

114
207



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

T E S I S :

**" DIFERENTES CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO
EN CACAHUATE SU REPERCUSSION EN EL
INCREMENTO DE AFLATOXINAS "**

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

IVONNE JUDITH RAMIREZ FUENTES

MEXICO, D. F.

DICIEMBRE 1993



**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E

		pag.
CAPITULO I	Introducción	
1.1	Semilla de Cacahuete	4
1.2	Requerimientos de almacenamiento	6
1.3	Productos elaborados	7
1.4	Generalidades sobre micotoxinas	13
1.5	Aflatoxinas	15
1.6	Técnicas de muestreo	26
1.7	Variabilidad de submuestra	28
CAPITULO II	Materiales y métodos	
2.1	Materiales	32
2.2	Reactivos	33
2.3	Trabajos personales	34
2.4	Cuantificación de aflatoxinas por método Aflatest	35
2.5	Cuantificación de aflatoxinas por método de Cromatografía en Capa Fina	39
CAPITULO III	Resultados	
3.1	Reporte de resultados	44
	Gráficas	47
3.2	Discusión de resultados	59
	Gráficas	61
CAPITULO IV	Conclusiones	62
	Anexo	64
	Bibliografía	65

1.1 Semilla de Cacahuate:

El cacahuate es una semilla oleaginosa que en el mercado nacional presenta una gran demanda debido a su alto aporte energético y calidad nutricia. (12)

El cacahuate como materia prima puede verse expuesto a ciertas contaminaciones de tipo fúngico, desde su cultivo, cosecha y/o almacenamiento ya sea en bodega ó en planta industrial.

Dentro de éste tipo de contaminaciones se encuentra la producida por los hongos del género *Aspergillus flavus*, el cual produce toxinas conocidas como Aflatoxinas, siendo además una de las más peligrosas debido a sus propiedades hepatogénicas, mutagénicas y cancerígenas para los animales e inclusive para los seres humanos.

CACAHUATE

El cacahuate es un fruto ó semilla que pertenece a la familia de las leguminosas cuyo nombre científico es *Arachis hypogaea* contiene vainas de 0.5 a 3 pulgadas de largo de forma cilíndrica. El grano se forma por dos cotiledones y un gérmen envueltos en una cascarilla delgada de color rojo-café.

Los granos de cacahuate contienen:

- 72.4 % de cotiledones
- 4.1 % de cascarilla
- 3.3 % de gérmen

Los granos de cacahuate tienen pesos aproximadamente iguales de componentes grasos y no grasos.

Tabla 1: Composición química del cacahuate:

COMPONENTE	RANGO (%)	PROMEDIO (%)
HUMEDAD	3.9 - 13.2	5.0
PROTEINA	21.0 - 36.4	28.5
LIPIDOS	35.8 - 54.2	47.5
FIBRA CRUDA	1.2 - 4.3	2.8
EXTRACTO LIBRE DE NITROGENO	6.0 - 24.9	13.3
CENIZAS	1.8 - 3.1	2.9
AZUCARES REDUCTORES	0.1 - 0.3	0.2
AZUCARES NO REDUCTORES	1.9 - 5.2	4.5
ALMIDON	1.0 - 5.3	4.0
PENTOSAS	2.2 - 2.7	2.5

Las diferencias en el contenido de nutrientes dependen del tipo de variedad y de la calidad de los granos (genética, manipulación, zootécnica, etc).

Gran parte de los constituyentes grasos están contenidos en los cotiledones, algunos en los gérmenes y una pequeña porción en la cascarilla.

El cacahuate deseable es aquel que se encuentra maduro, que presenta un tamaño uniforme y con un mínimo de granos arrugados o marchitos, debe estar exento de sabores indeseables, de textura fuerte y de restos de cáscaras, ya que en caso contrario el proceso de limpieza o de almacenamiento es inadecuado.

Durante la manufactura de crema de cacahuate, el color y sabor del cacahuate puede ser seriamente dañados. El control de calidad comienza en la siembra y sigue a través de la limpieza, descascarado, almacenamiento y manufactura.

1.2 Requerimientos de almacenamiento:

El cacahuete destinado al almacenamiento, debe estar exento de hongos, insectos, rancidez y malos olores.

Debe presentar el color adecuado que confirme las características de la variedad.

La vida de almacenamiento comienza en el campo, incluyendo tiempo de permanencia, temperatura del medio, método de limpieza, estado de maduración.

Temperatura:

Debe ser baja, ya que a 21 °C las semillas de cacahuete están sujetas a la infestación de insectos, a formar color ambar y a la rancidez. Entre 0 - 2 °C la vida de almacén se alarga hasta 2 años; a temperaturas menores de 0 °C se alarga hasta 5 años y es posible que permanezcan hasta 10 años. (21)

Humedad relativa:

La humedad es la causa más común del deterioro del grano de cacahuete; por lo que se debe tener cuidado de mantener niveles bajos, una humedad de cerca del 70 % condiciona la susceptibilidad a la invasión por hongos, además el cacahuete puede perder peso.

Atmósfera:

La atmósfera debe estar exenta de olores y presentar buena circulación ya que los cacahuates absorben olores y sabores del medio. Imperfecciones en el empaque, permiten que los olores procedentes de las bodegas del almacén se absorban, resultando en el cacahuete sabores, olores y colores extraños.

1.3 Productos elaborados:

La crema de cacahuete es sólo uno de los productos cuya base principal es el cacahuete, dentro del mercado nacional la crema de cacahuete presenta una gran demanda sobre todo de niños y jóvenes siendo estas poblaciones las más expuestas, por esto se hace necesario contar con materias primas libres de toxinas y de excelente calidad no sólo nutricia sino libres de cualquier tipo de contaminantes fúngicos.

Crema de Cacahuete:

La crema de cacahuete en nuestro país es el producto terminado más usado en confitería. Esta tiene un alto valor nutritivo debido a su alto contenido de proteínas y a su gran palatabilidad.

Anteriormente el único uso de este producto era en sandwich, sin embargo hoy en día se utiliza en la elaboración de dulces, pasteles, galletas, helados, entre otros. (5)

Manufactura de Crema de Cacahuete:

El proceso de elaboración de la crema de cacahuete es relativamente simple, consiste en el descascarillado, tostado y descorazonado del cacahuete seguido de una molienda en la que se le adiciona sal para resaltar el sabor, pequeñas cantidades de otros materiales como grasa oxigenada y usualmente se puede agregar dextrosa.

Por regulación federal la crema de cacahuete comercial no es más que el descascarado, tostado del cacahuete, seleccionado y mezclado con sal, saborizantes y emulsificantes, el 90% de la crema de cacahuete es cacahuete. Las cantidades de otros ingredientes pueden variar siempre que no sobrepasen del 10 % del total de componentes de la crema. No se permita el uso de saborizantes artificiales, conservadores químicos, colores naturales o artificiales no la adición de vitaminas o minerales.

En ocasiones se agrega glicerina con el objeto de evitar la separación de la parte oleosa, lecitina u otros antioxidantes para el control de la rancidez y algunos ingredientes secretos.

La crema se puede elaborar con cualquier variedad de cacahuate. Se considera que una mezcla de dos partes de Runner con una parte de Virginia proporciona la mejor consistencia.

Los cacahuates son mezclados en proporciones adecuadas al momento de alimentar al molino. La temperatura durante la molienda se controla ya que repercute en la calidad del producto, en el sabor y vida de anaquel.

En un intento por tener crema de cacahuate que difiera en el color, sabor y textura algunos fabricantes incluyen diferentes tipos de cacahuate, otras adicionan sabores como malta, naranja, jamón y queso.

Geib (1941) describe el proceso de elaboración de crema de cacahuate en cinco etapas:

- 1.- Descascarado
- 2.- Tostado
- 3.- Seleccionado
- 4.- Molienda
- 5.- Mezcla

Como aditivos alimentarios son utilizadas pequeñas cantidades de aceites vegetales hidrógenados como emulsificantes, y son adicionados para prevenir la separación del aceite y hacer un producto de fácil untabilidad. El contenido graso incluye el aceite natural de cacahuate que no debe exceder de 55 %.

Tostado de Cacahuates: Los cacahuates son tostados. Para lo cual se cuenta con dos tipos de proceso, "batch" y continuos.

Una mantequilla de cacahuete puede ser elaborada con distintas variedades de cacahuates, las cuales son tostadas separadamente.

Frecuentemente los cacahuates provienen de lotes cuyos contenidos de humedad son distintos, por lo que requieren de atención especial durante el tostado, siendo más satisfactorio este proceso "batch" que en continuos.

Durante el proceso de tostado por "batch", los cacahuates entran en lotes de 400 kilogramos a una revolvedora en la que la temperatura alcanza 200 °C aproximadamente. Los cacahuates alcanzan una temperatura de 80°C la cual se mantiene durante un lapso de 40-60 minutos, obteniendo un tostado uniforme y por lo tanto satisfactorio. Las altas temperaturas son indeseables en el tostado, por lo que es necesario controlarlas.

El primer efecto del tostado es el rápido secado, en el cual el contenido de agua del grano es reducido entre 0.5 % a un 5 %.

Para improvisar una transferencia de calor y una extracción del agua y de los compuestos volátiles del cacahuete, es necesario que en los hornos de tostado se implemente un dispositivo que permita tener al grano en constante movimiento, obteniéndose de ésta forma un tostado uniforme, ya que provoca que el aire caliente rodee a cada grano.

El tiempo de tostado es el factor más importante que afecta el color del producto. La humedad es proporcionalmente baja al incrementar el oscurecimiento del grano.

