

I.- INTRODUCCIÓN

El hombre conoce los hongos que crecen en los alimentos desde la antigüedad, y los ha utilizado en su propio beneficio como alimento directo, para mejorar alimentos y especialmente con fines terapéuticos (antibióticos).

Sin embargo, el estudio de los hongos como tóxicos no se inició hasta los años 60, como consecuencia de una intoxicación masiva que provocó la muerte de 100.000 pavos, y que se encontró asociada a una contaminación por hongos.

Ciertas especies fúngicas son capaces de producir unos metabolitos secundarios con carácter tóxico llamadas micotoxinas. La segregación de estas sustancias se produce bajo ciertas condiciones ecológicas favorables.

El interés de los hongos y las micotoxinas es enorme, no sólo desde el punto de vista científico, sino desde la perspectiva económica. Son muchos los problemas que originan, desde el agricultor hasta el consumidor final. Por ejemplo, las bajadas de rendimientos de las cosechas, los empeoramientos en los índices técnicos de los animales de granja, enfermedades en los mismos, alteraciones en los alimentos, pérdidas de características organolépticas y nutricionales, costes derivados de la prevención o el tratamiento descontaminante por citar algunos de ellos.

La exposición del hombre a las micotoxinas se efectúa por vía alimentaria, si bien se han descrito algunos casos muy particulares de afecciones por vía respiratoria. Siendo por tanto la alimentación la principal fuente de riesgos para el hombre.

La semilla de cacahuete (*Arachis hipogea L.*) es un sustrato muy susceptible a ser encontrado contaminado con aflatoxinas, tanto cuando se está formando en el campo, como durante su cosecha, transporte, almacenamiento e industrialización (2). A partir de este fruto, se pueden procesar un gran número de productos comestibles como: aceite, mantequilla, pasta de cacahuete y alimentos balanceados para diferentes tipos de ganado, además de diversas golosinas como: mazapán, garapiñados, etc. (3). Por esto es conveniente hacer este proyecto ya que se podrá determinar que hongos están presentes en los granos, identificar y tener idea de que manera le afecta al grano al ser almacenado, además se podrá ver si hay presencia de aflatoxinas, en granos almacenados y en cacahuates procesados, y en que concentración se encuentra.

Las muestras de cacahuete procesado se sacaron de los municipios de Tuxtla Gutiérrez, Ocozocoautla de Espinosa, Villaflores, Suchiapa, mientras que el cacahuete recién cosechado (sin ningún tratamiento térmico) se pidió una muestra de cada Región productora del Estado de Chiapas.

La siembra de las muestras se llevó a cabo en Cajas Petri de vidrio con medio PDA acidificado con ácido tartárico al 10%. Por cada dos muestras

se realizó una siembra, incorporando 4 granos de cacahuate por caja Petri, Cada semana se sembraron las muestras. Las transferencias se hicieron pasando el tiempo de incubación (7 días aprox.), con el fin de aislar las colonias de hongos presentes, y así poder identificar los hongos por género y especie.

Se utilizó un método inmunoquímico, kits de ELISA, para la determinación de Aflatoxinas Totales, en esta técnica se utilizó productos procesados tales como cacahuate tostado y cacahuates enchilados, de los mercados locales.

Al tener idea de si hay hongos toxigénicos se podrá encaminar trabajos e investigaciones para buscar alternativas que no solo mejore el almacenamiento de este grano (otros granos y cereales) sino que se implemente herramientas para cultivar el cacahuate y controlar la presencia de estos hongos.

II.- JUSTIFICACIÓN

Debido al consumo de cacahuate y de productos a base de este, es conveniente hacer este proyecto ya que podremos determinar que hongos están presentes en los granos, identificar y tener idea de que manera le afecta al grano al ser almacenado, además podremos determinar si hay presencia de aflatoxinas, en granos almacenados y en cacahuates procesados, y en que concentración se encuentra. Este estudio contribuiría mucho para que los agricultores sean conscientes de la

importancia de almacenamiento de sus granos, mejorar su almacenamiento y así poder lanzar al mercado local un grano libre de aflatoxinas y esto repercutiría en una buena salud para los consumidores. También implica que con los resultados a obtener el consumidor se haga consciente de lo que se está consumiendo. Al tener idea de si hay hongos toxigénicos se puede encaminar trabajos e investigaciones para buscar alternativas que no solo mejore el almacenamiento de este grano (otros granos y cereales) sino que se implemente herramientas para cultivar el cacahuate y controlar la presencia de estos hongos.

III.- OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto del almacenamiento de cacahuate sobre la contaminación con aflatoxinas y la incidencia de hongos toxigénicos en granos de cacahuates recién cosechados.

III.1.- OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Identificación de género y especie de hongos toxigénicos encontrados en los granos de cacahuate recién cosechados.
- Cuantificación de aflatoxinas en productos procesados a base de cacahuate y comercializados en el mercado local y en granos almacenados.

IV.- CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA EN QUE PARTICIPÓ

Se trabajó en el Laboratorio de Fitopatología del Campo Experimental Centro de Chiapas, dependiente del Instituto Nacional de Investigaciones forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), de Ocozocoautla de Espinosa, Chiapas.

