caso esto no se presenta para la AFB1 que es la toxina cancerígena.

También se puede calcular el margen de seguridad entre el NOAEL y la DE para cada una de las aflatoxinas, para lo cual se debe conocer el valor de NOAEL establecido por las normas para las aflatoxinas, que es igual 0.75 µg/kg pc/día.

Margen de seguridad = NOAEL / DE

Si se realiza este cálculo, con el valor del percentil 95, para cada una de las aflatoxinas investigadas, resulta un valor muy superior a 1, lo cual significa que hay un margen de seguridad suficiente .



## CAPÍTULO V

### DISCUSIÓN

El problema de las micotoxinas es una preocupación mundial, causando importantes pérdidas humanas y económicas. Aproximadamente el 5-10% de la producción total mundial de alimentos parece estar irremediablemente perdida por estas causas. Por ejemplo, en los EE.UU., se estima que la presencia de micotoxinas en cultivos tales como maíz, trigo y cacahuete, pueden causar pérdidas directas de alrededor de 932 millones de dólares anuales e indirectas (costo de la regulación y su aplicación, análisis y aplicación de otras medidas de control) de más de 466 millones (CAST, 2003). En países subdesarrollados, extremadamente dependientes de cultivos locales (como en el caso del maíz en África) las micotoxinas provocan, además de perjuicios económicos, una elevada morbilidad y muerte prematura entre la población humana (FAO/IAEA, 2001). Actualmente, entre los países desarrollados los efectos tóxicos más relevantes tienen que ver con la carcinogenicidad de algunas micotoxinas y con su capacidad para debilitar el sistema inmune de los individuos, reduciendo así su resistencia a enfermedades infecciosas (FAO/IAEA, 2001). (Abrunhosa L., 2012)

En el Ecuador la población rural se dedica sobre todo a la agricultura, siendo el cultivo de maní una de las actividades agrícolas familiares a la que se dedican buena parte de las poblaciones rurales de algunas provincias del Ecuador. Según datos publicados por el INIAP hasta el año 2004, el rendimiento medio anual no superaba los 1000 kg/Ha. En la actualidad se reporta una siembra anual establecida entre 12000 y 15000 Ha de maní, principalmente en las provincias de Loja, Manabí y El Oro. Entre las principales razones de un bajo rendimiento, están: utilización de semillas sin certificación, falta de riego e incidencia de plagas. ( Fierro Aguilar, 2012)

En cuanto al cultivo de nuez de árbol en el Ecuador, se podría decir que es muy poca la producción, sobre todo se cultiva en la provincia de Tungurahua,



en los sectores de Huachi, Samanga, Constantino Fernández, Atahualpa, entre otros.

En la presente investigación, de las muestras de nuez analizadas el 26.6% resultaron positivas para aflatoxinas, y de las muestras de maní, el 56,6% resultaron contaminadas con aflatoxinas. Lo preocupante es que de acuerdo a los datos obtenidos en las encuestas aplicadas a la población, el maní es el producto de mayor preferencia y consumo en todas las edades.

Sin embargo, se debe acotar que para el consumo de maní, éste recibe un tratamiento previo ya sea de cocción, tostado o de fritura, no así la nuez que es consumida en forma directa en la mayoría de ocasiones.

Las aflatoxinas de mayor incidencia en las muestras estudiadas son la AFG1 y la AFB1, lo que coincide con la mayoría de estudios que se han reportado a nivel internacional. La incidencia de AFB1 en el total de muestras (60), fue del 18,3%, inferior a lo reportado por Fierro Karla (2012), quien realizó un estudio en muestras de maní que se vende a granel en la ciudad de Sangolquí, provincia de Pichincha, y reporta que el 60% de las muestras presentaron una contaminación con AFB1 con valores superiores a lo determinado por las normas.

La AFB1, según el reporte de varios estudios, se ha encontrado sobre todo en maíz y en maní. (Logrieco & Visconti, 2004).

De las diecisiete muestras de maní que resultaron contaminadas con aflatoxinas, dos muestras sobrepasan los límites establecidos por las normas, pero sobre todo una de ellas llama mucho la atención ya que presentan un valor extremadamente alto, tanto para la AFG1 (616, 87  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) como para la AFB1 (14,96  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ); siendo lo más preocupante que la muestra aparentemente no presentaba ningún indicio de deterioro o alteración que se pueda advertir a simple vista.



Con lo mencionado anteriormente, se puede notar que hay una distribución bastante heterogénea de las aflatoxinas en los lotes de producción, lo que hace muy difícil la selección del alimento.

Por razones de salud, las aflatoxinas deberían mantenerse excluidas de los alimentos de consumo humano en cuanto sea posible, sin embargo por ser contaminantes naturales, debe tolerarse la presencia de ciertos niveles mínimos en alimentos y materias primas.

Es urgente que el país cuente con normas regulatorias que orienten al buen manejo de este tipo de productos, en lo que respecta a límites permisibles, normas de higiene y conservación a lo largo de toda la cadena alimentaria. Si no existe esta información resulta imposible evaluar el potencial peligro toxicológico de un alimento.