En un análisis realizado a diferentes muestras de mantequilla de cacahuete, se encontró que el tostado de los cacahuates realizado a distintas condiciones afecta en el contenido de tiamina, ya que ésta

disminuye cuando el tostado aumenta. Un tostado claro permite que los cacahuates retengan alrededor del 14% de la tiamina original; en un tostado medio se logra retener un poco menos, en un tostado oscuro la cantidad de tiamina retenida es menor al 10 % y en un tostado intenso se retiene menos del 3%. Consecuentemente el color es un indicador visual del grado de tostado e indirectamente de la pérdida de tiamina.

Morris y Freeman (1954) determinaron que la crema elaborada a partir de cacahuates tostados medianamente, presenta un sabor desagradable comparado con la crema elaborada con cacahuates sometidos a un tostado más intenso.

En los granos de cacahuates tostados se determinó un contenido de aceite mayor (47.9%) que el correspondiente al grano crudo (47.4%); la diferencia resulta +-0.5 % de la pérdida de humedad y componentes volátiles durante el tostado.

La piel o cascarilla que envuelve a los granos contiene una pequeña porción de aceite, pero cuando ésta se separa del grano tostado su contenido de aceite es del 27 %. Esto se debe a que la cascarilla absorbe aceite del cotiledón durante el tostado.

El calor es removido de los granos que son sometidos al tostado tan rápido como sea posible para detenerlo en un punto determinado con el objeto de lograr un producto uniforme. Los cacahuates calientes pasan del tostador a una cilindro metálico perforado ó a una cámara fría en donde un volumen de aire es aplicado a través de la masa utilizando ventiladores. Los enfriadores son diseñados para que el aire sea distribuido a través de toda la masa uniformemente.

Posteriormente se realiza una inspección y selección. Los cacahuates descoloridos o quemados se seleccionan por medio de un ojo electrónico. Las partículas metálicas son retiradas a base de imanes. Las partículas ligeras se remueven aplicando corrientes de

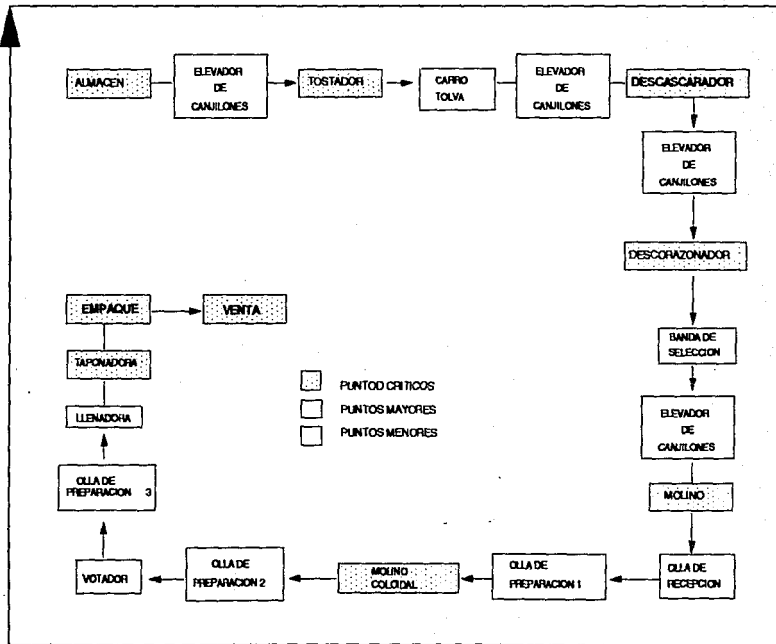
aire. Otras partículas como piedras se retiran por medio de tamices. La inspección del cacahuate y la separación de partículas extrañas, granos dañados (quemados, rotos) se realiza de mejor manera utilizando bandas transportadoras.

La crema de cacahuate es obtenida por medio de dos operaciones de molienda, la primera reduce los granos a partículas medias y la segunda a partículas finas.

Para la molienda fina, el espacio entre los platos debe ser 0.032 a 0.003 in. Se adiciona aproximadamente el 2 % de sal y otros ingredientes al molino junto con los cacahuates. El calor generado durante la molienda favorece el fundido de la grasa hidrógenada, o bien la grasa debe ser derretida previamente. Las moliendas deberán ser constantes para asegurar una molienda uniforme y proteger al producto de burbujas de aire.

El calor generado por la molienda y el mezclado debe ser removido inmediatamente para asegurar la cristalización, se puede ayudar con el uso de votadores, que son intercambiadores de calor utilizados para enfriar la crema de cacahuate de 40 a 32 °C antes de su empaque.

DIAGRAMA: 1 ELABORACION DE CREMA DE CACAHUATE



1.4 GENERALIDADES SOBRE MICOTOXINAS

Las micotoxinas constituyen un grupo de compuestos químicos tóxicos producidos por algunas cepas de hongos, crecen en una vasta variedad de sustratos bajo condiciones favorables, estas toxinas causan una enfermedad conocida como micotoxicosis.

La contaminación de alimentos por hongos es un fenómeno muy frecuente en virtud de que las esporas de estos microorganismos se encuentra ampliamente distribuidos en el ambiente lo que provoca una rápida y fácil contaminación. (Morales 1975).

Los alimentos más susceptibles para el desarrollo de hongos son los granos y semillas oleaginosas , frutas y verduras, lo que implica pérdidas totales en la producción mundial de alimentos que son difíciles de cuantificar, sin embargo datos estimativos demuestran un 2 % sobre la producción mundial de granos en países tropicales y subtropicales las pérdidas se evalúan en ocasiones hasta en un 45 % (Unidad de Investigación en Granos y Semillas 1991).

Debido a que existe una gran flora fúngica, la materia prima es susceptible de contaminación y de desarrollar hongos en alguna etapa de su desarrollo, durante la cosecha, el almacenamiento, transporte o durante su proceso.

Los granos tienen en el momento de almacenarse cantidades variables de esporas de hongos que son adquiridas naturalmente en el campo en donde se cosecharon, a estos hongos se les llama Hongos de Campo mientras que aquellos que invaden el grano durante el transporte y almacenamiento se les llama Hongos de Almacén.

Generalmente los hongos de almacén no invaden los granos antes de la cosecha pero pueden encontrarse en la semilla en porcentajes tan bajos como un 1 % proporcionando el inóculo de los hongos de almacén.

En el caso de cereales y oleaginosas los hongos que contaminan este tipo de alimentos de acuerdo a la forma de invasión y del crecimiento del hongo pueden ser:

- 1) Hongos de campo
- 2) Hongos de almacén.
- 3) Hongos de pudrición avanzada

El desarrollo del hongo de almacén en los granos causan diferentes tipos de daños siendo los principales la pérdida de germinación de las semillas, ennegrecimiento ó manchado del grano, calentamiento, producción de toxinas y la demeritación en la calidad y en ocasiones la destrucción completa del producto.

El contenido de humedad del grano, vialidad, estado físico, temperatura, tiempo de almacenamiento, y la presencia de insectos son los factores que determinan la iniciación y magnitud de la contaminación. (Anderson 1975).

La conservación adecuada de los granos almacenados en cualquier parte del mundo depende esencialmente de la ecología de la región considerada, de las condiciones higiénicas de la bodega ó almacén disponible, del tipo y calidad del grano por almacenar y el tiempo de almacenamiento.

Durante las últimas décadas se ha dado gran atención al significado real o potencial de los alimentos que pueden tener compuestos tóxicos producidos por contaminantes fúngicos. A estos compuestos se les dió el nombre de micotoxinas, las que comprenden un grupo de compuestos químicos presentes en la naturaleza y diversas actividades biológicas.

Desde el primer descubrimiento de las micotoxinas y a través de los años han encontrado toxinas importantes que afectan al hombre y a los animales. Posteriormente se han identificado y aislado diferentes tipos de compuestos tóxicos asociados con el crecimiento

de hongos sin que exista relación con enfermedades. (26)

Las condiciones ecológicas que prevalecen en el campo en las cuales se ha comprobado la relación: toxina igual a enfermedad son más limitadas que aquellas con un crecimiento general de los hongos, lo que sugiere que el crecimiento acelerado del hongo aumenta la producción de las toxinas, además existe una relación directamente proporcional entre el crecimiento retardado y la producción de toxina, esta producción cesa en un momento dado en virtud de que se metabolizan más rápidamente de lo que se producen.

Entre las toxinas fúngicas identificadas hasta el momento se encuentran: zeralenona, citrinina, patulina, ácido pencílico, ocratoxina, esterigmatocistina, aflatoxinas, vomitoxina.

1.5 AFLATOXINAS

Las aflatoxinas se descubrieron en Inglaterra en 1961 a raíz de la muerte de más de cien mil pavos alimentados con comida a base de cacahuate importado de Brasil dando lugar a investigaciones que permitieron aislar al hongo *Aspergillus flavus*. Se observó que este hongo producía toxinas al crecer en las semillas de cacahuate, toxinas que fueron llamadas Aflatoxinas y que constituyen el grupo de compuestos carcinogénicos más potente conocido actualmente.

Las aflatoxinas son toxinas naturales de origen fúngico que han demostrado su peligrosidad como agentes causales de alteraciones y cuadros patológicos que pueden afectar a los animales y al hombre mismo.

La posible contaminación de ciertos alimentos de consumo humano con Aflatoxinas ha suscitado la preocupación de las autoridades sanitarias de los distintos países, como queda reflejado, entre otras medidas por la formulación de legislaciones específicas que limitan el grado de exposición de la población a las Aflatoxinas. (8)
Los hongos de almacén pertenecen principalmente a las especies de

Aspergillus y *Penicillium*. Estos hongos no invaden en forma significativa a los productos agrícolas antes de la cosecha sino a los diferentes graneros o silos de almacenamiento en donde las condiciones ambientales favorecen su desarrollo.

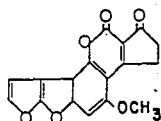
Las Aflatoxinas pueden aparecer antes, durante ó después de la cosecha teniendo una mayor incidencia una vez levantada la cosecha. Un grano dañado mecánicamente ó por insectos es más susceptible a un ataque por hongos particularmente de *Aspergillus*. La producción de aflatoxinas se presenta aproximadamente después de 30 días de haberse desarrollado el hongo.

