

APLICACIÓN DE LA EMISIÓN FLUORESCENTE PARA LA DETECCIÓN DE TOXINAS CARCINOGENICAS EN CASTAÑAS PELADAS PARA EXPORTACIÓN

S. Reátegui S.¹, A. Guzmán D.¹, O. Santisteban R.², R. Pizarro C.¹, W. Bonilla V.³, C. Galarza, A.³

RESUMEN

El árbol de la castaña, *Bertholettia excelsa*, además de proveer un fruto rico en todo tipo de nutrientes para la salud humana, contribuye con la conservación ambiental. La temperatura y humedad del medio en el que crecen y se les recolecta, aunado al inadecuado manejo de los frutos; durante la cosecha, post cosecha, procesamiento y almacenaje; favorecen la infección fúngica y la producción de derivados difuranocumarinas, conocidos como las Aflatoxinas (AFs) B₁, B₂, G₁ y G₂ cuya identificación se deriva de los colores azul y verde de la fluorescencia que emiten al ser expuestos a la luz ultravioleta (UV). Se evaluó el uso de una fuente de excitación UV como parte de un sistema que permita reconocer la fluorescencia emitida, por las Castañas de Brasil; haciendo más fácil y rápida la separación de aquellas que estén contaminadas por AFs. La selección mediante la detección de la emisión fluorescente dependerá del tipo de detectores y sensores usados.

Palabras clave: Aflatoxinas, castañas, fluorescencia, difuranocumarinas, post cosecha.

APPLICATION FOR FLUORESCENT EMISSION TOXIN DETECTION CARCINOGENIC PEELED CHESTNUTS FOR EXPORT

ABSTRACT

The Brazil Nut Tree, *Bertholettia excelsa*, while providing a fruit rich in all kinds of nutrients for human health, contributes to environmental conservation. The temperature and humidity of the environment in which they grow and are harvested, coupled with inadequate management of fruits, at harvest, post harvest, processing and storage; favor fungal infection and the production of derivatives difuranocumarinas, known as the aflatoxins (AFs) B₁, B₂, G₁ and G₂ whose identification is derived by the blue and green color emitted from the fluorescence when exposed to UV light. In this paper, it has been evaluated the use of a UV excitation source as part of a system to recognize the fluorescence emitted by the Brazil Nut Tree; making the separation easier and faster from those which are contaminated by FAs. The selection by detecting fluorescent emission depends on the type of detectors and sensors used.

Keywords: Aflatoxins, chestnuts, fluorescence, difuranocumarinas, post harvest.

I. INTRODUCCION

Las castañas o también llamadas nueces de Brasil, *Bertholettia excelsa*, son semillas que provienen de árboles que, buscando luz, emergen hasta 20 m sobre el dosel del bosque tropical húmedo de la cuenca amazónica. Asimismo, la castaña tarda, aproximadamente, 45 años para dar frutos y

no puede ser cultivada en plantaciones, pues requiere de otras especies del bosque para la polinización y producción de frutos. Desde el punto de vista nutritivo, la castaña es considerada como un alimento termo génico, donde su composición incluye alrededor de 60 a 70% de un aceite de alta calidad y 17% de proteínas ricas en aminoácidos esenciales y metionina. También, es una de las

1 D.A. de Química Inorgánica, sreateguis@yahoo.es; D.A. de Fisicoquímica, alguzdxtan@gmail.com; D.A. Operaciones Unitarias, rrgppcc@yahoo.es.

2 Instituto de Microbiología, Fac. de Ciencias Biológicas – UNMSM, ossanroj27@yahoo.es.

3 Empresa La Nuez S.R.L., lanuezsr@gmail.com.

semillas que contiene niacina, vitamina E y vitamina B₆; elementos minerales como Ca, Mg, Fe, Zn, Cu, Mn, S, K, Na y P; además de ser uno de los pocos productos comestibles con un alto contenido de Se. Todo esto, hace que esta semilla sea uno de los productos que aporta valor real a las exportaciones, tanto por la cantidad de castaña como por sus productos derivados comercializables. Sin embargo, la presencia de aflatoxinas (AFs) se constituye en un los más serios problemas que la castaña afronta, haciendo que la industria en la que esta se sustenta sea sometida a regulaciones estrictas sobre el contenido de micotoxinas en las nueces que se exportan a los países desarrollados.

Aflatoxinas^[1,2] (AF) viene de juntar, en una sola palabra, la letra A por la letra inicial del genero *Aspergillus*; FLA por las letras iniciales de la especie *flavus* y el termino toxina que significa veneno.