## CAPÍTULO VI

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 6.1 CONCLUSIONES

- En primer lugar se puede concluir que se cumple con la hipótesis planteada, ya que el contenido de aflatoxinas presentes en maní y nueces que se expenden en los principales mercados de la ciudad de Cuenca, está dentro de los parámetros permitidos por las Normas internacionales, por lo que su consumo no constituye un riesgo toxicológico para la población.
- Mediante el uso de diferentes herramientas de medición: encuestas, técnicas analíticas y estadísticas, se cumple a cabalidad con los objetivos propuestos para el desarrollo de la presente investigación. Por lo cual se puede concluir lo siguiente:
- La presencia y cuantificación de aflatoxinas en nuez y maní que se expenden a granel en los mercados de la ciudad de Cuenca, fue demostrada analíticamente mediante columnas de inmunoafinidad y HPLC con detector de fluorescencia.
- La metodología analítica fue optimizada y validada, lo que garantiza la extracción, identificación y cuantificación de aflatoxinas en los productos investigados.
- Luego del análisis realizado en treinta muestras de nuez y en treinta muestras de maní, resultaron positivas para aflatoxinas, 8 muestras de nuez que equivale al 26,6%, y 17 muestras de maní que equivale al 56,6%.
- Ninguna de las muestras analizadas presentó la AFB2.
- En cuanto a las muestras de nuez, si bien resultaron positivas para AFG1 y AFB1, todas se encuentran dentro del valor permitido por las normas internacionales.
- Para la nuez, los rangos encontrados fueron:  
AFG1: 0.42 – 1.85  $\mu\text{g}/\text{kg}$  con un promedio de 0.97  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ;



AFB1: 0.14 – 1.39  $\mu\text{g}/\text{kg}$  con un promedio de 0.416  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .

- En el maní, se encontró un mayor número de muestras contaminadas, siendo los resultados los siguientes.

AFG2: 0.82  $\mu\text{g}/\text{kg}$

AFG1: 0.63 – 616.87  $\mu\text{g}/\text{kg}$  con un promedio de 63.12  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ;

AFB1: 0.21 – 14.96  $\mu\text{g}/\text{kg}$  con un promedio de 2.75  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .

- Una sola muestra de maní presentó un valor de 616.87  $\mu\text{g}/\text{kg}$  para AFG1 y de 14.96  $\mu\text{g}/\text{kg}$  para AFB1, valores totalmente fuera de norma.
- De acuerdo al estudio, no hay diferencias significativas entre el número de muestras contaminadas y el mercado del cual proceden.
- La aplicación de las encuestas a un segmento de la población, demostró que la población prefiere consumir el maní en diferentes formas y preparaciones; esta preferencia se vislumbró claramente en los dos géneros (masculino y femenino), como también en todos los grupos de edad (15 – 55 años).
- Esta preferencia puede ser debida a la versatilidad del maní para prepararse en distintas maneras como se pudo observar en las encuestas, o también puede ser debido al bajo costo de éste comparado con la nuez, ya que en el país hay varios lugares que se dedican al cultivo de este fruto, especialmente en Loja, Manabí, El Oro y Guayas; no sucede así con la nuez, ya que hay muy pocos lugares que se dedican a este cultivo.
- Con la aplicación de la encuesta de recordatorio de 24 horas (24HR), se confirmó que este tipo de encuesta brinda una información cuantitativa, ya que no hubo mayor diferencia entre los datos obtenidos entre las dos encuestas aplicadas en diferentes días.
- La encuesta de frecuencia de consumo (FQQ) brinda una información cualitativa, y en este caso se determinó que hubo una subestimación de la ingesta verdadera, al compararla con la encuesta de 24HR.
- Con respecto al último objetivo, referente a la evaluación de riesgo toxicológico, se puede concluir que no existe un riesgo de exposición en la población por el consumo de nuez y maní, a pesar de que algunas



muestras resultaron positivas, ya que la dosis de exposición resultó inferior a la tasa diaria de ingesta (TDI) emitido por las normas internacionales.

- El coeficiente de peligro calculado para todas las aflatoxinas, resultó ser menor a 1, lo que significa que no hay amenaza para la salud; a excepción de la AFG1 en maní que dio un valor ligeramente superior a la unidad (1.16).

## 6.2 RECOMENDACIONES

- El hecho de que la contaminación con aflatoxinas puede darse en el período de precosecha, cosecha y postcosecha, obliga a tomar medidas de control muy exhaustivas que garanticen la aptitud para el consumo de los alimentos susceptibles de ser atacados por esta micotoxina; ya que no se puede descartar la posibilidad de que en algún momento se corra el riesgo de que se presenten lotes con un alto nivel de contaminación por cuanto las condiciones agrícolas, de cosecha, de conservación y procesamiento están en continuo cambio.
- Se recomienda ampliar el estudio con un número mayor de muestras que permitan establecer comparaciones entre muestras que hayan recibido diferentes tratamientos como: tostado, pelado, cocción, etc. para poder sugerir el tratamiento más idóneo para reducir el nivel de contaminación.
- Se puede realizar varios estudios en otro tipo de alimentos que son sensibles a la contaminación con micotoxinas, con el fin de crear una base de datos que conduzca a la creación de normas nacionales que garanticen el consumo seguro a la población.
- Se debe crear conciencia en la población, mediante la difusión de prácticas higiénicas que disminuyan el índice de contaminación en los alimentos, mediante la detección de puntos críticos.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

- Debería realizarse un frecuente monitoreo en este tipo de productos, debido a las malas prácticas en las diferentes etapas ya mencionadas.
- El estudio de aflatoxinas mediante el uso de HPLC, si bien es el más seguro por su sensibilidad y confiabilidad, también es bastante oneroso, por lo que se recomienda que estudios posteriores sean asumidos por instituciones de salud, educativas o dedicadas a la investigación, que tengan una debida solvencia y puedan trabajar con un mayor número de muestras, con diferentes alimentos, en diferentes condiciones, etc.