La producción de aflatoxinas requiere una Actividad de agua (Aw) de 0.8 con una humedad relativa de 85 % con un rango de temperatura entre 3 hasta 25 °C, valores ideales para una máxima producción de toxina. (19).

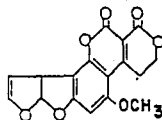
El avance de las técnicas analíticas ha hecho posible el aislamiento e identificación de estas sustancias en casi todos los alimentos. Las principales aflatoxinas son B1, B2, G1 y G2 aislados a partir de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*. (17)

Las aflatoxinas se han convertido en uno de los metabolitos biológicamente más activos a nivel molecular. La manifestación toxicológica de la ingestión de aflatoxinas depende del balance entre la asimilación hepatocelular, el grado y tipo de metabolismo hepático, la cinética, absorción y distribución dentro del cuerpo de la toxina entre otros.

TABLA 2:
FORMULAS DE LAS AFLATOXINAS



B1



G1



B2



M1



G2



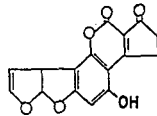
G2 α



M2



B2 α



P1

La toxicidad producida por las aflatoxinas puede ser de tipo agudo ó crónico la cual depende de numerosos factores:

- Edad
- Estado de salud del individuo
- Sexo
- Composición de la dieta
- Vía de administración
- Condiciones del medio ambiente
- Hábitos alimenticios
- Dosis letal media (DL₅₀)

Las lesiones primarias causadas por la ingesta de estas toxinas se presentan a nivel hepático, que consiste en una hiperplasia del ducto biliar, mitosis hepática. Otro efecto de las aflatoxinas es su acción anticoagulante.

Además de ser potentes venenos, las aflatoxinas también son potentes carcinógenos, estos fueron observados por primera vez en 1961 en animales de laboratorio los que después de recibir la dietas que incluían 20 % de pasta de cacahuete contaminada, el 82 % desarrollaron hepatomas al igual que otras sustancias inductoras de la reparación y síntesis de DNA o sea la síntesis adicional de DNA necesario para reemplazar el DNA por carcinógenos. Suprime además la síntesis del RNA mensajero (RNA m). (24)

Los factores ambientales que más determinan la producción de aflatoxinas son: temperatura, pH, humedad del sustrato y humedad relativa. (Ver tabla 3). Se conoce que la producción de aflatoxinas se presenta preferentemente en países de clima tropical (húmedos y calientes).

TABLA 3. Factores que afectan la producción de aflatoxinas.

FACTOR	CRECIMIENTO FUNGICO	PRODUCCION AFLATOXINA	VALORES DE SEGURIDAD EN ALMACENAMIENTO.
pH	1.5 - 8.5	0.2	-
Temperatura	>4 -43 °C (37 °C)	12 - 41 (28)	10
Hum.Sustrato	> 12 %	17.5 (>80)	12 %
Hum.Relativa	70 %	83 (98 %)	65

() Valores óptimos

Burdaspal 1978.

Las aflatoxinas químicamente son un grupo de metabolitos de bisfuranocumarinas producidas por algunas cepas de *A.flavus* y *A.parasiticus*. Son cumarinas sustituidas con anillos de bifurano y configuración tipo lactona. (Ver diagrama 1)

A.flavus es un hongo de vida saprófita que produce esporas de color azul-verdoso, las especies *A.flavus*, *A.parasiticus*, *A.tamarii* y *A.oryzae* se encuentran comunmente asociados a los granos, sin embargo sólo las 2 primeras son capaces de producir metabolitos tóxicos. (Wilson 1968)

La toxicidad y otros efectos biológicos causados por las aflatoxinas se atribuyen a las alteraciones bioquímicas, se sabe que las alteraciones principales son a nivel de metabolismo de proteínas y de ácidos nucleicos (RNA, DNA).

NIVEL DE AFLATOXINAS PERMITIDO PARA ANIMALES

CONCENTRACION

ORGANISMOS

10 - 50 mcg/kg

Comunidad Económica Europea

30 mcg/kg

Organización Mundial de la Salud

20 mcg/kg

Administración Federal de Drogas (FDA)

Un método rápido para identificación de aflatoxinas presentes en alimentos (granos y subproductos) es a través de su fluorescencia. La actividad tóxica de compuestos fluorescentes presentes en harina de cacahuate contaminada fué identificada con un sistema analítico innovador. Se caracterizaron 4 compuestos químicos bastante interrelacionados que fueron llamados de manera genérica "Aflatoxina" con las letras B para la azul, del inglés Blue y G para la verde del inglés Green y los subíndices 1 y 2 para cada molécula químicamente relativa a su movilidad cromatográfica (Zumber y col 1987).

La identificación de los diferentes tipos de aflatoxinas requiere de la extracción de la toxina mediante el uso de solventes tales como el cloroformo, con la separación posterior por cromatografía en capa fina con una mezcla de disolvente al 5 % de metanol en cloroformo y lectura con luz ultravioleta (uv) de onda larga 366 nm.

Métodos de análisis de aflatoxinas:

Existen diversas técnicas para la cuantificación de aflatoxinas, todas se basan en la propiedad que presentan las aflatoxinas de fluorescencia, en México se utilizan diversos métodos analíticos entre los cuales destacan:

- Cromatografía en capa fina (CB)
- Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).
- Inmunoenzimáticos: Agri-Screen (ELISA) y Aflatest
- Minicolumnas: Romer, Holludav-Velasco. etc.
- Combinados.: (CB)+(HPLC); Aflatest + (HPLC), etc.

El método inmunoenzimático Aflatest es un método rápido y aceptado por la Federal Grain Inspection Service (FGIS).

Se ha comprobado que mientras el muestreo sea representativo y el análisis cuidadosamente realizado aún por diversos métodos analíticos la posibilidad de variación se encuentra en el rango de ug/kg (ppb).

Tabla 4 METODOS DE ANALISIS

QUIMICOS:

- CROMATOGRAFIA EN COLUMNA (CC)
- PLACA FINA (CCF)
- CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA PRESION (HPLC)
- AFLATEST (COLUMNAS DE AFINIDAD)

BIOLOGICO: IN VIVO

- TRUCHA ARCOIRIS
- EMBRION DE PATO
- EMBRION DE POLLO
- INMUNO ENSAYO (EN CONEJO, MONO. ETC)

Tabla 5. Propiedades de las aflatoxinas.

TIPO	Rf(cm)	FORMULA	DL 50 (mg/kg) POLLOS/7 DIAS
B1	0.56	C17 H12 O6	0.36
B2	0.53	C17 H14 O6	1.80
G1	0.48	C17 H12 O7	0.79
G2	0.46	C17 H14 O7	3.45

En los alimentos contaminados, normalmente las aflatoxinas que predominan son las aflatoxinas B1 y B2 y en raras ocasiones se presentan las 4 toxinas. La dosis letal varia en cada caso siendo la aflatoxina B1 la más tóxica (0.5 a 20 mg/kg de peso corporal).

El envenenamiento agudo con aflatoxinas causa necrosis hepática, trastornos de la función hepática y extensas lesiones hemorrágicas que dan por resultado la muerte.

Debido a su toxicidad se recomienda al personal que trabaja con aflatoxinas el uso de mascarillas, guantes y batas desechables que puedan ser incineradas posteriormente.

Se ha observado que cultivos de *A. flavus* y *A. parasiticus* producen la máxima cantidad de aflatoxinas después de 5 a 9 días de incubación dependiendo de las condiciones ambientales. Una incubación prolongada estará siempre acompañada por un detrimento en la concentración de aflatoxina presente. Esto se debe a la formación y posterior degradación del micelio propio del hongo.

La infección del cacahuate con hongos toxigénicos puede ocurrir desde el cultivo ó durante las operaciones de recolección, secado, manipulación y almacenamiento.

A pesar de que el cacahuate puede verse invadido por *A.flavus* cuando se cultiva en suelos húmedos, la sequía parece favorecer la infección por hongos y la producción de aflatoxinas.

En varios países se esta tratando de explorar las posibilidades de desarrollo de nuevas variedades de cacahuate resistentes a la producción de *A.flavus* y a la formación de su toxina.

El secado es una fase esencial para la conservación de los granos contra el ataque de los hongos. Es conocido que inmediatamente después de la recolección las semillas oleaginosas contienen a menudo elevados porcentajes de humedad para un buen almacenamiento.

El ataque por hongos e insectos al grano durante el almacenamiento se deben evitar siguiendo algunos principios como son: acondicionamiento del producto a almacenar en un medio estable, en que la respiración de las semillas y de los microorganismos relacionados se reduzcan al mínimo, lo cual se consigue cuando el contenido de humedad de la semilla y del ambiente se reduce a niveles bajos.

El producto debe colocarse en un recipiente que mantenga condiciones adecuadas de humedad para impedir la entrada de insectos y plagas.

El grano debe ser accesible a todo lo largo del periodo de almacenamiento para poder proceder a tratamientos adicionales en caso necesario.

1.6 TECNICAS DE MUESTREO

Es difícil determinar la concentración de aflatoxinas en grandes cantidades de granos, debido a que existe una gran variabilidad asociada con la procedencia del testigo.

Existen diversos métodos para la cuantificación de aflatoxinas, la exactitud de estos métodos en cuanto a la detección de toxinas depende del tipo de muestreo, debe recordarse que las toxinas no se distribuyen uniformemente en los cereales cuando se encuentran en el campo, ni en ningún tipo de instalaciones de almacenamiento.

Ciertos granos pueden contaminarse considerablemente con micotoxinas y poseer niveles altos de las mismas en un lote de cereales completo.

Se ha informado que el error en la detección de las micotoxinas en los cereales puede llegar hasta un 88 % debido al muestreo inicial. Este porcentaje de error puede reducirse tomando múltiples muestras de mayor volumen, al analizar un suministro de cereales.