Sin embargo, son dos los tipos de hongo, *A. flavus* y *A. parasiticus*, los que al invadir los productos alimenticios de ciertas cosechas; producen metabolitos secundarios conocidos como AFs. Estos son derivados difuranocumarinicos y la nomenclatura de cuatro de sus estructuras, que se identifican como AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂, se refieren a la fluorescencia azul (B, de blue) y fluorescencia verde (G, de green); cuando se les observa bajo luz ultravioleta a 365 nm. Los subíndices 1 y 2 indican la mayor movilidad de las AF₁ en relación a los AF₂; en una separación cromatográfica y, de las veinte AFs

diferentes, identificadas hasta hoy, solo las AFs B₁, B₂, G₁ y G₂ (Fig. 6), se originan de manera natural en sustratos contaminados por *Aspergillus* aflatoxigénicos; las demás AFs (M₁, M₂, P₁, Q₁, aflatoxicol, etc.) son productos metabólicos de sistemas microbianos o animales. De todas las identificadas, la AFB₁ es la más frecuente y tóxica. Así mismo, mientras las toxinas tipo B se originan de la fusión de dos anillos; una lactona y una ciclopentanona; las toxinas tipo G contienen un anillo lactona fusionado, en lugar del anillo ciclopentanona.^[1-3] En relación a su incidencia, de todos los productos alimenticios; la nuez de Brasil es un sustrato en el que los hongos producen altos niveles de AFs y donde sólo algunas semillas pueden estar exentas de hongos y toxinas o, encontrarse altamente contaminadas. La temperatura y humedad del ambiente en el que crecen las castañas, el inadecuado manejo de los frutos; durante la cosecha, post cosecha, procesamiento y almacenaje; favorecen la infección fúngica, donde las muestras contaminadas por AFs pueden contener pequeño porcentaje, otras una alta proporción y algunas estando libre de hongos y toxina pueden estar muy contaminadas^[4]. Al aplicar la remoción física, para separar las semillas sanas de las enfermas, se deberá considerar estas particularidades como la base del manejo de su contaminación; ya que si una sola semilla contaminada está incluida en una muestra para análisis, ésta tiene un gran impacto sobre el contenido de AFs a medirse.

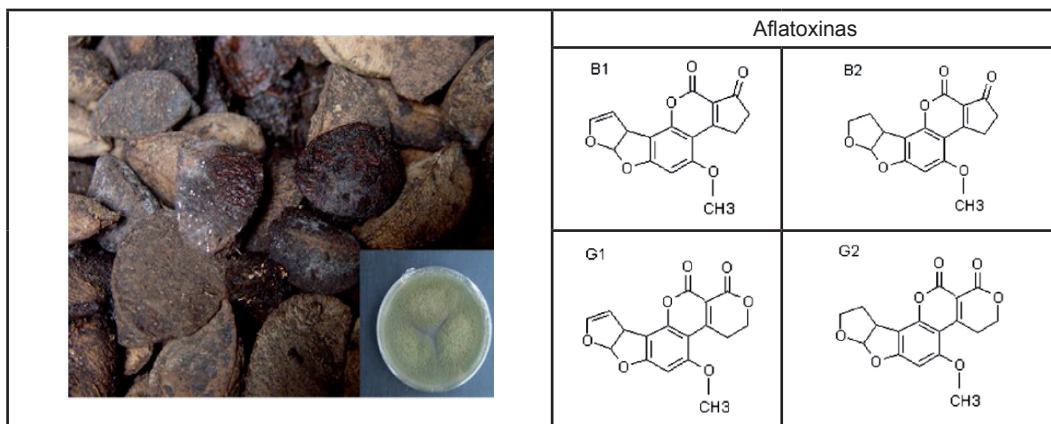


Figura N.º 1 Nuez de Brasil infectada por *A. Flavus* en condiciones de almacenaje deficientes.

Tabla N.º 1. Puntos de Fusión y Absorción Ultravioleta de las Aflatoxinas⁹

Aflatoxina	Punto de Fusión (°C)	Absorción Ultravioleta (etanol)	
		λ_{\max} (nm)	ϵ (L mol ⁻¹ cm ⁻¹)
B1	268–269 (descomposición) (cristales a partir de cloroformo)	223	25 600
		265	13 400
		362	21 800
B2	286–289 (descomposición) (cristales a partir cloroformo-pentano)	265	11 700
		363	23 400
G1	244–246 (descomposición) (cristales a partir de cloroformo-metano)	243	11 500
		257	9 900
		264	10 000
		362	16 100
G2	237–240 (descomposición) (cristales a partir de acetato de etilo)	265	9 700
		363	21 000