## BIBLIOGRAFÍA

- Abrunhosa L., Morales, H., Soares C. (2012). *Micotoxinas detectadas en productos alimenticios en Portugal: Revisión*. *Revista Bio-ciencias*, 27 p. Disponible en: <http://biociencias.uan.edu.mx/publicaciones/03-01/biociencias3-1-1.pdf>
- Almudena, A. (2001). *Hongos y micotoxinas*. Madrid. Fundacion Ibérica para la seguridad alimentaria.
- Armijo, J., & Calderón, J. (2009). *Esquema de acciones para evitar, controlar y desinfectar productos de hongos y aflatoxinas*. p 15 -24. *Revista Ingeniería química*. Disponible en: [http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtual/publicaciones/ing\\_quimica/v12\\_n2/pdf/a03v12.pdf](http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtual/publicaciones/ing_quimica/v12_n2/pdf/a03v12.pdf)
- Arriola, L. (2012). *Validación de métodos analíticos, físicoquímicos y microbiológicos*. Guatemala. Disponible en: [http://www.usac.edu.gt/archivos/econtCurso\\_Validacion\\_de\\_Metodos\\_Analiticos\\_con\\_formulas.pdf](http://www.usac.edu.gt/archivos/econtCurso_Validacion_de_Metodos_Analiticos_con_formulas.pdf)
- Ayala Tejada, Lisbeth, (2009). *Estudio de prefactibilidad para la producción y comercialización de maní en el cantón Jipijapa, provincia de Manabí*. Quito. Tesis. Universidad San Francisco de Quito. Disponible en: <http://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/847/1/91546.pdf>
- Benítez Burraco, A. (2005). *Avances recientes en Biotecnología Vegetal e Ingeniería Genética de plantas*. España: Reverté S.A.
- Bolet Astoviza, M., & Socarráz Suárez, M. M. (2005). *Micotoxinas y cáncer*. *Revista cubana Invest Biomed*, 8 p. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0864-03002005000100007](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03002005000100007)
- Caballero Torres, A., & Otero Fernández-Trebejo, E. (2008). *Temas de Higiene de los alimentos*. La Habana, Cuba: Ciencias Médicas.
- Camean, A., & Repetto, M. (2008). *Toxicología alimentaria*. España: Díaz de Santos.
- Cornejo, J., & Villarroel, O. (2006). *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. Disponible en:  
<http://web.minsal.cl/portal/url/item/72fd6274dad8792ee04001011f0109e4.pdf>
- Delgadillo Ubaldo, E. (2008). *Metodología para el análisis de riesgos ambientales. Impacto social en la población del municipio de Ecatepec, Estado de México*. México: CIECAS. Instituto Politécnico Nacional.
- FAO. (2004). *Reglamentos a nivel mundial para las micotoxinas en los alimentos y en las raciones en el año 2003*. Recuperado el 06 de Noviembre de 2013. Disponible en:  
[http://www.fao.org/es/ESN/index\\_en.stm](http://www.fao.org/es/ESN/index_en.stm)
- FAO, WHO, IPCS. (2009). *Principles and methods for the risk assessment of chemicals in food*. Ottawa, Canadá: WHO Library Cataloguing.
- FAO. (2006). *Food safety risk analysis. A guide for national food safety authorities*. Recuperado el 15 de noviembre de 2013, de FAO. FOOD AND NUTRITION. PAPER 87: Web site:  
[www.fao.org/ag/agn/index\\_en.stm](http://www.fao.org/ag/agn/index_en.stm)
- Fierro Aguilar, K. (2012). *Evaluación de los niveles de Aflatoxinas en maní a granel comercializado en la ciudad de Sangolquí mediante el método de cromatografía líquida de alta resolución con detector de fluorescencia y caracterización morfológica del hongo productor de aflatoxinas*. Quito, Pichincha, Ecuador: Sangolquí. Tesis ESPE, 2012.
- Gimeno, A., & Martins, M. L. (2011). *Micotoxinas y micotoxicosis en animales y humanos*. Tercera edición. USA. Special nutrients. INC.
- Gimeno, Alberto; Martins, María Ligia. (2005). *Riesgo de micotoxicosis que algunas micotoxinas (como contaminantes de los alimentos) pueden provocar en humanos*. Buenos Aires, Argentina. Disponible en:  
<http://www.engormix.com/MA-micotoxinas/articulos/riesgos-micotoxicosis-algunas-micotoxinas-t366/p0.htm>
- González Mora, S. M. (2010). *Determinación de aflatoxinas en frutos de nuez mediante cromatografía líquida*. Valdivia, Chile. Tesis de pregrado. Disponible en:  
<http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2010/fag643d/doc/fag643d.pdf>
- Guzmán de Peña, D. (2007). *La exposición a la aflatoxina B1 en animales de laboratorio y su significado en la salud pública*. Scielo. Disponible en:  
<http://www.scielosp.org/pdf/spm/v49n3/08.pdf>



- Hernández Sampieri, R., Fernández Collado, C., & Baptista Lucio, P. (2003). *Metodología de la Investigación. Tercera Edición*. México: McGraw-Hill Interamericana.
- Herrera Querol, L. (2012). *Tesis: Puesta a punto y validación de un método de análisis de aflatoxinas en frutos secos y cereales*. Zaragoza. España: Universidad de Zaragoza. Departamento de producción animal y ciencia de los alimentos.
- IARC. (2002). Monograph on the evaluation of carcinogenic risk to human. *Lyon: International Agency for Research on Cancer*, 82-171.
- Juan, A., & Faulín, J. (2005). *Simulación de Monte Carlo con Excel*. Recuperado el 23 de noviembre de 2013, de [http://www.cyta.com.ar/biblioteca/bddoc/bdlibros/monte\\_carlo/monte\\_carlo.htm](http://www.cyta.com.ar/biblioteca/bddoc/bdlibros/monte_carlo/monte_carlo.htm)
- Juárez Palafox, S. (2002). *Extractos de Larrea tridentata con actividad antifúngica e inhibición de la síntesis de aflatoxinas de especies del género Aspergillus*. México. Disponible en: [http://cdigital.dgb.uanl.mx/te/1080124368/1080124368\\_01.pdf](http://cdigital.dgb.uanl.mx/te/1080124368/1080124368_01.pdf)
- Kleter, G., Prandini, A., Filippi, L., & Marvin, H. (2009). *Identification of potentially emerging food safety issues by analysis for reports published by the european communitys rapid alert system for food and feed (RASFF) during a four year period*.
- Logrieco, A., & Visconti, A. (2004). *Una visión general sobre los hongos y micotoxinas en Europa*. Norwell, USA. Kluwer Academic Publishers.
- Magan, N.; Olsen, M. (2004). *Mycotoxins in food*. USA. CRC Press LLC.
- Méndez Albores, A., & Moreno Martínez, E. (2007). Aflatoxinas en las tortillas de maíz. *Ciencia y Desarrollo*. Disponible en: <http://www.cyd.conacyt.gob.mx/210/Articulos/Aflatoxinas/Aflatoxinas00.htm>
- Morris Navarro, L. (2011). *Deteminación de aflatoxinas en muestras de maíz y arroz para consumo humano en cinco departamentos de la costa Caribe colombiana ediante cromatografía de alta eficiencia durante seis meses en 2011*. Bogotá, Colombia.
- Muscarella, M., Lo Magro, S., Palermo, C., & Centonze, D. (2007). *Validation according to European Commission Decision 2002/657/EC of confirmatory method for aflatoxin M1 in milk based in inmunoaffinity*