V.- PROBLEMAS A RESOLVER, PRIORIZÁNDOLOS

NOVIEMBRE						
D	L	M	M	J	V	S
	7	8	9	10	11	12
13	14	15	16	17	18	19
20	21	22	23	24	25	26
27	28	29	30			
DICIEMBRE						
D	L	M	M	J	V	S
				1	2	3
4	5	6	7	8	9	10
11	12	13	14	15	16	17
18	19	20	21	22	23	24
25	26	27	28	29	30	31

ENERO						
D	L	M	M	J	V	S
1	2	3	4	5	6	7
8	9	10	11	12	13	14
15	16	17	18	19	20	21
22	23	24	25	26	27	28
29	30	31				

	Obtención de muestras para determinación de aflatoxinas y determinación de hongos
16,14,11	Determinación de aflatoxinas totales
18	Siembras de las muestras 1 y 2
21-25	Transferencia de colonias de las muestras 1 y 2
	Determinación de género de las colonias transferidas,
	por microscopio
28	Siembra de la muestra 3 y 4
	Siembra de colonia pura para determinación de especie del hongo e caldo papa dextrosa M1- y M2

	en caldo nutritivo M1 y M2
29--3	Transferencia de colonias de las muestras 3 y 4
	Determinación de género de las colonias transferidas,
	por microscopio
5	Siembra de la muestra 5 y 6
	Siembra de colonia pura para determinación de especie del hongo e caldo papa dextrosa M3. y M4
6	PCR de colonias de las muestras 1 y 2
6--10	Transferencia de colonias de las muestras 5 y 6
	Determinación de género de las colonias transferidas,
	por microscopio
12	Siembra de la muestra 7 y 8
	Siembra de colonia pura para determinación de especie del hongo e caldo papa dextrosa M5. y M6
13	PCR de las colonias de las muestras 3 y 4
13-17	Transferencia de colonias de las muestras 7 y 8
	Determinación de género de las colonias transferidas,
	por microscopio

20	PCR de las colonias de las muestras 5 y 6
21	Siembra de colonia pura para determinación de especie del hongo e caldo papa dextrosa M7. y M8
28	PCR de las colonias de las muestras 7 y 8
	Interpretación de resultados
	y elaboración del reporte final

El muestreo de cacahuate procesado se sacó de los municipios de Tuxtla Gutiérrez, Ocozocoautla de Espinosa, Villaflores, Suchiapa, estas muestras fueron recolectadas por la residente y el Dr. Eduardo R. Garrido Ramírez. Mientras que el cacahuate recién cosechado (sin ningún tratamiento térmico) se pidió una muestra de cada Región productora del Estado de Chiapas.

La siembra de las muestras se hizo por la residente, en cajas petri de vidrio con medio PDA acidificado con ácido tartárico al 10%. Por cada dos muestras se realizó una siembra, incorporando 4 granos de cacahuate por caja petri, Cada semana se sembraron las muestras. Este paso se realizó solo por la residente.

Las transferencias se hicieron pasando el tiempo de incubación (7 días aproximadamente e condiciones de laboratorio), con el fin de aislar las colonias de hongos presentes y así poder identificar los hongos por género y especie. Aquí la residente tendrá apoyo del Dr. Garrido para poder hacer la identificación de género y especie de los hongos.

Se utilizó un método inmunoquímico, kits de ELISA, para la determinación de Aflatoxinas Totales, se hizo con productos procesados y se les realizará a granos de cacahuete que no hayan llevado ni un tipo de tratamiento térmico (recién cosechados), este último se almacenará por 3 meses y se le hará determinaciones cada mes para ver la influencia del almacenamiento del cacahuete sobre la concentración de aflatoxinas. Estas determinaciones serán hechas por la residente junto con el apoyo del Ing. Luis David Farrera Ruiz.

VI.- ALCANCES Y LIMITACIONES

Las limitantes para este proyecto son:

- El tiempo en que son recolectadas las muestras, de aquí no solo depende la siembra de los granos sino también la determinación de aflatoxinas ya que se realizará un monitoreo mensual en un periodo de 3 meses.
- La falta de equipo y material para la siembra del grano en las Cajas Petri y de colonias aisladas para proceder a la extracción de ADN, y poder identificar género y especie.

- La humedad que presente el grano para hacer las determinaciones de Aflatoxinas Totales

VII.- FUNDAMENTO TEÓRICO

VII.1.- Cacahuete

La planta de cacahuete (*Arachis hypogaea*) tiene una vida anual, con tallos rastreros y vellosos de entre 25 a 50 cm de altura. Los frutos del cacahuete están envueltos en una cáscara o vaina coriácea que generalmente tiene dos semillas cubiertas de una película delgada, poseen un sabor muy agradable y tienen un alto valor nutritivo.

VII.1.1.- Clima

Los cacahuates se desarrollan adecuadamente en temperaturas que varían entre 21 y 27 °C, pues a 12 °C su crecimiento se detiene y a más de 30 °C aumenta considerablemente la transpiración y puede deshidratarse. Los suelos deseables para la siembra de esta oleaginosa son los permeables, sueltos, profundos y sin agua freática en 1 m de profundidad.

VII.1.2.- Principales Estados Productores

Sinaloa fue en el año 2009 el mayor productor de cacahuete en el país, al generar 21,122 toneladas, cifra que representó el 24.7% del total nacional. Cabe destacar que este estado mantuvo el 100% de su producción en zonas de temporal y que su liderazgo se debió, más que a

su rendimiento, a la extensa superficie sembrada, ya que cerca del 29.3% de la superficie total de cacahuate se sembró en este estado.

Lo situación de Sinaloa contrasta con la del segundo productor en importancia, Chihuahua. El cual mantiene prácticamente la totalidad de la siembra en superficies de riego y obtuvo en 2009 una producción muy cercana a la Sinaloa, 20,566 toneladas que representó el 24.1% de la producción nacional. Chihuahua, a diferencia de Sinaloa, representó únicamente un 11.6% de la superficie dedicada a este cultivo a nivel nacional. Por lo que la elevada producción se debe a los altos rendimientos alcanzados en su superficie tecnificada, que alcanzó los 3.2 ton/ha en 2009, mientras que Sinaloa alcanzó únicamente 1.5 ton/ha. Chiapas, Puebla y Oaxaca también son importantes productores, en conjunto generaron casi el 30% de la producción nacional en 2009(1).