La identificación del color, por su parte, es usada para la detección óptica de las nueces dañadas; sea este realizado en forma manual o electrónica. La primera es lenta, usa las manos y el ojo humano. En lugares donde el costo de la mano de obra ha crecido se han introducido técnicas automatizadas. En lo que a clasificación se refiere, la modificación de las características visuales y bioquímicas^[6,6,7], tales como: la decoloración o manchado de la epidermis, cambios en la transmitancia y reflectancia relacionados con la aparición de fluorescencia, variación en la forma, densidad y tamaño o cambios en el sonido; se consideran como la expresión del crecimiento de hongos en nueces y es en base a dicha información, que se han propuesto y ensayado tecnologías que buscan detectar el daño, causado por el micelio del hongo, para remover las nueces contaminadas por aflatoxina. Al respecto, Robin^[8] considera que la micelización produce la hidrólisis de macromoléculas como las proteínas, lípidos y polisacáridos; liberando amino ácidos, ácidos grasos y azúcares simples. La detección de estos cambios permite conocer el lugar de formación del micelio y la probable producción de la micotoxina; pero como la presencia del hongo no asegura su formación, algunos investigadores han establecido correlaciones entre los cambios que se producen en las nueces y el contenido de micotoxina. De ahí que, cambiar la imagen del producto requiere que las

investigaciones que se realicen brinden la información necesaria sobre las acciones que deben realizarse para eliminar riesgos a la salud por su consumo. Implementar, en las plantas procesadoras formas fiables para su identificación y procedimientos, que ayuden a diferenciar y eliminar nueces contaminadas, requieren de inversión en capacitación y tecnologías que se consideren más eficientes. En tal sentido y con la finalidad de superar este inconveniente, las empresas exportadoras se han propuesto realizar acciones que se ajusten a las nuevas regulaciones de la Unión Europea (EU) y que les permitan reducir sustantivamente el nivel de AFs en sus productos de exportación, considerando el *Reglamento de la EU, N° 165/2010 del 26/02/2010*. En este proyecto se busca establecer criterios para el monitoreo de las semillas cuya composición ha sido alterada por el crecimiento de hongos y contaminadas por AFs. La aplicación del método considera la instalación de un sistema de clasificación que procese la castaña, sistemática y secuencialmente, al diferenciar adecuadamente los colores de la fluorescencia que emiten al ser iluminadas con luz UV. Para el control del sistema de Detección de la contaminación en las castañas, se empleó un sistema óptico que incluye al espectrómetro, a la fibra óptica como sensor y al software de adquisición de información.

II. PARTE EXPERIMENTAL

Los frutos del árbol de la Nuez de Brasil están formados por un epicarpio leñoso; dentro del cual, aproximadamente, se encuentran diez semillas cubiertas por una capa menos gruesa que protege a la nuez. Estas proceden de Puerto Maldonado, ciudad en la que los acopiadores las compran, a los lugareños, ya sea descascaradas (CD) o con cáscara (CP). En dicha ciudad las nueces CD son tratadas térmicamente con el fin de disminuir la contaminación por hongos; ya que el descascarado se realiza en forma artesanal. Las nueces CP, por su parte, son peladas aplicando procesos controlados en autoclave. Ambos tipos de nueces son trasladados a Lima las que luego de ser limpiadas y seleccionadas, de acuerdo a su calidad y tamaño, son secadas, en hornos, a 90°C y por periodos de dos horas. Finalmente, son

envasados, al vacío, y enviados a los países de destino.

Equipos e Instrumentos: Para la identificación de la fluorescencia emitida por las Castañas de Brasil, se utilizaron el Espectrómetro StellarNet Black-Comet C (190-850nm), fuente de luz ultravioleta SL1-LED de 390 nm, lámpara UV portátil de 365 nm y 254 nm, fibra óptica F1000-UVVis-SR-1, software SpectraWiz para la detección del espectro y entorno gráfico basado en Labview 2012. Los ensayos para el control del Sistema de Detección de la contaminación en las castañas, se realizaron luego de ensamblar, con el software, el sistema de detección óptica del espectrómetro SpectraWiz y el Software LabView, del fabricante. Para ello se empleó un sistema óptico conformado por el espectrómetro, la fibra óptica como sensor y el software de adquisición de información. (Figura N.º 2).

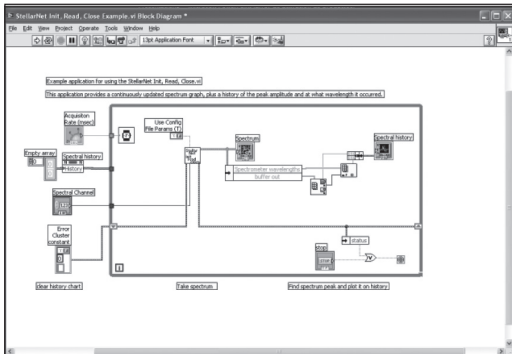


Fig. N.º 2. Bloque de comunicación entre Espectrómetro y Software LabView

La Interface del Espectrómetro StellarNet y el software SpectraWiz permiten lograr el funcionamiento perfecto del equipo y el software. Luego, mediante el Software LabView