- columns and high performance liquid chromatography with fluorescence detection. Analytica Chimica Acta 594, 257-264.*
- Nucis, F. (2005). *Frutos secos salud y culturas mediterráneas*. Barcelona, España. Editorial Glosa.
- Peraica, M., Radic, B., Lucic, A., & Parlovic, M. (2000). *Efectos de las micotoxinas en los seres humanos*. Boletín de la Organización Mundial de la Salud.
- Rajeev, B., Ravishankar, V. R., & A.A., K. (2010). Mycotoxins in Food an Feed: Present Status and Future Concerns. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. Vol 9, 57-81.*
- R-BIOPHARM RHONE LTD. (July 2005). *Application note for analysis of aflatoxin M1 in milk using EASI-EXTRACT Aflatoxin.*
- Rendón Rocha, N. A. (2007). *Determinación de la presencia del gen codificador de la aflatoxina producida por aspergillus flavus en la castaña, mediante la técnica Reacción en cadena de polimerasa (PCR)*. La Paz , Bolivia. Tesis Universidad mayor de San Andrés. Disponible en: <http://bibliotecadigital.umsa.bo:8080/rddu/bitstream/123456789/236/1/T630.pdf>
- Requena, F., Saume, E., & León, A. (2005). *Micotoxinas: riesgos y prevención*. Venezuela. Disponible en: [http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S0798-72692005000400005&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S0798-72692005000400005&script=sci_arttext)
- Rodríguez , E., & Vizcarra , M. (2012). *Estudio de la presencia de aflatoxina B1 en bocaditos a base de maíz comercializados en las escuelas fiscomisionales de las zonas del guasmo de la ciudad de Guayaquil*. Guayaquil, Ecuador. Tesis ESPOL. Disponible en: <http://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/24547/1/Estudio%20de%20la%20presencia%20de%20aflatoxina%20B1%20en%20bocaditos%20a%20base%20de%20maiz.pdf>
- Rodríguez, M., Sala, A., & Salazar, P. (2008). *Aflatoxinas*. Colombia. Universidad de los Andes.
- Rojas Contreras, O., & Wilches Florez, A. M. (2009). *Determinación de aflatoxinas en alimentos de mayor consumo infantil comercializados en la ciudad de Pamplona, norte de Santander*. Pamplona, Colombia: Universidad de Pamplona.



- Smith, J., & Moss, M. (1985). *Mycotoxins, formation, analysis and significance*. New York: John Wiley and Sons.
- Soriano del Castillo, J. M. (2007). *Micotoxinas en Alimentos*. Madrid. España: Ediciones Díaz de Santos.
- Tapia, M. O. (2011). *Micotoxinas y micotoxicosis*. Buenos Aires, Argentina.
- Urrego Novoa, J., & Díaz, G. (2006). *Aflatoxinas: Mecanismos de toxicidad en la etiología de cáncer hepático celular*. Scielo, Colombia. Disponible en: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0120-00112006000200006I](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-00112006000200006I)
- Vallejo López, M. (9 de enero de 2012). Determinación de aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 presentes en harina de maíz del sector Tumbaco mediante el uso de columnas de inmovilización (IAC) y Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). Sangolquí, Pichincha, Ecuador: Escuela Politécnica del Ejército.
- Vásquez, C., Cos, A., López, C., & Alcaraz, F. (2005). *Alimentación y Nutrición*. España. Diaz de Santos.



# ANEXOS

## ANEXO 1

### ENCUESTA DE CONSUMO DE MANÍ Y NUECES EN LA POBLACIÓN DE 15 – 19 AÑOS EN LA CIUDAD DE CUENCA

2013

NUMERO DE REGISTRO (ID): \_\_\_

NÚMERO DE ENCUESTA: 1º  2º

FECHA DE ENTREVISTA: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_ (dd/mm/aa)

Estimado lector:

La presente encuesta tiene por objeto realizar un estudio del consumo de frutos secos (maní y nuez) en nuestra ciudad. Por lo cual solicitamos su colaboración contestando las siguientes preguntas con la mayor seriedad posible.

1. NOMBRE DEL ENCUESTADO (A):.....

2. FECHA DE NACIMIENTO: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_ (dd/mm/aa)

3. SEXO: M  F

4. TALLA: \_\_\_ (metros)

5. PESO: \_\_\_ (especificar Kg o libras)

6. Señale, el día ayer fue:

1. Lunes 2. Martes. 3. Miércoles 4. Jueves 5. Viernes 6. Sábado 7. Domingo

7. Señale, el tipo de alimentación de ayer fue:

1. Como cualquier día  2. Día festivo  3. Enfermedad



### 8.- RECORDATORIO DE 24 HORAS

ALIMENTO	DESCRIPCION DEL PRODUCTO FINAL CONSUMIDO	MARCA (SI APLICA)	NÚMERO DE PORCIONES (CANTIDAD)	MEDIDA/TAMAÑO DE LA PORCIÓN	NOTAS
MANI					
NUEZ					

### CUESTIONARIO DE FRECUENCIA DE CONSUMO

ALIMENTO	MEDIDA/TAMAÑO DE LA PORCIÓN	DIARIO	SEMANAL	MENSUAL	ANUAL	NUNCA
MANI						
NUEZ						



## ANEXO 2

### UNIVERSIDAD DE CUENCA

#### LAB. DE ALIMENTACIÓN Y NUTRICIÓN - PLAN DE MUESTREO DE ALIMENTOS

#### PUNTOS DE MAYOR CONSUMO

1. La mayoría de sus alimentos provienen de:
  1. Mercado
  2. Supermercado
2. Al comprar sus alimentos en un mercado, a qué mercado asiste y en qué día?