VII.1.3.- Usos

La semilla de cacahuate (*Arachis hypogea L.*) es un sustrato muy susceptible a ser encontrado contaminado con aflatoxinas, tanto cuando se está formando en el campo, como durante su cosecha, transporte, almacenamiento e industrialización (2). A partir de este fruto, se pueden procesar un gran número de productos comestible como: aceite, mantequilla, pasta de cacahuate y alimentos balanceados para diferentes tipo de ganado, además de diversas golosinas como: mazapán, garapiñados, etc. (3)

El cultivo se utiliza de manera integral, como forraje para el ganado, para consumo humano directo o para la elaboración de productos industrializados. En el primer caso se consume tostado como fruto seco y en confitería, para la preparación de pan, dulces, galletas, ensaladas, etc. En el segundo caso se destina para la fabricación de aceite, harina, crema de cacahuete, tintas, lápices labiales, colores, jabón, entre otros(1).

VII.2.- Micotoxinas

Los mohos crecen sobre materiales vegetales produciendo el deterioro de los mismos. Forman metabolitos secundarios que actúan como antibióticos favoreciendo la prevalencia del moho frente a otros microorganismos, muchos de los cuales son tóxicos para plantas y/o animales. Estos metabolitos que enferman o matan a los animales que los consumen se conocen como micotoxinas, y la afección se llama micotoxicosis (4). Las micotoxinas son compuestos ubicuos que difieren mucho en sus propiedades químicas, biológicas y toxicológicas. Una micotoxicosis primaria se produce al consumir vegetales contaminados, y secundaria al comer carne o leche de animales que ingirieron forrajes con micotoxinas. La presencia de aflatoxina M1 en la leche es consecuencia de la ingesta de aflatoxina B1 (5).

VII.2.1.- Hongos en el Campo y el Almacenamiento

Los hongos que deterioran los productos vegetales pueden ser adquiridos en el campo como por ejemplo *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*,

Fusarium y otros, además de los fitopatógenos. Las especies difieren según el vegetal, el clima y la región geográfica (6). Requieren una humedad relativa ambiente del 90 - 100% y un contenido de agua en las semillas de 22 - 23%, con un amplio rango de temperatura entre 0 y 30°C, aunque algunos pueden crecer a 35°C o más (7).

La colonización de las partes aéreas de las plantas por los microorganismos comienza tan pronto como son expuestas al aire. Las bacterias suelen aparecer primero, luego las levaduras y finalmente los hongos filamentosos saprobios y patógenos. Los mohos continúan desarrollándose a lo largo de todo el crecimiento de la planta, y se acentúa cuando la planta envejece y las semillas maduran. La cosecha perturba el ecosistema y las condiciones relativamente estables de almacenamiento entrañan un profundo cambio en la composición de la microbiota (6). Los frutos o restos vegetales de cacahuate abandonados en el campo suelen albergar esclerocios, como en el caso de *Sclerotium*, que serán la fuente de contaminación del cultivo en la temporada siguiente (8).

El crecimiento fúngico continúa en los productos frescos después de la cosecha y causa lesiones que desfiguran el aspecto de frutas y hortalizas. En los granos de cereales los hongos persisten solamente si el grano está suficientemente seco como para evitar la competencia de otras especies incorporadas posteriormente (7).

Otros hongos presentes en los productos almacenados son especies de *Aspergillus*, *Penicillium* y algunos xerófilos (6). Los factores que influyen en su desarrollo son el contenido de agua del producto almacenado, la temperatura, el tiempo, el grado de invasión fúngica antes del almacenamiento, la actividad de insectos y ácaros. Requieren menor humedad relativa ambiente (70 - 90%) y contenido de agua en los granos (15 - 20%), pero el rango de temperatura es más amplio (0 - 45°C) y puede crecer a menor concentración de oxígeno (7).

VII.2.2.- Producción de Micotoxinas

El metabolismo primario de los mohos es similar al de la mayoría de organismos eucarióticos. Los metabolitos secundarios son formados a partir de unos pocos intermediarios del metabolismo primario, bajo condiciones sub-óptimas y estrés (4). Durante la biosíntesis de estos metabolitos, la cantidad producida depende no sólo de parámetros nutricionales y ambientales, sino también de la historia previa del desarrollo del moho. Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos durante el desarrollo de algunos hongos que infectan granos y frutas. La formación de micotoxinas refleja que el moho ha alcanzado cierto grado de diferenciación bioquímica, fisiológica y a veces morfológica (9).

Los hongos se caracterizan por un crecimiento rápido y pueden infectar al hombre, se han descrito aproximadamente 900 especies, siendo 12 las que se relacionan con enfermedades humanas. *Aspergillus fumigatus* es la especie que produce en mayor porcentaje enfermedades pulmonares, alérgicas e invasivas (85%), *Aspergillus flavus* con un 5 -10%, *Aspergillus niger* y *Aspergillus terreus* con un 2-3%. Estos hongos se encuentran ampliamente distribuidos en el suelo, en la vegetación en descomposición y en una amplia variedad de material orgánico, son patógenos oportunistas que afectan a pacientes inmunocomprometidos (10).

En países tropicales se puede hallar a estos hongos contaminando alimentos o productos parcialmente enmohecidos. Según la FAO se estima que el 25% de los cultivos agrícolas a nivel mundial son contaminados por micotoxinas liberadas por los hongos, de las cuales las aflatoxinas son las más importantes (11).

Las aflatoxinas producidas por *Aspergillus flavus* presente en alimentos produce cáncer primario en humanos. El problema de las aflatoxinas se puede presentar en cualquier parte del mundo ya que *Aspergillus flavus* es un hongo cosmopolita, que crece a temperaturas de 25° C y una humedad relativa del 70%. Se pueden hallar en el maíz, cacao, trigo, avena, algodón y otros cereales (12).

La acción de estas pequeñas cantidades es acumulativa manifestándose la enfermedad, en algunos casos, al cabo de meses o años. Esto ocurre principalmente con las toxinas mutagénicas. La aflatoxina B1 causa cáncer hepático y las fumonisinas parecen estar relacionadas al cáncer de esófago (13).

La NOM-188-SSA1-2002 especifica que los cereales no deben exceder de 20 µg/kg de aflatoxinas totales. Entendiendo como Cereales, a los granos o semillas comestibles de las plantas de las gramíneas, entre los que se incluyen: arroz, avena, cebada, centeno, maíz, sorgo, triticale y trigo (14).