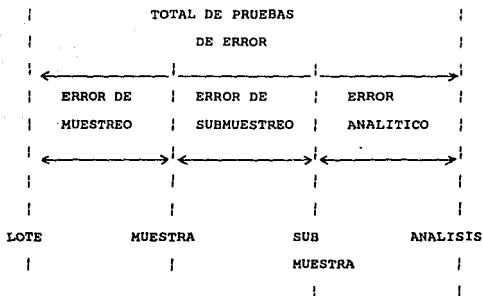
Por lo que a esto se han realizado algunas recomendaciones para el análisis de micotoxinas como son: la toma de muestras pequeña durante intervalos periódicos de un flujo de cereal. Estas muestras (5 kg aprox.) deberán combinarse, molerse hasta que se conviertan en granos finos para dividirse y obtener una submuestra de 300 g aproximadamente.

Si existe la necesidad de mandar muestras sospechosas a otras instalaciones para realizar un análisis de micotoxinas las mismas

deberán secarse hasta un 12 a 13 % de humedad y enviarlas en bolsas de papel inmediatamente, si no se utilizan puede desarrollarse hongos cuando se envía en bolsas de plástico o con un alto contenido de humedad.

Es conocido que existen errores asociados en cada uno de los procedimientos del muestreo, lo cual provoca que la concentración verdadera de aflatoxinas no pueda determinarse en un 100 % en una muestra tomada de un mismo lote (ver figura 1).

Fig.1 Fuente de error en Análisis de Aflatoxinas.
Variación de valores de pruebas.



Whitaker y col. 1981 demostraron que existe variabilidad en muestras de tamaño pequeño que son fuente de graves errores. El error de muestreo es más grande debido a que la aflatoxina puede encontrarse sólo en pequeños porcentajes del grano del lote (menor al 1%) sin embargo la concentración en el grano puede ser extremadamente alta.

1.7 Variabilidad en la Submuestra:

Una vez extraída la muestra de un lote, ésta puede ser preparada para la extracción de aflatoxinas, es esencial que la muestra completa sea molida antes de tomar la submuestra, si no se realiza un mezclado previo no hay beneficios de tomar una muestra grande del producto granular. Sabiendo que la distribución de partículas contaminadas de la muestra es semejante a la distribución de granos contaminados en el lote. El resultado debe ser repetitivo en las submuestras tomadas en una misma muestra.

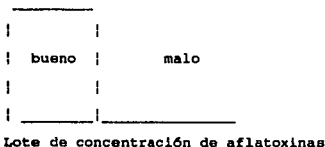
1.8 Variabilidad de Análisis.

Con la submuestra se hace la extracción por el método AOAC (Association of Official Analytical Chemists) éste método consiste en la extracción con un solvente, centrifugación, dilución y cuantificación. En el resultado final existe variación considerable en la cantidad de análisis replicados en extracto de submuestras por cada método BF y CB existe un error asociado.

La curva de aceptación asociada con un plan de ensayo perfecto se presenta en la figura 2, cuando la probabilidad de aceptación de un lote bueno es del 100 % y la probabilidad de aceptación de un lote malo es cero.

El porcentaje de lotes aceptados por un plan de ensayo perfecto esta en función de la concentración en el lote.

Fig.2 Curva de aceptación.



Los riesgos de aceptación de los diferentes lotes se muestran en la figura 3 ya que existe la posibilidad de aceptar un lote malo por bueno y dar uno bueno por malo.

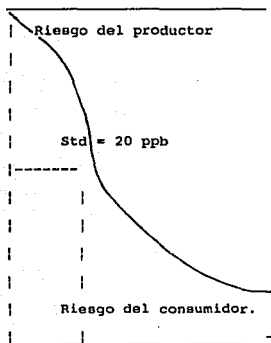


Fig 3.

Riesgos de Aceptación
Forma típica de curva de aceptación. Muestra los riesgos del consumidor y productor.

Un estudio sobre el programa de riesgos asociados con las pruebas puede ser evaluado y minimizado.

El efecto que experimenta el tamaño de la muestra se presenta en la figura 4.

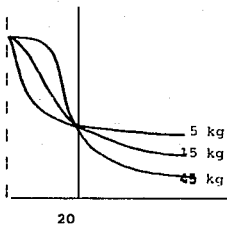


Fig.4

Entre menor sea el tamaño de muestra aumenta el riesgo de aprobar un lote malo por bueno, aumentando el riesgo para el consumidor.

La curva de aceptación de 3 estrategias de muestreo cada uno con diferente nivel de aceptación, así como disminuye el nivel de aceptación, el resultado es una disminución de riesgo para el consumidor. (fig 5)

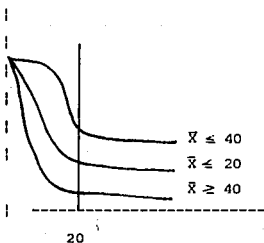


Fig.5

El efecto de aceptación al cambiar el nivel, esta asociado con el riesgo al productor y al consumidor.

Whitaker y col (1979) desarrollaron métodos de predicción de riesgos para el consumidor y el productor, el número total de lotes aceptados y rechazados, la cantidad de aflatoxinas en los lotes rechazados y el costo asociado con la estrategia de muestreo. Estos estudios pueden ser utilizados en la industria del cacahuate para proponer una estrategia de muestreo para el análisis de aflatoxinas.

CAPITULO II MATERIALES Y METODOS

2.1 MATERIAL

Matraz Erlenmeyer de 250 ml
Matraces Erlenmeyer de 500 ml
Kitasato 1000 ml
Vaso de precipitado de 100 ml
Vasos de precipitado de 400 ml y 250 ml
Probeta de 50 y 100 ml
Pipetas de 10 ml
Jeringa de 10 ml
Jeringa de 1 ml graduada.
Micropipetas variable de 100 microlitros
Microjeringa 10 microlitros
Vidrio de reloj
Embudo buchner
Alargadera
Embudo de separación 500 ml
Embudo estriado de 8 cm de diámetro.
Frascos viales de 10 ml
Tubos de borosilicato de 15 ml
Agitador magnético
Parrilla
Papel filtro Whatman No.1 y 41
Fluorometro Aflatest
Patrones de aflatoxinas B1, B2, G1.
Columna para cromatografía de 40 cm largo x 2 cm .
Placa para cromatografía 20 x 20 cm de sílica gel
Cámara de vidrio
Soporte para placas

Soporte Universal con aro.
Pinzas para bureta
Horno
Balanza granataria con sensibilidad de ± 0.1 g
Baño de vapor.
Bastidor para aplicar.
Gabinete para placas.
Estufa.
Lámpara de luz Ultravioleta.
Aplicador.
Licuadora

2.2 REACTIVOS

Acetona al 70 %
Acetona al 20 %
Sol. acetato de plomo al 20 %
Cloruro de sodio
Metanol (MeOH)
Agua destilada
Metanol grado HPLC
Solución reveladora de bromo al 0.02%
Acido acético glacial
Metanol
Eter etílico anhidro
Mezcla de disolventes (cloroformo-metanol (97:3))
Sulfato de sodio anhidro granular
Adsorbil No.1 para cromatografía en capa fina
Silica gel para cromatografía en columna 0.05-0.2 mm
Patrones de aflatoxinas: Alfa B1, Alfa B2, Alfa G1, Alfa G2
Celita analítica
Columna Aflatest (kit)

2.3 TRABAJOS PERSONALES

Se seleccionaron dos variedades de cacahuete: Flor Runer y Virginia por ser las variedades más frecuentes en la ciudad de México, utilizando las mismas condiciones de almacenamiento en ambas.

Cada análisis se realizó por triplicado reportando el valor promedio.

Las condiciones de trabajo utilizadas como variables independientes: tiempo, temperatura y humedad.

El Tiempo seleccionado fue de 90 días por ser el tiempo máximo de almacenamiento durante la producción de crema de cacahuete.

Las temperaturas seleccionadas son las siguientes:

25 ° C (medio ambiente)

32 ° C Temperatura que puede alcanzar durante el almacenamiento en un local cerrado, sin aereación alguna.

52 ° C Temperatura crítica.

La humedad constante (aproximadamente del 23- 25 %).

Como variable dependiente la concentración.

Para el análisis de aflatoxinas se seleccionaron 2 métodos de extracción: Cromatografía en capa fina y el de Aflatest

2.4 Método Aflatest para análisis de Cacahuete

Preparación de muestra:

Examinar la muestra y separar cualquier material extraño, cuartear la muestra en 2 kg aproximadamente, volver a cuartear hasta dejar 300 g de muestra, extender el cacahuete sobre una superficie limpia, quitar la cascarilla y molerlos.

(Recomendada por el proveedor para semillas de cacahuete y nuez)
Aflatest es un método cuantitativo rápido, comparable al de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC) seguro y de bajo costo. Se basa en una columna de afinidad que contiene un anticuerpo monoclonal altamente específico para aflatoxinas.

En el método se realiza una extracción con metanol al 80 %, una filtración gravimétrica con papel filtro, y la retención de aflatoxina en la columna. La lectura se hace mediante fluorometría. El método está aprobado por la Federal Drugs Administration (FDA) y por la FGIS, Association of Official Analytical Chemists (AOAC), por los ministros de Salud Pública en México y América Latina.

Pesar 25 g de cacahuete con 5 g de NaCl y 125 ml de metanol al 60 %.
Licuar durante 1 min a alta velocidad (1000 rpm).

Filtrar 50 ml a través de papel filtro Whatman del No.1, y coleccionar 50 ml del filtrado.

Tomar 10 ml del filtrado y añadir 125 ml de agua destilada.

Filtrar a través de papel filtro Whatman del No. 41

Ensamblar la columna de Aflatest a una jeringa de 10 ml. Sin quitar la tapa.