1	Feria Libre	
2	Coopera	
3	12 de abril	
4	27 de febrero	
5	10 de agosto	
6	9 de octubre	
7	3 de noviembre	
8	Miraflores	
9	Totoracocha	
10	Ricaurte	
11	Otro: _____	

1	Lunes	
2	Martes	
3	Miércoles	
4	Jueves	
5	Viernes	
6	Sábado	
7	Domingo	

3. Al comprar sus alimentos en un supermercado, usted asiste a:

1	Supermaxi - Miraflores	
2	Supermaxi - Vergel	
3	Supermaxi - Américas	
4	Coralcentro - Monay	
5	Coralcentro - Mall del río	
6	Coralcentro - Américas	
7	Gran Aki	
8	Santa Cecilia	
9	Popular	
10	Superstock	
11	Universidad	
12	Megatienda del Sur	
13	Otro: _____	

#### RESULTADOS DE ENCUESTAS DE PUNTOS DE MAYOR CONSUMO



**NUMERO DE ENCUESTAS: 47**

NOTA: Más de una respuesta fue admitida.

**1** La mayoría de sus alimentos provienen de:

MERCADO	37
SUPERMERCADO	22

**2** Al comprar sus alimentos en un mercado, a qué mercado asiste y en qué día

	TOTAL	% asistencia	% acumulado	
1	FERIA LIBRE	39	46%	46%
2	12 DE ABRIL	14	17%	63%
3	COOPERA	8	10%	73%
4	9 DE OCTUBRE	8	10%	82%
5	10 DE AGOSTO	6	7%	89%
6	27 DE FEBRERO	5	6%	95%
7	3 DE NOVIEMBRE	1	1%	96%
8	MIRAFLORES	1	1%	98%
9	TOTORACOCHA	1	1%	99%
10	RICAUARTE	1	1%	100%
	<b>84</b>			

**3** Al comprar sus alimentos en un supermercado, usted asiste a:

1	SUPERMAXI-VERGEL	11	22%	22%
2	SANTA CECILIA	8	16%	38%
3	GRAN AKI	6	12%	50%
4	SUPERMAXI-MIRAFLORES	5	10%	60%
5	SUPERMAXI-AMERICAS	4	8%	68%
6	CORALCENTRO-MALL DEL RIO	4	8%	76%
7	CORALCENTRO-AMÉRICAS	3	6%	82%
8	CORALCENTRO-MONAY	2	4%	86%
9	MEGATIENDA DEL SUR.	2	4%	90%
10	POPULAR	1	2%	92%
11	UNIVERSIDAD	1	2%	94%
12	COMERCIAL VEGA	1	2%	96%
13	TIA	1	2%	98%
14	TIENDA (X)	1	2%	100%

50



### ANEXO 3

#### AFLATOXINAS: MANI AREA Y TIEMPO DE RETENCIÓN

Nº muestra	Em= 455 RT= 3,1		Em= 432 RT= 3,7		Em= 455 RT= 4,6		Em= 432 RT= 5,7		
	G <sub>2</sub>		G <sub>1</sub>		B <sub>2</sub>		B <sub>1</sub>		
	Area	TR	Area	TR	Area	TR	Area	TR	
M-01							0,0259	5,704	310531
M-02			0,1209	3,770			0,0331	5,689	
M-03									
M-04									
M-05									
M-06									
M-07									
M-08									
M-09									
M-10			0.05	3,727					
M-11	0,059	3,148	0,31	3,798			0,0683	5,731	210613
M-12									
M-13									
M-14									
M-15									
M-16			0,22	3,790			0,072	5,683	
M-17									30713
M-18			0,1129	3,769					
M-19									
M-20									
M-21									
M-22									
M-23			0,032	3,791					
M-24			0,087	3,756					
M-25									
M-26									
M-27							0,048	5,687	
M-28			61,7	3,768			2,7	5,66	
M-29			0,043	3,773					
M-30			0,0654	3,725					



**ANEXO 4**

**AFLATOXINAS: NUEZ  
ÁREA Y TIEMPO DE  
RETENCIÓN**

Nº muestra	Em= 455 RT= 3,1		Em= 432 RT= 3,7		Em= 455 RT= 4,6		Em= 432 RT= 5,7	
	G <sub>2</sub>		G <sub>1</sub>		B <sub>2</sub>		B <sub>1</sub>	
	Area	TR	Area	TR	Area	TR	Area	TR
N-01								
N-02								
N-03								
N-04								
N-05								
N-06								
N-07							0,015	5,654
N-08			0,2977	3,765				
N-09			0,0735	3,778			0,0306	5,685
N-10								
310531								
N-11								
N-12								
N-13								
N-14								
N-15								
N-16							0,0324	5,523
N-17								
N-18							0.25	5,711
N-19								
N-20			0,041	3,589			0,043	5,709
N-21								
N-22								
N-23								
N-24								
210631								
N-25								
N-26								
N-27								
N-28								
N-29								
N-30								
30713								