VII.2.3.- Análisis de Micotoxinas

Para la cuantificación de micotoxinas existen diferentes métodos de análisis que pueden ser utilizados, pero la selección siempre se debe basar en que el método a utilizar sea confiable, aplicable y práctico (15).

El método de cromatografía de líquidos (HPLC) es un método exacto y preciso que ha sido aceptado como método oficial y como método de referencia para algunas micotoxinas. Otros métodos de referencia son la Cromatografía de Gases (GC), que se utiliza para el análisis de Tricotecenos y la Cromatografía de Capa Fina (TLC). Sin embargo estos métodos no son ampliamente utilizados, pues requieren de instrumentación de elevado costo y de una alta capacitación del usuario.

Por consiguiente en los últimos años se han desarrollado métodos inmunoquímicos para facilitar el análisis. La ventaja de estos métodos es que son rápidos, simples y de bajos requerimientos instrumentales. Los métodos inmunoquímicos comerciales se pueden dividir básicamente en métodos que utilizan columna de inmunoafinidad y métodos ELISA. Aunque el método de columna de inmunoafinidad fue originalmente desarrollado para la cuantificación mediante Fluorometría, en la actualidad las columnas han sido utilizadas para la purificación y concentración de las micotoxinas para su detección posterior mediante HPLC, GC y TLC. Los métodos ELISA son generalmente utilizados como monitoreo rápido (16).

VIII.- PROCEDIMIENTO Y DESCRIPCIÓN DE LAS ACTIVIDADES REALIZADAS

VIII.1.- Obtención de muestras

Se obtuvieron muestras de cacahuate recién cosechados sin tostar y con cascara (Cuadro 1), cacahuates tostados con cascara y cacahuates enchilados (Cuadro 2) de distintos municipios del Estado de Chiapas, tal como se representa en el siguiente cuadro:

Cuadro 1.- Muestras de cacahuate recién cosechados de las regiones del Estado de Chiapas.

MUNICIPIO	TAMAÑO DE LA MUESTRA	TAMAÑO DE LA SUBMUESTRA
1.- Chicomuselo, Col. Pablo L. Sidar, Zona Fronteriza	186.4 g	120gr aprox.
2.- Suchiapa, Col. Pacu, Zona Centro	258.7 g	120gr aprox.
3.- Villacorzo, Col. Parral, Zona Frailesca	414.4 g	120gr aprox.
4.- Suchiapa, Col. Plan de Muzuli, Zona Centro	399.8 g	120gr aprox.
5.- Suchiapa, Zona Centro	485.7 g	120gr aprox.
6.- Ocozocoautla de Espinosa	643.5 g	120gr aprox.
7.- Cintalapa, Col. Linda Vista	983.4 g	120gr aprox.
8.- Jiquipilas	976.3 g	120gr aprox.

Cuadro 2.- Muestras de cacahuates procesado de Mercados locales de distintos municipios del Estado de Chiapas.

MERCADO	TIPO DE MUESTRA	TAMAÑO DE MUESTRA	TAMAÑO DE SUBMUESTRA
A).-18 de Marzo, Suchiapa	Cacahuate tostado con cascara	244.2 gr	5 gr
B).-18 de Marzo, Suchiapa	Cacahuate enchilado	247.0 gr	5 gr
C).-6 Pte. Don Artemio, Villaflores	Cacahuate tostado con cascara	264.0 gr	5 gr
D).-Mercado San Juan, Villaflores	Cacahuate enchilado	125 gr	5 gr
E).-4 pte. entre 3ª y 4ª sur, Ocozocoautla de Espinosa	Cacahuate tostado con cascara	258 gr	5 gr
F).- 4 pte. entre 3ª y 4ª sur, Ocozocoautla de Espinosa	Cacahuate enchilado	245 gr	5 gr
G).-Mercado	Cacahuate	265.3 gr	5 gr

Juan Sabines, Tuxtla Gtz.	tostado con cascara		
H).-Mercado Juan Sabines, Tuxtla Gtz.	Cacahuete enchilado	148.6 gr	5 gr

VIII.1.1.- Toma de la submuestra

- Mezcla y Reducción a mano

La muestra de envío se mezcló uniformemente a mano formando un montón que se dividió repetidamente a mitades hasta que se obtuvo el peso adecuado para analizar la semilla.

VIII.2.-Siembra de las muestras de cacahuete recién cosechados

Se sembraron 100 granos de cacahuete, de cada submuestra obtenida, en cajas petri con medio PDA acidificado. Se dejaron en un lapso de 7 a 9 días , esto dependiendo de la velocidad de crecimiento de los hongos dejándolo hasta 9 días como periodo máximo de incubación, y se procedió a la transferencia de colonias de hongos.

VIII.2.1.- Esterilización de semillas

- Se tomaron 100 granos por cada muestra para formar una sub-muestra.
- En condiciones asépticas, los granos se desinfectaron con clorox al 1.5% por un minuto. Los granos se lavaron con agua destilada estéril (el recipiente también estaba estéril) y se quitó el exceso de agua con papel filtro estéril.
- Los granos ya desinfectados se incubaron en cajas Petri con Medio PDA acidificado durante 7 días aproximadamente. Se colocaron 4 cacahuates por caja Petri).

VIII.3.- Transferencia de colonias

- Las colonias de hongos presentes se transfirieron a cajas Petri con medio PDA, con la ayuda de un sacabocados en condiciones asépticas, las cajas se sellaron con papel parafilm y se dejó incubar.

VIII.4.- Determinación de aflatoxinas en productos procesados de mercados locales y granos almacenados, por el método de Elisa

Para esta determinación se utilizó el kit de RIDASCREEN FAST Aflatoxin Total. Este es un inmunoensayo enzimático competitivo para el análisis cuantitativo de aflatoxina en cereales y alimentos para animales (raciones balanceadas).