Agregar 10 ml del filtrado

Destapar la columna y empuje el émbolo de modo que el flujo sea de 2 gotas por segundo.

Enjuagar 2 veces con 10 ml de agua destilada.

Colocar el tubo de borosilicato bajo la jeringa de vidrio.

Agregar 1 ml de metanol HPLC en la jeringa, recibir en el tubo.
Adicionar 1 ml de la sustancia reveladora de Bromo al 0.02% directamente en el tubo.

Lectura en el fluorometro.

La lectura es lineal de 0 a 50 ppb y tiene una exactitud de +/- 2ppb.

Se calibra perfectamente utilizando los patrones de 0, 26 y 13 ppb.

Diagrama 2: metodología en la determinación de aflatoxinas por el técnica Aflatest.

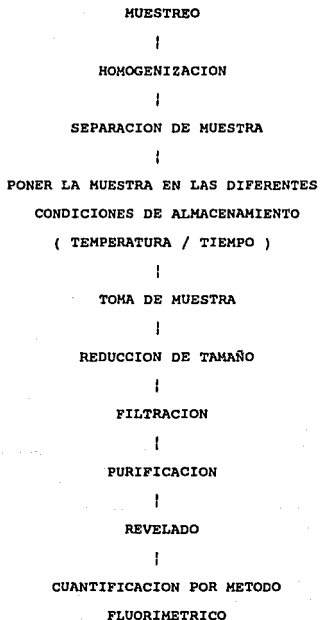
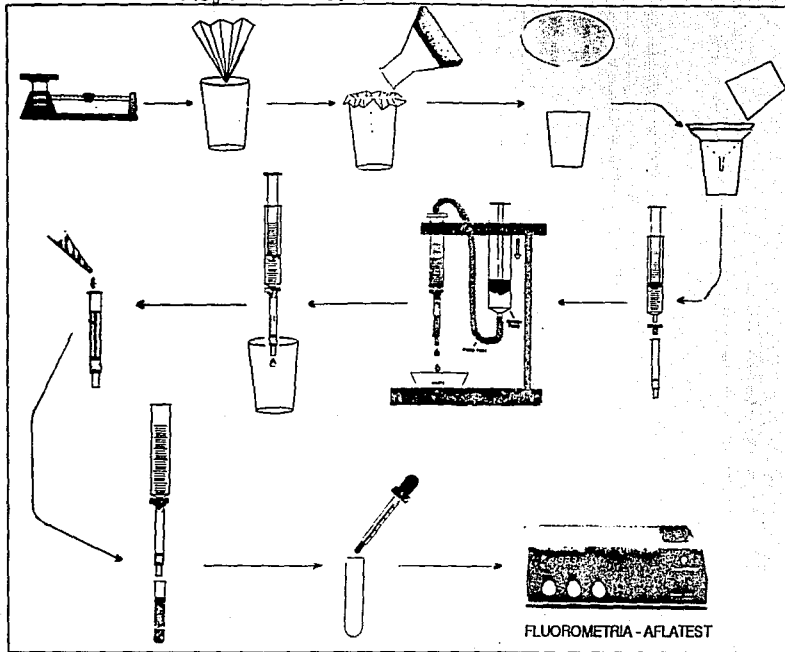


Diagrama 3 Método Aflatest



2.5 Método Cromatografía en Capa Fina

Extracción de aflatoxinas:

Pesar 50 g de muestra en un matraz Erlenmeyer de 500 ml, cubrir el fondo con perlas de vidrio, agregar 250 ml de acetona al 70 %, tapar el matraz con un tapón de polietileno o de vidrio. Colocar el Erlenmeyer en un agitador mecánico filtrar durante 30 minutos a través de papel filtro Whatman No. 4 previamente colocado en el embudo estriado, cubrir el embudo con un vidrio de reloj para evitar la evaporación, recoger el filtrado en un vaso de 400 ml.

Preparación del Extracto:

Medir 150 ml del filtrado, añadir 60 ml de agua destilada y 20 ml de acetato de plomo. Agregar 5 trozos de porcelana, evaporar hasta reducir el volumen 150 ml. Enfriar hasta temperatura ambiente. Agregar 3-4 g de celita, agitar y filtrar al vacío sobre papel filtro (Whatman No. 2) impregnado de acetona al 20 %, lavar el filtrado 2 veces con 20 ml de acetona al 20 % cada vez enjuagando el vaso pasar el filtrado al embudo de separación de 500 ml.

Enjuagar el kitasato con 20 ml de acetona al 20 % y pasarlos al embudo. Añadir 50 ml de cloroformo y agitar durante un minuto, destapar y esperar la separación de 2 capas, recoger la inferior en un vaso de 250 ml.

Añadir 50 ml de cloroformo y repetir la operación. Evaporar hasta un volumen de 2-3 ml, transferir el extracto a través de la columna cromatográfica

Enjuagar el vaso de 250 ml (2 veces con 5 ml de cloroformo). Agregar 100 ml de éter anhidro a la columna, una vez filtrado el éter añadir 50 ml de la mezcla cloroformo-metanol (97-3 v/v) y recogerlo en un vaso de 250 ml. Evaporar hasta obtener un volumen de 2 ml.

Transferir este extracto a la ampollita y lavar al mismo tiempo el vaso con 1 ml de cloroformo con la jeringa. Evaporar a sequedad el contenido de la ampollita y conservarla en refrigeración.

Preparación de las placas de cromatografía de capa fina:

Pesar 30 g de gel Adsorbil plus Kieselgel G especial para cromatografía en capa fina, se colocan dentro de un matraz Erlenmeyer con tapón de 250 ml, se agrega la cantidad de agua recomendada por el fabricante agitando vigorosamente durante 1 min hasta obtener una suspensión homogénea y vaciar dentro del aplicador.

Se recubren las placas de vidrio de 20 x 20 cm previa limpieza con acetona y secas, con la suspensión de gel de sílice dejando aproximadamente un espesor entre 25 y 50 mm. Se dejan reposar las placas sin moverlas hasta que gelifiquen. Posteriormente se activan las placas recubiertas en un horno a 110 °C durante 1 hr, finalmente se colocan las placas activadas en un desecador hasta el momento de utilizarlas.

Aplicación del Extracto de Aflatoxinas en cromatografía en capa fina.

Se destapa el frasco vial que contiene el extracto de aflatoxinas de la muestra problema adicionar 0.5 ml de cloroformo, sellar con el tapón, introducir la microjeringa de 10 microlitros en el tapón de polietileno y sobre una placa preparada aplicar alicuotas de la muestra problema sobre una línea imaginaria a 4 cm del borde inferior de la placa de cromatografía. En la misma placa se aplican alicuotas de solución patrón que contiene 2 ppb de aflatoxinas B1, B2, G1, G2, a una concentración de 10, 20, 30 40 y 60 microlitros,

Se colocan 180 ml de cloroformo y 20 ml de acetona en una cámara de desarrollo cromatográfico cuidando que el volumen alcance 2 cm de

profundidad. Previa saturación de la cámara de desarrollo (durante 30 min) colocar las placas.

Las aflatoxinas pueden descomponerse en la placa si esta no se desarrolla de inmediato en la oscuridad ya que son susceptibles a la luz, aire, los ácidos y las bases.

Sumergir la placa a una temperatura de 23-25 °C hasta que el frente del disolvente haya alcanzado 10 -12 cm sobre el nivel original. Posteriormente se saca la placa de la cámara, evaporar el disolvente a temperatura ambiente hasta sequedad.

Lectura:

La placa cromatográfica se observa en luz (UV) de onda larga y se deja si existen manchas fluorescentes cuyo recorrido (Rf) y color sean similares a las soluciones patrón de aflatoxinas.

Se observa la diferencia de color de los dos tipos de aflatoxinas; verde fluorescente de las aflatoxinas B, en contraste con un verde pálido de las aflatoxinas G.

Por último se compara los (Rf) de los diferentes tipos de aflatoxinas en las muestras y se cuantifica que cantidad esta presente en cada muestra por comparación con la curva del patrón de referencia.

Cuantificación de Aflatoxinas.

Se puede determinar la concentración de las aflatoxinas con un error que varía de 2 a 4 % si se utiliza un densímetro apropiado para medir la intensidad fluorescente. Utilizando una placa de cromatografía delgada con sumo cuidado para evitar errores de aplicación, variación de resolución con distintos lotes del gel de sílice, errores de ajustes que son necesarios hacer en los parámetros de los instrumentos antes de la medición y errores en las medidas de zonas punta.

**Diagrama 4: método modificado para la determinación
de aflatoxinas por Cromatografía en Capa Fina (BF)**

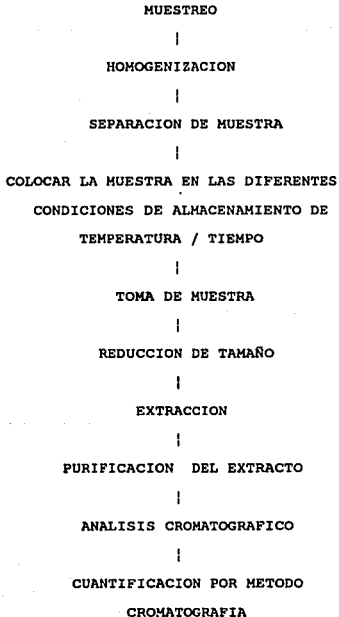
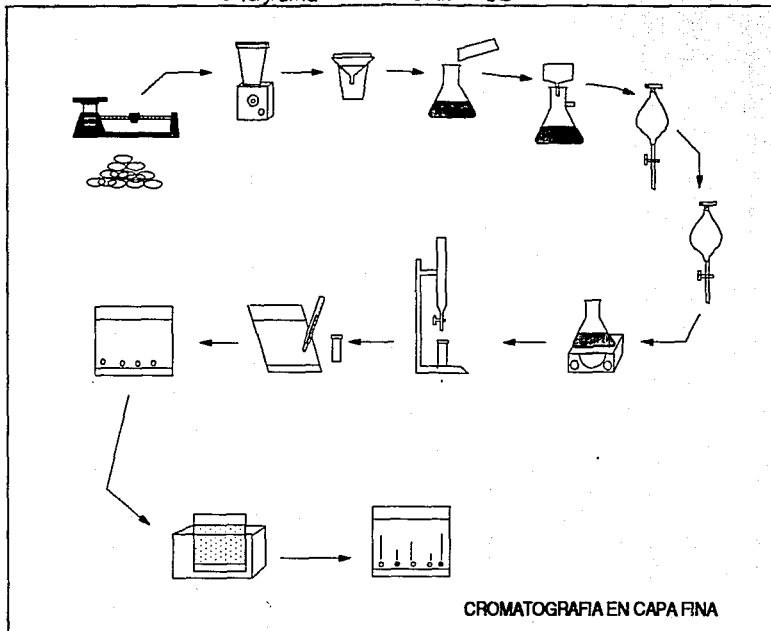


Diagrama 5: Método CB



CAPITULO III

RESULTADOS

En las tablas 7,8 y 9 se presentan los resultados de concentración de aflatoxinas obtenidas a diferentes tiempos y temperaturas para el cacahuete sin tostar, tostado y crema de cacahuete.