## ANEXO 5

### AFLATOXINAS MANI CONCENTRACIÓN (µg/Kg)

Muestra	AFG2	AFG1	AFB2	AFB1	Mercado
M-01				0,2100	1
M-02		1,1		0,2500	1
M-03					1
M-04					1
M-05					2
M-06					2
M-07					2
M-08					3
M-09					3
M-10		0,63			3
M-11	0,82	3,17		0,3800	4
M-12					4
M-13					4
M-14					4
M-15					4
M-16		2,03		0,41	4
M-17					5
M-18		1,93			5
M-19					5
M-20					5
M-21					5
M-22					5
M-23		1,12			5
M-24		1,67			5
M-25					5
M-26					5
M-27				0,31	5
M-28		616,87		14,96	5
M-29		1,23			5
M-30		1,46			5

1 = 10 DE AGOSTO  
 2 = 27 DE FEBRERO  
 3 = 9 DE OCTUBRE  
 4 = 12 DE ABRIL  
 5 = EL ARENAL

M = MANÍ

## ANEXO 6

### AFLATOXINAS NUEZ CONCENTRACIÓN ( $\mu\text{g}/\text{Kg}$ )

N-01					1
N-02					1
N-03					1
N-04					1
N-05					2
N-06					2
N-07				0,14	2
N-08		1,85			3
N-09		0,64		0,21	3
N-10					3
N-11					4
N-12					4
N-13					4
N-14					4
N-15					4
N-16				0,14	4
N-17					5
N-18				1,39	5
N-19					5
N-20		0,42		0,2	5
N-21					5
N-22					5
N-23					5
N-24					5
N-25					5
N-26					5
N-27					5
N-28					5
N-29					5
N-30					5

1 = 10 DE AGOSTO

2 = 27 DE FEBRERO

3 = 9 DE OCTUBRE

4 = 12 DE ABRIL

5 = EL ARENAL

N= nuez



# ANEXO 7

## MONTE CARLO SIMULATION: MANÍ

@RISK - Results Summary								
Inputs		Outputs						
Simulation Results For Outputs:				Inputs = 3; Outputs = 4; Iterations = 5000; Runtime = 00:00:02				
Name	Cell	Graph	Min	Mean	Max	5%	95%	Errors
AFG2int	C36		-2,205751E-06	3,203807E-05	8,553823E-05	5,521695E-06	6,840246E-05	0
AFG1int	C37		-2,304326E-03	1,745643E-04	9,653869E-03	-6,168642E-04	0,0013235	0
AFB2int	C38		-2,430377E-06	3,530072E-05	9,424914E-05	6,084005E-06	7,536833E-05	0
AFB1int	C39		-2,545539E-06	2,016588E-05	1,306906E-04	2,880713E-06	5,153825E-05	0

@RISK - Detailed Statistics							
Name	AFG2int	AFG1int	AFB2int	AFB1int	AFG1 2	AFB1	mani
Description	Output	Output	Output	Output	RiskLoglogistic(-11..	RiskExpon(0,0576..	RiskTriang(-0,000..
Cell	Sheet1!C36	Sheet1!C37	Sheet1!C38	Sheet1!C39	Sheet1!C32	Sheet1!E32	Sheet1!C35
Minimum	-2,205751E-06	-2,304326E-03	-2,430377E-06	-2,545539E-06	-7,954211	6,808441E-02	-1,104717E-05
Maximum	8,553823E-05	9,653869E-03	9,424914E-05	1,306906E-04	40,15486	0,5745726	4,284052E-04
Mean	3,203807E-05	1,745643E-04	3,530072E-05	2,016588E-05	1,080746	0,1257419	1,604578E-04
Std Deviation	1,953672E-05	6,613167E-04	2,152627E-05	1,634825E-05	3,376944	5,763106E-02	9,784667E-05
Variance	3,816834E-10	4,373398E-07	4,633802E-10	2,672654E-10	11,40375	3,321338E-03	9,573971E-09
Skewness	0,5080538	2,628208	0,5080538	1,872455	1,509115	1,9813	0,5080538
Kurtosis	2,400343	22,38783	2,400343	8,153075	10,32364	8,707128	2,400343
Errors	0	0	0	0	0	0	0
Mode	1,208578E-05	4,979021E-07	1,331656E-05	5,974508E-06	0,2180244	6,836629E-02	6,052981E-05
5% Perc	5,521695E-06	-6,168642E-04	6,084005E-06	2,880713E-06	-3,461669	7,102896E-02	2,765457E-05
10% Perc	8,850775E-06	-4,087741E-04	9,752106E-06	4,585138E-06	-2,575158	7,414972E-02	4,432775E-05
15% Perc	1,140579E-05	-2,71535E-04	1,256732E-05	6,068768E-06	-1,976204	7,744762E-02	5,712417E-05
20% Perc	1,365911E-05	-1,874802E-04	1,505011E-05	7,438876E-06	-1,49969	8,094233E-02	6,840957E-05
25% Perc	1,597632E-05	-1,175699E-04	1,760329E-05	8,790077E-06	-1,08636	8,465607E-02	8,001497E-05
30% Perc	1,837725E-05	-6,972443E-05	2,024872E-05	1,013276E-05	-0,7119031	0,0886323	9,203963E-05
35% Perc	2,085361E-05	-2,99917E-05	2,297727E-05	1,150895E-05	-0,3588343	9,291936E-02	1,044421E-04
40% Perc	2,344312E-05	-1,654487E-06	2,583049E-05	1,290695E-05	-1,815278E-02	9,752578E-02	1,174113E-04
45% Perc	2,613085E-05	2,639952E-05	2,879192E-05	1,448328E-05	0,3190908	0,1025412	1,308724E-04
50% Perc	2,894733E-05	6,423103E-05	3,189522E-05	1,61546E-05	0,6580083	0,1080447	1,449783E-04
55% Perc	3,190428E-05	1,012037E-04	3,51533E-05	1,78515E-05	1,00861	0,1141161	1,597877E-04
60% Perc	3,504223E-05	1,468445E-04	3,86108E-05	1,963874E-05	1,376521	0,1209091	1,755037E-04
65% Perc	3,837625E-05	2,064275E-04	4,228436E-05	2,173827E-05	1,771	0,1286065	1,922016E-04
70% Perc	4,195292E-05	2,742253E-04	4,622525E-05	2,408212E-05	2,207802	0,1374707	2,101148E-04
75% Perc	4,583652E-05	3,507213E-04	5,050434E-05	2,666884E-05	2,705301	0,1479755	2,295652E-04
80% Perc	5,014963E-05	4,586369E-04	5,525668E-05	3,003869E-05	3,295964	0,1608597	2,511667E-04
85% Perc	5,502955E-05	6,003688E-04	6,063356E-05	3,429196E-05	4,046617	0,1774763	2,756071E-04
90% Perc	6,084852E-05	8,421012E-04	6,704511E-05	4,002544E-05	5,106204	0,2007491	3,047505E-04
95% Perc	6,840246E-05	0,0013235	7,536833E-05	5,153825E-05	6,967911	0,2408021	3,425833E-04
Filter: Minimum							