VIII.5.1.- Preparación de las Muestras para el método de ELISA

Las muestras fueron almacenadas en un lugar fresco, protegida de la luz. Se pesó 5g de la muestra en un contenedor apropiado y se le agregó 25 ml de metanol al 70% para ser licuado durante 3 minutos.

Se filtró el extracto a través de un papel de filtro Whatman No. 1 y posteriormente se diluyó 1 ml de filtrado con 1 ml de agua destilada, se utiliza por cada micro pozo del test 50µl de la dilución anterior.

Colocando suficientes micropozos en el marco porta micropozos para los estándares y para las muestras a analizar, marque la posición de los estándares y de las muestras. Agregando 50µl de los estándares y de las muestras a analizar a los micropozos correspondientes. Se utilizó una punta de pipeta nueva para cada estándar y para cada muestra, agregando 50 µl del conjugado aflatoxina-enzima (tapón rojo) a los micropozos correspondientes, inmediatamente se le agregó 50 µl de anticuerpo anti-aflatoxina (tapón negro) a cada micropozo. Se mezcló el contenido de la microplaca suavemente y se incubó durante 10 minutos (+/- 0.5) a temperatura ambiente (20-25°C).

Se vació los micropozos golpeando energéticamente (tres veces consecutivas) el marco porta micropozos sobre un papel absorbente limpio para asegurar la eliminación completa de restos líquidos. Se lavó los micropozos (250µl por micropozo) con agua destilada utilizando una pipeta multicanal o una botella de lavado y vaciando nuevamente los micropozos de la forma ya indicada. Se repitió este paso dos veces más.

Se agregó dos gotas o 100µl de sustrato/cromógeno (gotero blanco) a cada micropozo mezclando el contenido de la microplaca suavemente e incube 5 minutos (+/- 0.5) en la obscuridad a temperatura ambiente (20-25°C). Se agregó dos gotas o 100µl de la solución stop (gotero amarillo o anaranjado) a cada micropozo mezclando el contenido de la microplaca suavemente y posteriormente se midió la absorción a 450nm en el transcurso de los siguientes 10 min. El calibrado del valor cero se realizó contra aire.

Se tomaron muestras representativas de los productos regionales a base de cacahuete en los mercados locales de los municipios de:

- Tuxtla
- Suchiapa
- Villaflores
- Ocozocoautla de Espinosa

Tales productos son:

1. Cacahuete tostado con su propia cáscara
2. Cacahuete enchilado
3. Testigo (cacahuete procesado etiquetado)

Se tomaron sub-muestras representativas y se molieron para proceder a hacer el análisis.

a) De las 3 muestras anteriores se hará con 3 repeticiones cada una.

Estos análisis con la técnica de ELISA se hicieron con la finalidad de sacar un estimado de las incidencias de Aflatoxinas totales, y determinar en qué concentración se encuentran presentes.

De las muestras de cacahuate recién cosechados tomadas de las zonas productoras de cacahuate se almacenaran y se determinara la concentración de aflatoxinas presentes, haciendo estos análisis cada 28 días. Se almacenaran los granos en bolsas de papel.

IX.- RESULTADOS

IX.1.- Determinación de Aflatoxinas Totales

Se hizo la prueba de Elisa para ver en que concentración se encuentran presentes las aflatoxinas en cacahuates procesados de mercados locales, para esto se realizó la molienda del grano con metanol al 70%.



Figura 1. Tubos Eppendorf con 1ml de agua destilada estéril y 1 ml de extracción de las muestras.

El cuadro 3 representa las muestras que fueron tomadas para la determinación de Aflatoxinas totales y en que concentración fueron encontradas.

Cuadro 3.- Concentración de Aflatoxinas totales en granos de cacahuete procesados de los mercados locales.

TRATAMIENTO	MERCADO	MUESTRA	µg/Kg (Aflatoxina/ cacahuete)
1	SUCHI	A- Cacahuete tostado c/cascara	12.85
2	SUCHI	B- Cacahuete enchilado	<1.7
3	VILLAF	C- Cacahuete tostado	1.7

		c/cascara	
4	VILLAF	D- Cacahuete enchilado	<1.7
5	COITA	E- Cacahuete tostado c/cascara	6.71
6	COITA	F- Cacahuete enchilado	3.63
7	TGZ	G- Cacahuete tostado c/cascara	<1.7
8	TGZ	H- Cacahuete enchilado	3.01
9	TESTIGO	TESTIGO	1.98

IX.2.- Colonias transferidas y descripción morfológica.

- La colonia 1 tiene conidios color rosa/blanco, apariencia algodonosa, crecimiento lento.



Figura 2. Colonia 1

- La colonia 2 presenta conidios color verde militar/blanco, su circunferencia es muy definida, los conidios blancos rodean la colonia y es algodonosa.



Figura 3 Colonia 2

La colonia 3 presenta conidios color amarillo indio (opaco) y alrededor de la colonia los conidios son de color beige, es una colonia pegada al medio.



Figura 4. Colonia 3

- La colonia 4 presenta conidios amarillo limón/verde, su crecimiento es lento (alrededor del 5 día se presenta el crecimiento de la colonia) y pegado al medio.

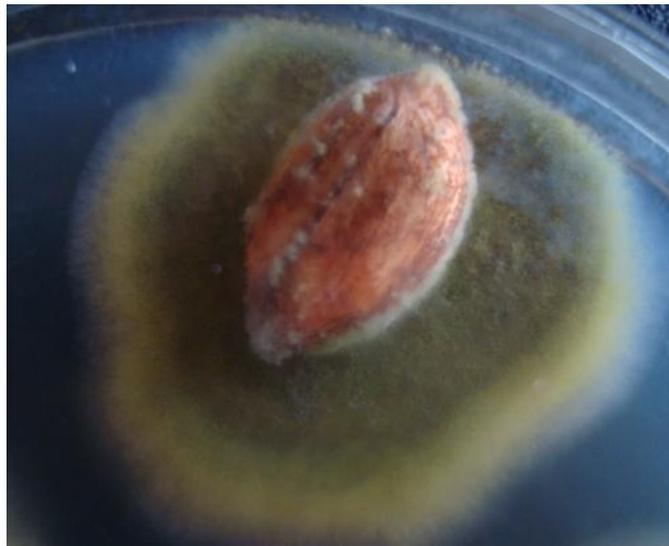


Figura 5. Colonia 4

- Colonia 5 presenta conidios azul turquesa/blanco, crecimiento lento y pegado al medio.