La gráfica a muestra el incremento de la concentración de aflatoxinas a las diferentes temperaturas de estudio.

A 25 °C el incremento es lento mientras que a 52 °C aumenta rápidamente en un lapso de 10 días después de que se determinó el blanco.(gráfica b)

A mayor tiempo y temperatura el crecimiento el hongo *Aspergillus* es inhibido, afectando la concentración de aflatoxina.

Haciendo un análisis de los datos obtenidos se observa que el incremento en el contenido de aflatoxina sigue una cinética de primer orden como se muestra en las gráficas c y d.

Las tablas 10, 11 y 12 y las gráficas e y f muestran el incremento en la concentración de aflatoxinas cuantificado por el método de extracción Aflatest a distintos tiempos y temperaturas.

Tabla: 7 Concentración de aflatoxinas cuantificadas en cacahuete sin tostar por método cromatográfico.

Tiempo (días)	temp 25 °C (ppb)	temp 32 °C (ppb)	temp 52 °C (ppb)
0	1.5 + 0.04	1.5 + 0.04	1.5 + 0.04
10	1.7 +0.02	2.6 +0.01	6.0 +0.04
20	2.5 0	3.7 +0.04	6.5 +0.25
30	3.0 +0.1	4.0 +0.06	7.0 +0.081
40	3.2 +0.1	4.1 +0.1	7.5 +0.3
60	3.7 +0.04	4.5 +0.05	8.0 +0.02
90	4.0 +0.06	5.0 +0.2	9.0 +0.5

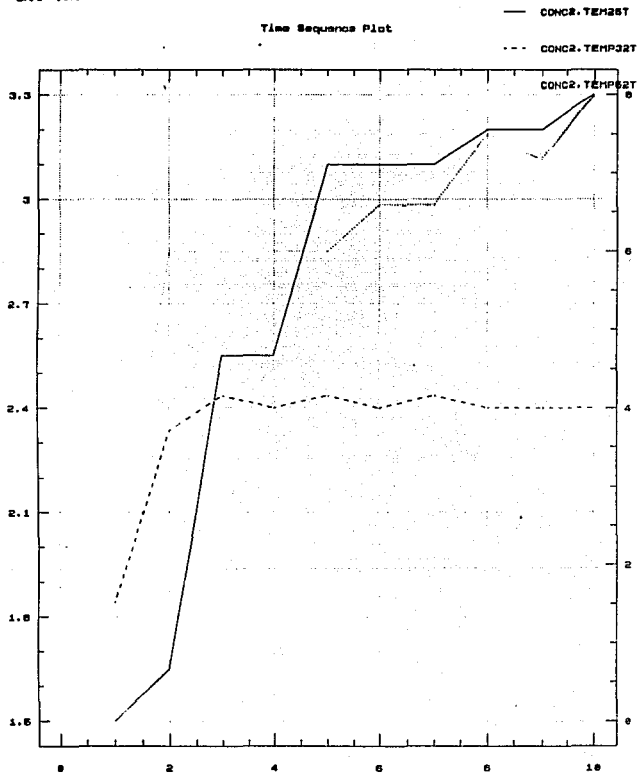
Tabla 8: Concentración de aflatoxinas cuantificada en cacahuate tostado por método cromatográfico (CB)

Tiempo (días)	Temp. 28°C (ppb)	Temp. 32°C (ppb)	Temp. 62°C (ppb)
0	1.8 +0.04	1.8 +0.04	1.8 +0.04
10	1.6 +0.13	3.7 +0.24	6.0 +0.01
20	2.8 +0.1	4.0 +0.14	6.0 +0.04
30	3.1 +0.16	4.0 +0.1	6.6 +0.25
40	3.1 +0.2	4.1 +0.21	7.2 +0.33
60	4.0 +0.2	4.1 +0.21	7.5 +0.26
90	4.0 +0.2	4.1 +0.2	8.0 +0.4

Tabla 9: Concentración de aflatoxinas cuantificada en crema de cacahuate por método cromatográfico (CB)

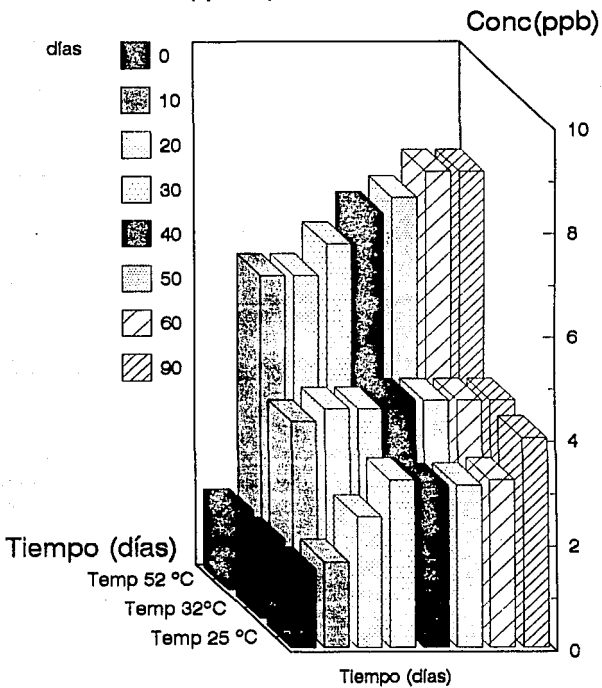
Tiempo (días)	Temp. 28°C (ppb)	Temp. 32°C (ppb)	Temp. 62°C (ppb)
0	1.75 +0.04	1.75 +0.1	1.75 +0.1
10	2.0 +0.04	10.2 +0.1	13.6 +0.4
20	9.6 +0.1	13.8 +0.2	17.1 +0.3
30	15.6 +0.2	17.6 +0.23	17.8 +0.4
40	20.1 +0.2	21.4 +0.25	21.6 +0.3
60	21.6 +0.4	21.4 +0.1	22.1 +0.4
90	22.3 +0.4	21.7 +0.2	22.6 +0.4

GRAF (a) INCREMENTO EN CONCENTRACION DE AFLATOXINAS A DIFERENTES TEMPERATURAS



Concentración de aflatoxinas a diferentes temperaturas durante el almacenamiento

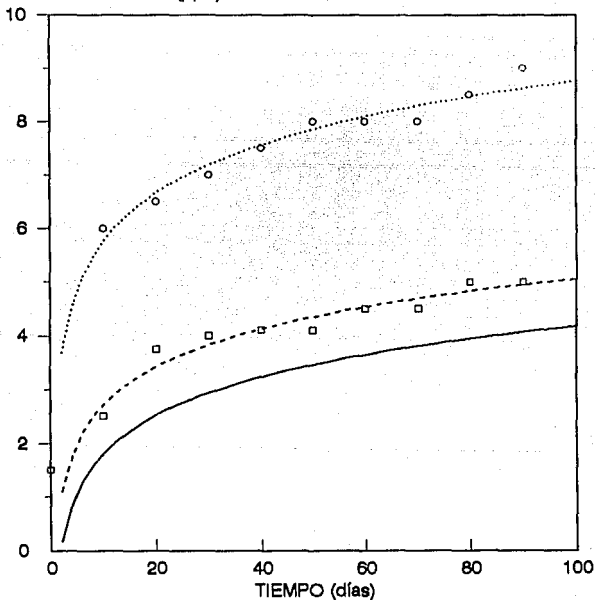
Graf.(b) Tiempo vs concentración



Graf (c). Tiempo vs concentración de aflatoxinas
en cacahuete sin tostar.

CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA

CONCENTRACION (ppb)



Temp: 25°C Temp: 32°C Temp: 52°C
(ppb) (ppb) (ppb)

Mezcla variedad Flor Runner -Virginia

Graf (d) Tiempo vs concentración de aflatoxinas
en cacahuate tostado

CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA

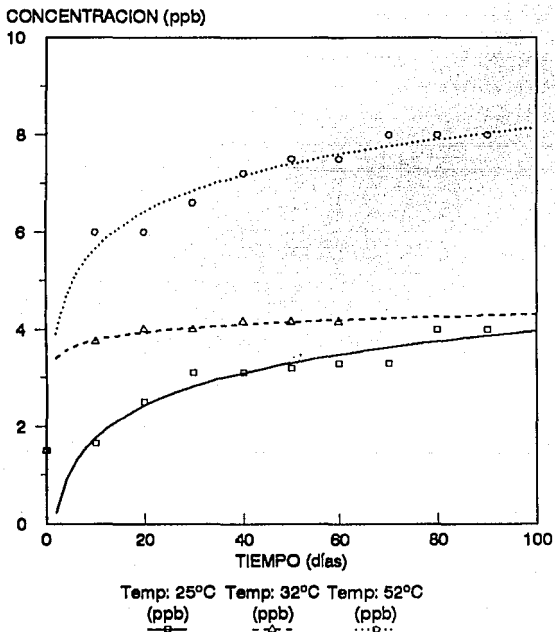


Tabla 10: Concentración de aflatoxinas cuantificadas en cacahuete sin tostar por método Aflatest

	Tiempo (días)	Temp. 25°C (ppb)	Temp. 32°C (ppb)	Temp. 52°C (ppb)
	0	2	2	2
	10	2	3	8
	20	3	4	7
	30	3	4	7
	40	4	5	8
	60	4	5	8
	90	5	5	8

**Tabla 11: Concentración de aflatoxina
cuantificadas en cacahuete
tostado por método Aflatest**

Tiempo (días)	Temp: 25 °C (ppb)	Temp: 32 °C (ppb)	Temp: 52 °C (ppb)
0	2	2	2
10	2	4	6
20	3	4	6
30	3	4	7
40	3	4	8
60	4	4	7
90	4	4	8

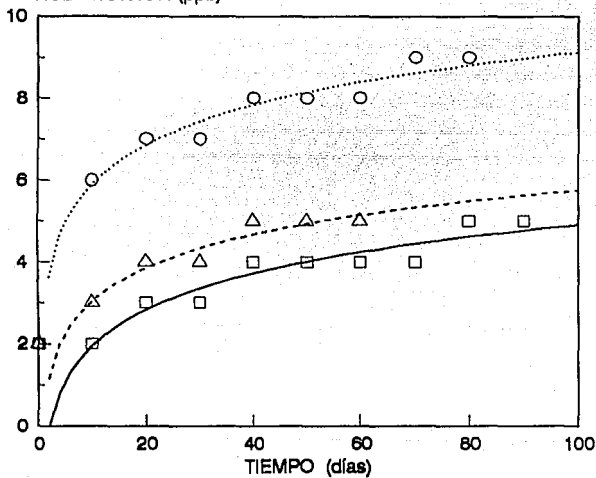
**Tabla 12: Concentración de aflatoxinas
cuantificada en crema de cacahuete
por método Aflatest**

Temp 25 °C (ppb)	Temp 32 °C (ppb)	Temp 52 °C (ppb)
2	2	2
2	10	14
10	14	17
16	18	18
20	21	22
22	21	22
22	22	

Graf (e) Tiempo vs concentración de aflatoxinas
en cacahuete sin tostar

METODO AFLATEST

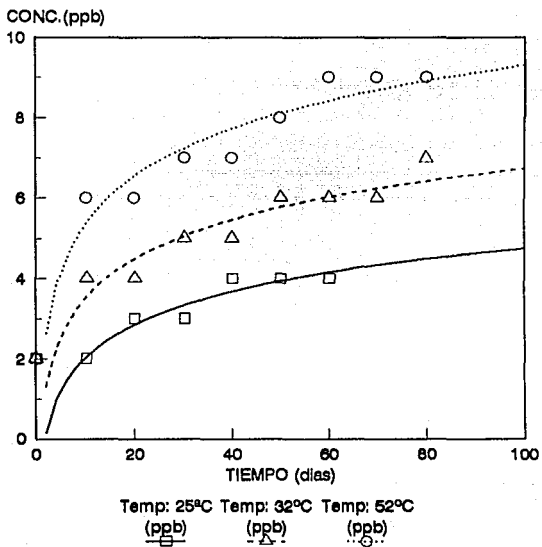
CONCENTRACION (ppb)



Temp: 25 °C Temp: 32 °C Temp: 52 °C
 (ppb) (ppb) (ppb)

Graf (f) Tiempo vs concentración de aflatoxinas
en cacahuete tostado

METODO AFLATEST



La tabla 13 y 14 muestran los resultados del estudio de comparación de ambos métodos (CB y Aflatest) y la diferencia en cuanto a la sensibilidad con la que se detecta la toxina.

EL método más sensible es el de cromatografía en capa fina, dependiendo de la exactitud que se requiera se podrá recomendar el uso de éstos.

Tomando como ejemplo los datos obtenidos en cacahuete tostado y crema de cacahuete podemos observar la diferencia en sensibilidad de cada método. (Gráfica g)

En la gráfica h se observa el aumento en la concentración de aflatoxina, señalando claramente la sensibilidad en la cuantificación.

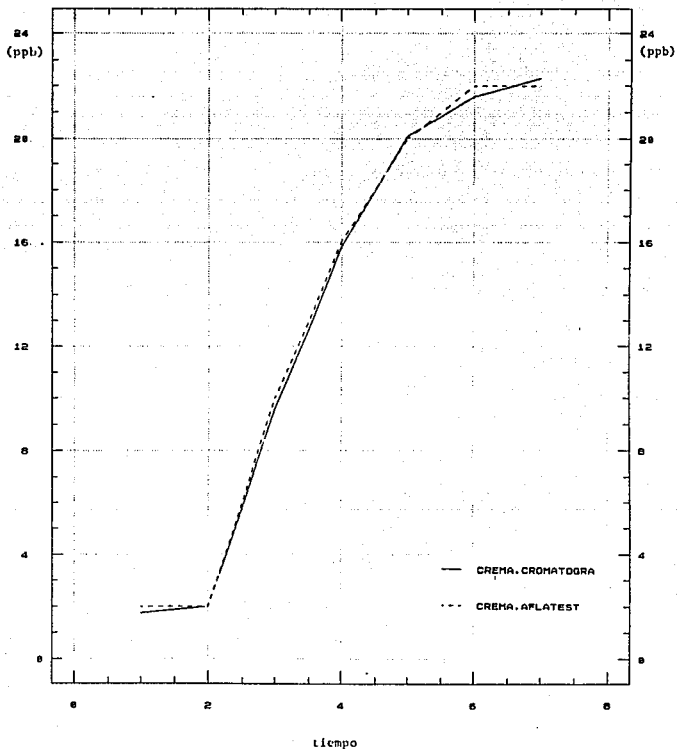
**Tabla 13: Concentración de aflatoxinas
en cacahuete sin tostar
Método: Cromatografía en Capa Fina**

Temp: 32 °C	
Tiempo (días)	Concentración (ppb)
0	1.5
10	2.6
20	3.7
30	4.0
40	4.1
60	4.5
90	5.0

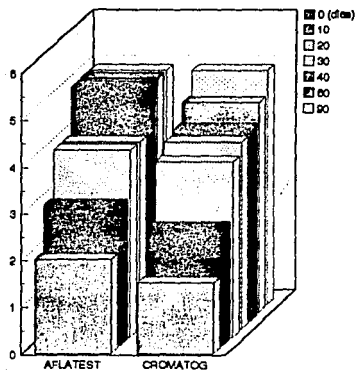
**Tabla 14: Concentración de aflatoxinas
en cacahuete sin tostar
Método : Aflatest**

Temp: 32 °C	
Tiempo (días)	Concentración (ppb)
0	2.0
10	3.0
20	4.0
30	4.0
40	5.0
60	5.0
90	5.0

GRAF (9) COMPARACION DE METODOS DE EXTRACCION DE AFLATOXINAS



**Graf (h): Comparación de métodos de extracción
Cromatografía vs. Aflatest**



3.2 DISCUSION

En las tablas anteriores se observa que el aumento en la concentración de aflatoxinas se presenta en forma proporcional al tiempo y temperatura.

Aún cuando el productor de la toxina sea un hongo y las condiciones favorables para su desarrollo sean temperaturas de 20 a 25 °C se da un incremento a temperaturas mayores, ésto se debe a que el aumento de temperatura acelera el metabolismo del *Aspergillus* durante los primeros días, después poco a poco el hongo es inhibido por las condiciones que al principio le favorecieron un rápido desarrollo: altas temperaturas.

Por su carácter termorresistente, la aflatoxina continua presente aún después de pasar por cada etapa de elaboración de crema de cacahuete representando un peligro si se sobrepasan los límites permitidos.

El tratamiento que se da a la semilla antes de ser utilizada para la producción de crema de cacahuete (ver diagrama de flujo) no es suficiente para eliminar la toxina, a pesar de usar temperaturas de 65 °C. El producto terminado tendrá la misma cantidad de aflatoxinas con la que haya entrado la materia prima y puede ser mayor si la limpieza del equipo después de cada producción no es adecuada.

Durante el tostado disminuye un poco la concentración de aflatoxinas debido a que se elimina la cascarilla la cascarilla que cubre la semilla y en ésta queda una pequeña cantidad de toxina.

En cuanto a la crema, teóricamente se debería obtener la misma cantidad de aflatoxinas que se cuantificó en el cacahuete, pero debido a que contiene otros ingredientes que no son fácilmente arrastrados por los solventes durante la extracción el valor aumenta. Conforme transcurre el tiempo estos ingredientes al igual que la crema cristalizan "encapsulando" así la toxina, por lo que en su extracción son arrastrados dando con ello de concentraciones elevadas, que en la mayoría de los casos se debe a una interferencia en la lectura.

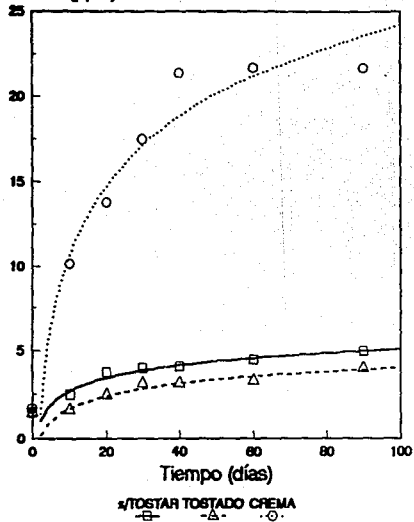
La gráfica i muestra la concentración en cada etapa del proceso que se estudió en este trabajo y donde se observa las diferencias que se presentan con la variación de tiempos.