## ANEXO 8

### MONTE CARLO SIMULATION: NUEZ

@RISK - Results Summary								
Inputs					Outputs			
Simulation Results For Outputs: Inputs = 3; Outputs = 4; Iterations = 5000; Runtime = 00:00:01								
Name	Cell	Graph	Min	Mean	Max	5%	95%	Errors
AFG2int	C36		-1,263011E-06	6,832291E-06	6,268232E-05	4,087445E-07	1,924904E-05	0
AFG1int	C37		-4,531579E-04	3,022617E-06	3,227827E-04	-5,608861E-05	5,806738E-05	0
AFB2int	C38		-1,54368E-06	8,350577E-06	7,661173E-05	4,995766E-07	2,35266E-05	0
AFB1int	C39		-1,285152E-06	4,766605E-06	6,308649E-05	2,3996E-07	1,467284E-05	0

@RISK - Detailed Statistics							
Name	AFG2int	AFG1int	AFB2int	AFB1int	AFG1	AFB1	nuez
Description	Output	Output	Output	Output	RiskExtvalueMin(0..	RiskExpon(0,0576..	RiskInvgauss(0,00..
Cell	Sheet1!C36	Sheet1!C37	Sheet1!C38	Sheet1!C39	Sheet1!C32	Sheet1!E32	Sheet1!C35
Minimum	-1,263011E-06	-4,531579E-04	-1,54368E-06	-1,285152E-06	-4,921531	6,808382E-02	-7,016728E-06
Maximum	6,268232E-05	3,227827E-04	7,661173E-05	6,308649E-05	1,734172	0,7101613	3,482351E-04
Mean	6,832291E-06	3,022617E-06	8,350577E-06	4,766605E-06	7,417099E-02	0,1257635	3,795717E-05
Std Deviation	6,375446E-06	3,921722E-05	7,792211E-06	5,248789E-06	0,7614387	5,784353E-02	3,541914E-05
Variance	4,064631E-11	1,537991E-09	6,071856E-11	2,754979E-11	0,5797889	3,345874E-03	1,254516E-09
Skewness	2,088604	-1,094967	2,088604	2,950467	-1,129472	2,063139	2,088604
Kurtosis	10,01121	19,05556	10,01121	17,44264	5,284577	9,883343	10,01121
Errors	0	0	0	0	0	0	0
Mode	2,248912E-06	-2,279427E-08	2,74867E-06	1,740083E-06	0,3893284	6,836712E-02	1,249396E-05
5% Perc	4,087445E-07	-5,608861E-05	4,995766E-07	2,3996E-07	-1,348127	7,103589E-02	2,270802E-06
10% Perc	1,020814E-06	-3,066107E-05	1,247662E-06	6,005386E-07	-0,9207019	7,414228E-02	5,67119E-06
15% Perc	1,535667E-06	-1,765682E-05	1,876926E-06	9,15734E-07	-0,6625611	7,744114E-02	8,531483E-06
20% Perc	2,013443E-06	-1,056844E-05	2,460874E-06	1,188666E-06	-0,4741738	8,093992E-02	1,118579E-05
25% Perc	2,482644E-06	-6,242941E-06	3,034343E-06	1,459096E-06	-0,3235972	8,465612E-02	1,379247E-05
30% Perc	2,953913E-06	-3,10325E-06	3,610338E-06	1,759847E-06	-0,1958496	8,863819E-02	1,641063E-05
35% Perc	3,439035E-06	-1,093738E-06	4,203265E-06	2,074855E-06	-8,335838E-02	9,291751E-02	1,910575E-05
40% Perc	3,946661E-06	4,353956E-08	4,823697E-06	2,429771E-06	1,775897E-02	9,753161E-02	2,192589E-05
45% Perc	4,486673E-06	1,260058E-06	5,483711E-06	2,770812E-06	0,1111053	0,1025471	2,492596E-05
50% Perc	5,068522E-06	2,805688E-06	6,19486E-06	3,192877E-06	0,1990384	0,1080298	2,815845E-05
55% Perc	5,702921E-06	4,737574E-06	6,970236E-06	3,627483E-06	0,2832066	0,1141019	3,168289E-05
60% Perc	6,408707E-06	7,019908E-06	7,832864E-06	4,171531E-06	0,3649668	0,1209063	3,560393E-05
65% Perc	7,204165E-06	9,846519E-06	8,805091E-06	4,720484E-06	0,4457401	0,1285933	4,002314E-05
70% Perc	8,121684E-06	1,283588E-05	9,926503E-06	5,360678E-06	0,5269553	0,137495	4,512047E-05
75% Perc	9,211741E-06	1,616721E-05	1,125879E-05	6,190051E-06	0,6109526	0,1480203	5,117634E-05
80% Perc	1,056039E-05	2,04827E-05	1,290714E-05	7,226178E-06	0,6995513	0,1608738	5,866883E-05
85% Perc	1,230802E-05	2,667534E-05	1,504313E-05	8,629097E-06	0,7971631	0,1774545	6,837789E-05
90% Perc	1,482415E-05	3,674474E-05	1,811841E-05	1,063758E-05	0,9119343	0,2008489	8,23564E-05
95% Perc	1,924904E-05	5,806738E-05	2,35266E-05	1,467284E-05	1,067909	0,240743	1,069391E-04
Filter Minimum							