Figura 6. Colonia 5

- La colonia 6 presenta crecimiento muy lento y da una apariencia aterciopelada, sus conidios son de color blanco/café ocre.



Figura 7. Colonia 6

- La colonia 7 tiene apariencia ligeramente algodonosa, crecimiento muy lento y conidios azul turquesa y son blancos alrededor.



Figura 8. Colonia 7

- La colonia 8 es de crecimiento muy rápido conidios negro/gris y presenta una apariencia telarañosa.



Figura 9. Colonia 8

- La colonia 9 presenta una coloración blanco con rosa muy tenue (color carne), su crecimiento es pegado al medio y presenta una velocidad de crecimiento “medio



Figura 10. Colonia 9

- La colonia 10 es de crecimiento muy rápido, esta colonia tiene la apariencia de mallas sobre puestas. Es una colonia blanca que al ir creciendo presenta agrupaciones muy pequeñas color negro (bolitas negras) en la superficie.



Figura 11. Colonia 10

- La colonia 11 tiene conidios de color verde militar y alrededor de la colonia presentan una coloración beige, es de crecimiento muy lento y es ligeramente algodonosa.



Figura 12. Colonia 11

- La colonia 12 presenta conidios color beige, es de crecimiento muy lento y pegado al medio.



Figura 13. Colonia 12

- La colonia 13 es de crecimiento lento y pegado al medio, tiene una coloración durazno/café.

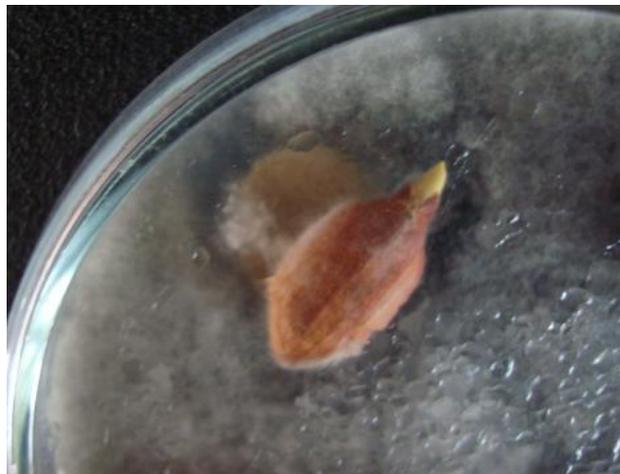


Figura 14. Colonia 13

- En la figura 14 se muestra la colonia 14 que se encuentra localizada al borde de la caja petri, presenta conidios color verde militar (opaco), de crecimiento lento y pegado al medio.



Figura 15. Colonia 14

- La colonia 15 representada en la figura 16, se observa que es una colonia de crecimiento muy lento y pegada al medio, tiene conidios color azul/gris y muy blancos en la superficie de la colonia.



Figura 16. Colonia 15

- La colonia 16 es de crecimiento muy lento y pegada al medio, los conidios presentan una coloración amarillo/beige.



Figura 17. Colonia 16

- La colonia 17 es de crecimiento lento y pegada al medio, presenta coloración café oscuro, la colonia no tiene una circunferencia definida, crecimiento desigual.



Figura 18. Colonia 17

- La colonia 18 presenta una circunferencia muy definida, los conidios presenta coloración verde militar/blanco, presenta una coloración negra en el centro y blanco en la orilla, tiene una apariencia aterciopelada y algodonosa y crecimiento lento.

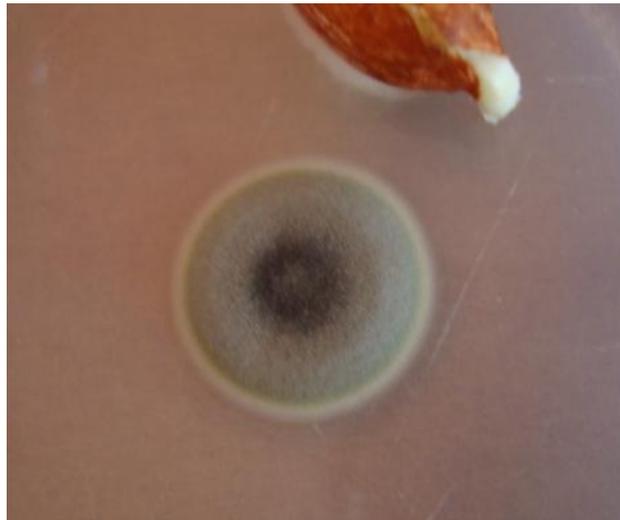


Figura 19. Colonia 18

- La colonia 19 es de crecimiento muy lento y pegada al medio, presenta conidios coloro amarillo, la coloración de estos se presenta como puntos amarillos esparcidos en la colonia, alrededor de la colonia es traslúcida.



Figura 20. Colonia 19

- La colonia 20 es de crecimiento muy lento y algodonosa, conidios color blanco en la superficie y presenta un centro oscuro, la colonia al reverso presenta una coloración marrón.



Figura 21. Colonia 20

- La colonia 22 es de crecimiento muy lento y pegada al medio, conidios de color verde oscuro/verde veronés alrededor de la colonia los conidios son beige.



Figura 22. Colonia 22

- La colonia 23 es de crecimiento muy lento y pegado al medio, conidios verde/azul y blancos alrededor de la colonia. Tiene una apariencia arenosa.



Figura 23. Colonia 23

- La colonia presenta crecimiento alrededor del grano y en crecimiento pegado al medio, presenta conidios

azulados/blanco, tiene una apariencia aterciopelada y es de crecimiento muy lento.