En cuanto al uso de métodos de extracción, los resultados muestran una diferencia insignificante uno del otro. Si se necesita exactitud se deberá usar el método de cromatografía (CB), si sólo se requiere conocer en números redondos la concentración de toxina presente para tomar una decisión de aceptación ó rechazo es mejor usar el método Aflatest ya que es mas rápido, menos peligroso ya que no utiliza estándares puros, y de fácil manejo.

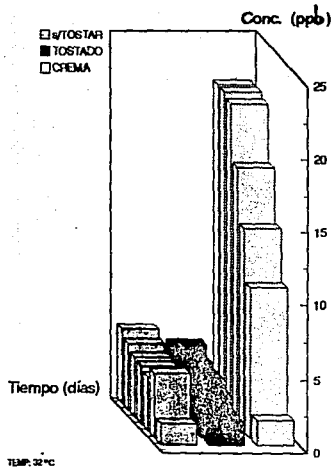
Graf (i)

COMPARANDO CONCENTRACION EN CADA PASO DEL PROCESO (ANTES, DESPUES DE TOSTAR Y EN CREMA)

Conc. (ppb)



TEMP: 32°C



CAPITULO IV

CONCLUSIONES:

No se puede impedir la contaminación por aflatoxinas ya que son muchos y muy variados los factores que favorecen su aparición, pero se puede controlar el crecimiento del hongo *Aspergillus* cuando este presente.

La temperatura, el tiempo y la humedad son factores que se deben tener en consideración para controlar el crecimiento de microorganismos que pudieran causar daño a la materia prima.

Cuando sea necesario almacenar materias primas se deben cuidar las condiciones de almacenamiento mencionadas anteriormente sin descuidar la limpieza del almacén.

La importancia de controlar la producción de la toxina se debe a su termorresistencia; si no se controla en su fase inicial el producto hecho con esta materia prima estará contaminado.

Se recomienda no mantener por largos periodos el material almacenado para que el hongo no pueda adaptarse o recuperarse en las condiciones del almacén. El mantener temperaturas bajas, menores de 20 °C es muy recomendable.

Las condiciones de almacenamiento deben ser óptimas si se quiere mantener el producto en un buen nivel de calidad.

Lo recomendable es tener la cantidad de materia prima suficiente para el cumplimiento del programa de producción y no más.

Las aflatoxinas causan graves daños al hombre por lo que no se debe usar materiales contaminados en la producción de alimentos, agregar diferentes ingredientes en la elaboración de crema de cacahuete con el fin de enmascarar concentraciones altas de aflatoxinas es una práctica poco ética que pone en riesgo la calidad del producto terminado y la salud del consumidor.

A N E X O

La cuantificación se realiza de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{ppb} = \frac{V_s \times C_s \times SD}{W \times S \times 0.6} \times 1000$$

donde

V_s = ul del estándar de aflatoxina

C_s = concentración del estándar de aflatoxina (ug/ul)

SD = volumen al cual el extracto diluido para análisis

W = gramos de la muestra

S = ul del extracto de muestra espoteado.

MEDIA:

$$\bar{X} = \frac{X_1 + X_2 + X_3}{n}$$

$n = 3$ Número de muestras

DESVIACION ESTANDAR

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{X=1}^{X=n} (X_i - \bar{X})^2}{n - 1}}$$

Datos:

Muestra 1: 1.5

Muestra 2: 1.5

Muestra 3: 1.6

$$\bar{x} = \frac{1.5 + 1.5 + 1.6}{3} = 1.53$$

$$s = \sqrt{\frac{(1.5 - 1.53)^2 + (1.5 - 1.53)^2 + (1.6 - 1.53)^2}{2}}$$

$$s = 0.04$$

B I B L I O G R A F I A

- 1) Abdollahi Buchanan 1981. Regulation of Aflatoxins Biosynthesis, Characterization of glucose as an Apparent Inducer of Aflatoxin Production. J. of Food Science 46 : 143-146.
- 2) Abstract 52 1983. International Mycotoxin Conference. Cairo Egypto Abstract Book
- 3) Anon 1972. Peanut Butter Consumer Repts 37 (5) : 286-289
- 4) Association of Official Analytical Chemist, Official Methodos of Analysis (A.O.A.C) 1980.
- 5) Avera 1974 Peanut Butter U.S Pat 3, 121, Feb To Corn Products Co.
- 6) Bassler R. 1980. " Experience in analysis of feeds and oilseeds for aflatoxina ". Qualitas Plantarum - Plant Foods For Human Nutrition. : 271 - 282.
- 7) Beckwith A.C. Vesonder R.F. Ciegler 1976. Chemical methods investigated for destoxifying aflatoxins in foods and feeds." Agr.Res.Ser. Department of Agriculture. USA : 58-67
- 8) Burdaspal P.A. 1978 " Aflatoxinas en Alimentos " Centro Nacional de Alimentación y Nutrición, México (24) :21-27
- 9) Campos H., Crespo Santos J. 1980 " Aflatoxin contamination in grains from the Pacific Coast In Guatemala ". Bulletin of enviromental Contamination and Toxicology : 789-795.

- 10) Ciegler A. 1979 " Control measures for aflatoxin contamination of agricultural commodities " . Annals of the New York Academy of Sciences. 329 :285 - 292.
- 11) Doyle M.P., Applebarum R.S. Brackett R.E.Marth 1982. " Physical, Chemical and agricultural commodities ". J. Food Prot. :964 - 971.
- 12) Dutton M.D.Westlake 1985 " Occurrence of mycotoxins in cereals and animals feedstuffs in South Africa ". J.Assoc.Off Anal Chem 68:838.
- 13) Gilberts J.Shepherd 1985 " A survey of aflatoxins in peanut, nuts and nuts confectionary products by HPLC with fluorescence detection ". Foods Adds Contaminants.
- 14) Gimeno A. 1979 "Thin layer chromatographic determination of aflatoxins, ochratoxins, sterigmatocystin, zearalenone, citrinin, T-2 toxin, diadetoxyscirpenol, penicillic acid, patulina and penitrem" A Journal of the A.O.A.C. 62(3).
- 15) Guajardo G.R. 1983 " Almacenamiento de granos en México ". Departamento de Economía Agrícola. Chapingo,Méx. (Tesis profesional)
- 16) Heathcote J.G., Hibbert J.R. 1978 " Aflatoxinas: Chemical and biological aspects ". Elsevier Scientific Publishing Company.
- 17) Informe de proyecto 1985 " Evaluación preeliminar del grado de contaminación de algunos alimentos ". Perú.
- 18) Jamieson M. Jobber P. 1974 " Manejo de alimentos, ecología del almacenamiento": Pax-Hex :103- 150.

- 19) Jones B.D. 1982 Métodos de análisis del contenido de aflatoxinas. Tropical Products Institute.
- 20) Kleinwatcher V., Kovkalova B. 1982 " Detoxification of aflatoxin ultraviolet light ". Ceskoslovenska Hygiena 27 (5) :297-301.
- 21) Liener E. 1980 " Toxic Copnstituents of plant, foodstuffs". Academic Press : 331.
- 22) Lindner E. 1978 " Toxicología de los alimentos ". Ed. Acribia
- 23) Lilien K. and Glabe 1973 " Peanut butter product". Can Pat 671,151. Sep 245 To National Bakers Service.
- 24) Moreno M.E. 1987 " Los problemas de la conservación de granos y semillas en México ".- Ciencia y Desarrollo :9 - 20
- 25) Muller H.M. 1982 " Detoxification of mycotoxins for physical techniques". Ubersichten Zur Tierernahrung. 10 (2) : 95 - 122.
- 26) Peña Betancourt S., Durán Bazúa C. 1990 " Efecto tóxico de las aflatoxinas en la dieta ". Ciencia y Tecnología Vol.XVI
- 27) Pieter S. Stern 1980 "The biosynthesis of micotoxin " Academic New York : 159 - 179.
- 28) Pons A. W., Franz A. O., Lee L. S. 1973 " Rapid detection of aflatoxin contamination in agricultural products " AOAC:56 : 803-807.
- 29) Rensburg S., Kirsipuu A., Continho L.P. 1975 " Circunstancias associated with the contamination of foods by aflatoxin in a high primary liver cancer area ". S. African Medical Journal : 877-883.

- 30) Robles S. R. 1980 " Producción de oleaginosas y textil " Ed. Limusa.
- 31) Sanchez V., Sala N., Burdaaspal P.A. 1986 " Occurrence of aflatoxin and aflatoxigenic molds in foods and feed in Spain ". J. Food Protection 49 : 445-448.
- 32) Scott P.H. 1984 " Effects of food processing on mycotoxins ". J. Food Prot. 47(6) : 489-499.
- 33) Shina K.K. 1983 " Aflatoxins problems in storage and standing maize crops ". Proc Symp Mycotoxins in Food and Feed India.
- 34) Walter J., Pons Jr. 1981 " Effect of Drought on Occurrence of *Aspergillus flavus* in Maring Peanuts ". JAOCS.
- 35) Whitaker Thomas 1981 " Problems associated with testing agricultural commodities for aflatoxin. Error in sampling preparation and analysis ".
- 36) Whitaker T. B. and J. W. Dickson 1983 " Comparison of the Amounts of Aflatoxins Extracted from Raw Peanuts Using AOAC Methods " Peanut Science. Vol. 41 (5) : 375-384.
- 37) Wilson J. 1978 " Hazard of mycotoxins to public health ". Journal of Food Protection. Vol 41 (5) : 375-384.
- 38) Wyllie T. Morehouse 1977 " Mycotoxic fungi, mycotoxins, mycotoxicose ". Enciclopedic Handbook. Marcel Dekker 1 L.G.