## ANEXO 9

### BASE DE DATOS ENCUESTA: DATOS GENERALES

DATOS GENERALES							
REGISTRO	FECHA	SEXO	TALLA (m)	PESO (lbs)	EDAD	AYER FUE	ALIMENTACION DE AYER
001	04-jun-13	M	1,74	121	18	LUNES	CUALQUIER DIA
002	04-jun-13	M	1,72	128	17	LUNES	CUALQUIER DIA
003	04-jun-13	M	1,8	147	18	LUNES	CUALQUIER DIA
004	04-jun-13	M	1,75	147	19	LUNES	CUALQUIER DIA
005	04-jun-13	M	1,67	158	18	LUNES	CUALQUIER DIA
006	04-jun-13	M	1,68	110	16	LUNES	CUALQUIER DIA
007	04-jun-13	M	1,65	110	16	LUNES	CUALQUIER DIA
008	04-jun-13	M	1,68	145	16	LUNES	CUALQUIER DIA
009	04-jun-13	M	1,78	150	16	LUNES	CUALQUIER DIA

## ANEXO 10

### BASE DE DATOS: RECORDATORIO DE 24 HORAS

ALIMENTO	DESC. PROD.	MARCA	# PORCIONES	MEDIDA	CANTIDAD (g)
NUEZ	TORTA		1	CUCHARA GRAN.	13.84g
MANI	DULCE		2	FUNDA PEQUEÑ.	38.7 g
NUEZ	PAN		1	CUCHARA PEQ.	5.71 g
MANI	MANICHO SAL	PEANUTS	2 1	CUCHARA PEQ. FUNDA PEQUEÑ.	38.7 g
NUEZ	TORTA		2	CUCHARA PEQ.	5.71 g
MANI	MANICHO SAL	UNIVERSAL	1 1	CUCHARA PEQ. FUNDA PEQUEÑ.	38.7 g
NUEZ	PASTEL		2	CUCHARA PEQ.	5.71 g
MANI	CHOCOLATE	UNIVERSAL	2	CUCHARA PEQ.	5.71 g
NUEZ					
MANI	DULCE		1	FUNDA PEQ.	38.7 g
NUEZ	PASTEL		1	CUCHARA PEQ.	5,71 g
MANI	DULCE		1	FUNDA PEQ.	38.7 g
NUEZ					
MANI	MANICHO		1	CUCHARA PEQ	5.71 g
NUEZ					
MANI	DULCE		1	FUNDA PEQ.	38.7 g
NUEZ	FRUTO		2	CUCHARA GRAN.	5.71 g
MANI	DULCE		1	FUNDA PEQ.	38.7 g



## ANEXO 11

### BASE DE DATOS: FRECUENCIA DE CONSUMO

ALIMENTO	# PORCIONES	MEDIDA	CANTIDAD (g)	DIARIO	SEMANAL	MENSUAL	ANUAL	NUNCA
NUEZ	1	CUCHARA GRAN.				X		
MANI	1	FUNDA PEQUEÑ.		X				
NUEZ	1	CUCHARA GRAN.			X			
MANI	1	FUNDA PEQUEÑ.				X		
NUEZ	2	CUCHARA GRAN.				X		
MANI	1	FUND. PEQ.			X			
NUEZ	1	CUCHARA GRAN.				X		
MANI	2	FUND. PEQ.			X			
NUEZ	1	CUCHARA PEQ.		X				
MANI	1	FUND. PEQ.			X			
NUEZ	1	CUCHARA GRAN.				X		
MANI	1	FUNDA GRAN.			X			
NUEZ	1	PLATO					X	
MANI	2	FUNDA GRAN.					X	
NUEZ	1	PLATO			X			
MANI	3	FUNDA PEQ.			X			
NUEZ	3	FUNDA PEQ.					X	
MANI	2	FUNDA PEQU.				X		



## ANEXO 12

### SISTEMAS DE CONTROL EN LUGARES DESTINADOS A LA DETERMINACION DE AFLATOXINAS.

Debido a que estas sustancias son carcinogénicas, se debe trabajar bajo campana, evitar la inhalación, el contacto con la piel y en lo posible no abrir los envases donde estén contenidas hasta que se realice su procesamiento.

- Es estrictamente necesaria la utilización de máscaras de seguridad biológica, cuando se manipulen aflatoxinas.
- Usar vestimenta apropiada (trajes especiales, guantes de látex, calzado cerrado, gorros y cascos apropiados).
- La vestimenta debe estar limpia y disponible cuando se necesite.
- No comer, beber ni fumar donde se procesen, manipulen o almacenen aflatoxinas, ya que pueden ser ingeridas accidentalmente. Lavarse cuidadosamente las manos antes de comer, beber y fumar.
- Los trabajadores cuya ropa ha sido contaminada por las aflatoxinas deben cambiarse inmediatamente y ponerse ropa limpia. No deben llevar a su casa la ropa contaminada, podría exponer a los miembros de su familia.
- La ropa de trabajo contaminada debe hacerse lavar por personas que estén informadas acerca de los peligros de la exposición a las aflatoxinas.
- El área inmediata de trabajo debe contar con fuentes de provisión de agua para el enjuague de los ojos y piel en caso de emergencia.
- No barrer en seco el área de trabajo, utilizar aspiradora o un método húmedo para reducir el polvo durante la limpieza.