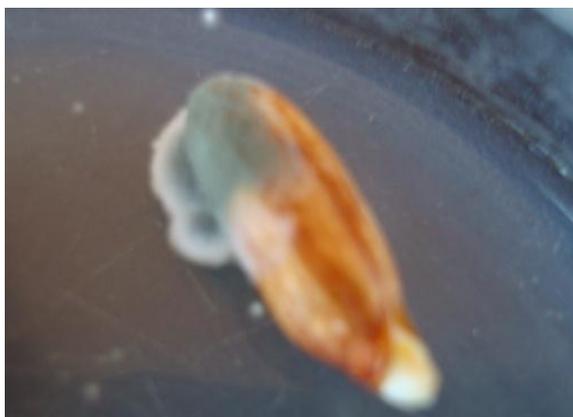


Figura 24. Colonia 24

- La colonia 25 es de crecimiento lento y pegada al medio, presenta una circunferencia muy definida con conidios blancos y en el centro de la colonia son color plata.



Figura 25. Colonia 25

- La colonia 26 presenta conidios color café claro/verde y ligeramente gris, es una colonia de crecimiento “medio” y algodonosa.



Figura 26. Colonia 26

- La colonia 27 es de crecimiento lento y pegado al medio, su crecimiento tiene apariencia de ondas, presenta conidios azulados y blancos.



Figura 27. Colonia 27

- La colonia 28 tiene crecimiento en la semilla, sus conidios son color mostaza en la superficie, con apariencia arenosa, y blancos en la parte inferior de la colonia.

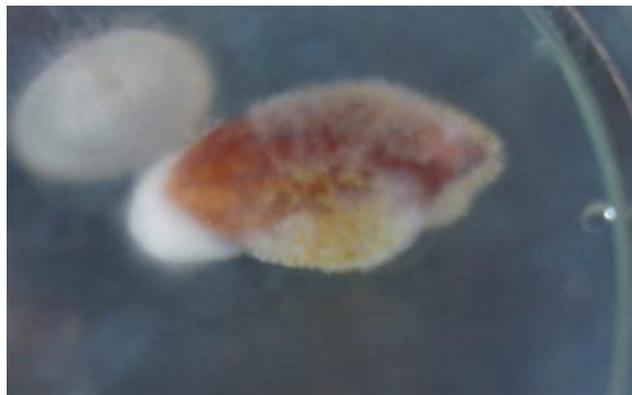


Figura 28. Colonia 28

- La colonia 29 es de color ámbar, el crecimiento es pegado al medio pero no tiene un crecimiento regular (crecimiento a partir del cuarto día), es decir que no presenta una circunferencia definida y su crecimiento es lento.

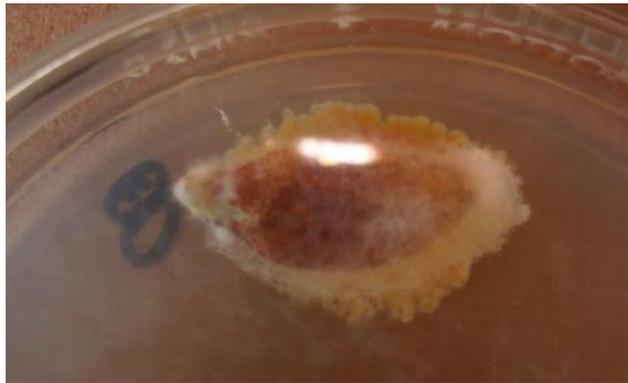


Figura 29. Colonia 29

- La colonia 20 presenta crecimiento en el grano, conidios verdes/ verde arlequín, y es de crecimiento lento.



Figura 30. Colonia 30

- La colonia 31 es de crecimiento lento y pegado al medio, sus conidios son de color amarillo limón y verde muy tenue.



Figura 31. Colonia 31

- La colonia 32 es de crecimiento muy lento, ligeramente algodonosa. Los conidios presentan una coloración amarilla mostaza/verde.



Figura 32. Colonia 32

- La colonia 33 es de crecimiento muy lento, algodonosa. Los conidios son color marrón y ligeramente blancos en la superficie.



Figura 33. Colonia 33

- La colonia 34 es de crecimiento muy lento, algodonosa en el centro y presenta crecimiento pegada al medio alrededor de la colonia. Los conidios so de color amarillo/blancos.



Figura 34. Colonia 34

- La colonia 35 es de crecimiento lento y ligeramente algodonosa, los conidios tienen una coloración azul/gris y son blancos alrededor de la colonia.



Figura 35. Colonia 35

- La colonia 36 es de crecimiento lento y pegada al medio, los conidios son de coloración púrpura o borgoña y blancos en la superficie con apariencia de espolvoreada. Secreta una sustancia de color borgoña.



Figura 36. Colonia 36

- La colonia 37 es de crecimiento rápido y semi-algodonoso, telarañoso, color beige/blanco.



Figura 37. Colonia 37

- La colonia 38 es de crecimiento rápido y pegada al medio, presenta una coloración blanca translúcida.



Figura 38. Colonia 38

- La colonia 39 es de crecimiento rápido, crecimiento en el grano y pegada al medio, los conidios son de color verde agua/blanco, tiene una apariencia arenosa.



Figura 39. Colonia 39

- La colonia 40 es de crecimiento muy rápido y pegada al medio, apariencia telarañosa. En la figura 40 se observa que al crecer sobre otro hongo da una apariencia de hilos sedosos sobre puestos. La colonia es color blanca/crema.



Figura 40. Colonia 40

- La colonia 41 es de crecimiento lento y algodonosa, no tiene un crecimiento uniforme y presenta una coloración amarilla.



Figura 41. Colonia 41

- La colonia 42 es de crecimiento lento y pegada al medio, no tiene un crecimiento uniforme y la colonia presenta una coloración amarilla mostaza.



Figura 42. Colonia 42

- La colonia 43 es de crecimiento lento y ligeramente algodonosa. Los conidios son de color salmón y blancos en la superficie, y aparenta tener una secreción ligeramente rosada.



Figura 43. Colonia 43

- La colonia 44 es de crecimiento lento y pegado al medio, presenta crecimiento desigual y la colonia es de color rosa coral.



Figura 44. Colonia 44

- La colonia 45 es de crecimiento lento y algodonosa, presenta conidios color café/gris y al reverso de la colonia es de color amarillo opaco.



Figura 45. Colonia 45

- La colonia 46 es de crecimiento lento y pegada al medio, los conidios presentan una coloración negro/amarillo. Los conidios negros tiene una apariencia arenosa.



Figura 46. Colonia 46

- La colonia 47 es de crecimiento lento y algodonosa, los conidios son de color gris/marrón, en la superficie los conidios presentan mas la coloración gris.



Figura 47. Colonia 47

- La colonia 48 es de crecimiento lento y pegada al medio, la coloración de los conidios son café/amarillo y un matiz de color marrón.



Figura 48. Colonia 48

IX.2.1- Frecuencia de las colonias contaminantes

En el cuadro 4 se ven la frecuencia en que una colonia estuvo presente en las 8 muestras y el promedio de numero de colonias (de la misma colonia) presentes en las 8 muestras.

Cuadro 4. Frecuencia de hongos aislados en cacahuete y promedio de contaminación

COLONIA	FRECUENCIA*	PROMEDIO**
1	62.5	1.125
2	50	1.5
4	37	11.75
5	50	14.5
7	62.5	2.38
8	75	18.5
10	37	1.75
18	25	1.75
25	25	0.5
27	25	0.375
45	25	0.5
OTROS	12.5	0.37

*Frecuencia= Porcentaje de muestras con esta colonia, del total de las muestras colectadas.

**Promedio= Promedio de la contaminación por muestra (100 granos/muestras)

X.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- Todas las muestras analizadas contienen aflatoxinas totales
- Ninguna de las muestras analizadas sobrepasan el límite permitido de la NOM-188-SSA1-2002 de 20 ppm.
- Hay mayor contaminación en cacahuate tostado que en cacahuate enchilado.
- La mayor contaminación se observó en el cacahuate tostado de Suchiapa.
- Existen diferencias en la incidencia entre muestras de cacahuate colectado. Se aislaron 48 colonias diferentes de hogos contaminantes en semillas de cacahuate.
- Las colonias aisladas más frecuentes fueron la 8,7,5 y 1. La mayor variabilidad en colonias aisladas se obtuvo la muestra 1 y 2.
- *Aspergillus flavus* se observó en 3 muestras colectadas, con una contaminación del 2 al 87%.
- La identificación de colonia se sigue realizando, se recomienda seguir con este trabajo debido a su gran importancia e impacto, las colonias ya

están aisladas para proceder a la identificación de género y especie. Y los granos están almacenados solo que siguen frescos y aun no se han podido realizar los análisis de monitoreo de aflatoxinas totales.

XI.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS Y VIRTUALES

1. "Monografía del cacahuate". Dirección General Adjunta de Planeación Estratégica y Análisis Sectorial, Dirección Ejecutiva de Análisis Sectorial. Junio 2011
(www.financierarural.gob.mx/informacionsectorrural/Documents/Monografias/Monograf%C3%ADa%20Cacahuate_Junio-2011.pdf)
(www.financierarural.gob.mx/informacionsectorrural/Documents/Monografias/Monograf%C3%ADa%20Cacahuate_Junio-2011.pdf)
2. Payne, G.A., 1995. Aflatoxin in maize. *Critical Reviews in Plant Sciences* 10: 423-440.
3. Shane, S.M., 1994. Economic issues associated with aflatoxin. *In: Eaton, D.L., J.D. Groopman, (Eds.), The Toxixology of aflatoxinas.* Academic Press, Inc., San Diego, pp. 513-527.
4. Swanson BG. *Acta Horticulturae* 207: 49-61, 1987
5. Lillehøj EB. En: *Mycotoxins and Animal Foods.* Smith JE, Henderson RS, eds. CRC Press, Boca Ratón, 1991, cap. 1
6. Lacey J. *Journal of Applied Bacteriology, Symposium Supplement* 1989, pp. 11S-25S.
7. Christensen CM. En: *Food and Beverage Mycology.* Beuchat LR, ed. New York, Van Nostrand Reinhold, 1987, cap. 7 (Christensen CM, 1987)
8. Kale S, Bennett JW. En: *Handbook of Applied Mycology, vol. 5.* Bhatnagar D, Lillehoj EB, Arora DK, eds. Marcel Dekker, New York, 1992, cap. 12
9. Moss MO. En: *Mycotoxins and Animal Foods.* Smith JE, Henderson RS, eds. CRC Press, Boca Ratón, 1991, cap. 2
10. David C., Dimier-David L., Vargas F., Torres M., Dedet J.P. 1993. Fifteen years of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Bolivia: retrospective study. *Transaction Royal Society Medicine Hygiene*, 87: 7-9.
11. Ruiz, J., 1999. El asombroso reino de los hongos, Unidad Irapuato del Cinvestav, *Avance y perspectiva*, Vol. 20.

12. Avise, J.C.1989. A role for molecular genetics in the recognition and conservation of endangered species. *Trends in Ecology and Evolution* 4: 279-281.
13. Hocking AD. En: Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers. Doyle MP, Beuchat LR, Montville TJ, eds. ASM Press, Washington, 1997. pp. 393-405
14. NORMA Oficial Mexicana NOM-188-SSA1-2002, Productos y Servicios. Control de aflatoxinas en cereales para consumo humano y animal. Especificaciones sanitarias.
(www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/188ssa12.html)
(www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/188ssa12.html)
15. Horwitz, W. 1982. "Evaluation of Analytical Methods Used for Regulation of Foods and Drugs". *Analytical Chemistry* 54, 67A.
16. Lara Arellano Javier 2003. "Métodos de determinación, identificación y control de micotoxinas en ingredientes para la nutrición animal". Asociación Mexicana de Nutrición Animal (AMENA).