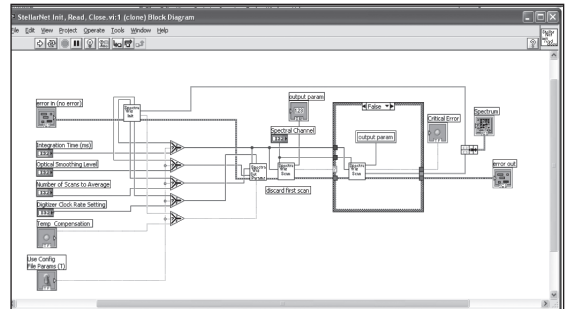


Fig. N.º 3. Bloque de la comunicación USB Espectrómetro y Software Labview.

se realizó la misma adquisición de información; pero dirigido al control independiente de la señal para poder accionar dispositivos electrónicos externos. (Figura N.º 3)

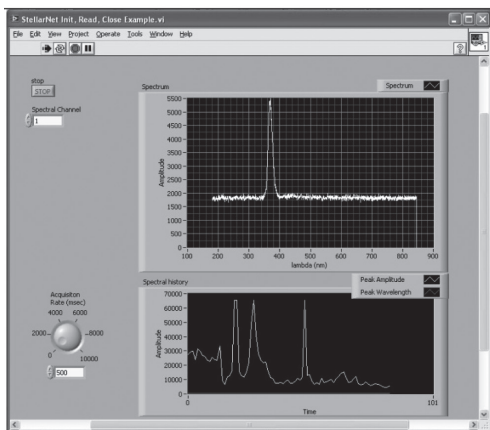


Fig. N.º 4. Interface Gráfica de las Pruebas de Adquisición de Datos de la Luz UV 365nm

La adquisición de data analógica y conversión digital fue implementada en una interfaz gráfica, obteniéndose el espectro de excitación (Figura N.º 4) para una fuente UV 365 nm. En la figura N.º 5 se observa la geometría del sistema de detección en modo reflectancia.

III. RESULTADOS

Aplicando el sistema de adquisición desarrollado; se registraron, en modo reflexión, los espectros de fluorescencia correspondientes a dos zonas primarias. La primera corresponde a la energía de excitación UV (190 a 400 nm) y la segunda pertenece a la zona de emisión fluorescente (400 a 1100 nm). Se espera que, cuando las castañas contaminadas por Aflatoxinas sean expuestas a la radiación UV de 365nm, se produzca una emisión fluorescente predominante, como resultado de las emisiones características desplegadas por cada una de ellas. La B1 (362 nm y e 21800 L mol⁻¹ cm⁻¹), la B2 (363 nm y e 23400 L mol⁻¹ cm⁻¹), la G1 (362 nm y e 16100 L mol⁻¹ cm⁻¹) y la G2 (363 nm y e 21000 L mol⁻¹ cm⁻¹). En el espectro de emisión fluorescente de una castaña tipo CP (Fig.N.º 6),

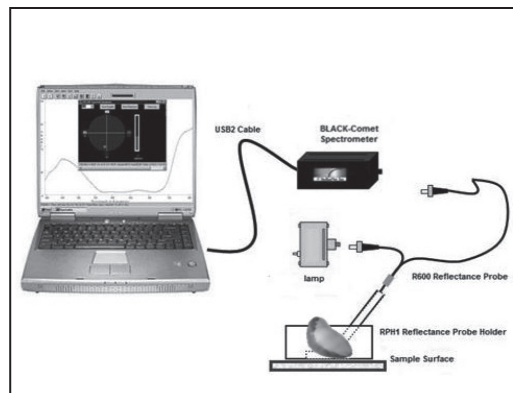


Fig. N.º 5. Geometría del sistema de detección en modo reflexión

están ausentes las señales características de las AFs B1, B2, G1 y G2. En el espectro de emisión fluorescente (Fig. N.º 7) de una castaña tipo CD la respuesta es diferente. En él se observa que una intensidad de 5×10^3 de cuentas corresponden a una longitud de onda de 500 a 525 nm que pertenece a una fluorescencia verde-azulada de la castaña. Es este fenómeno luminiscente el que se busca reproducir a través del sistema de adquisición visual. Sin embargo, debido a que la aplicación de la técnica de detección fluorescente, en modo reflexión, opera en función de los límites de detección instrumental y niveles de concentración; se percibieron algunos inconvenientes producidos por el defecto implícito y; por la calidad de los detectores y la fuente (Figs. N.º 6 y 7). Según Forno^[10], una forma que permite diferenciar la presencia o ausencia de las AFs en la castaña pelada; es recurrir a un diseño estadístico donde se aplica el análisis multivariante para las longitudes de onda que corresponden a 441 nm y 496 nm. Mediante un ajuste de regresiones lineales y correlacionales se realiza el análisis diferencial que permite la detección de aflatoxinas en estas dos regiones.

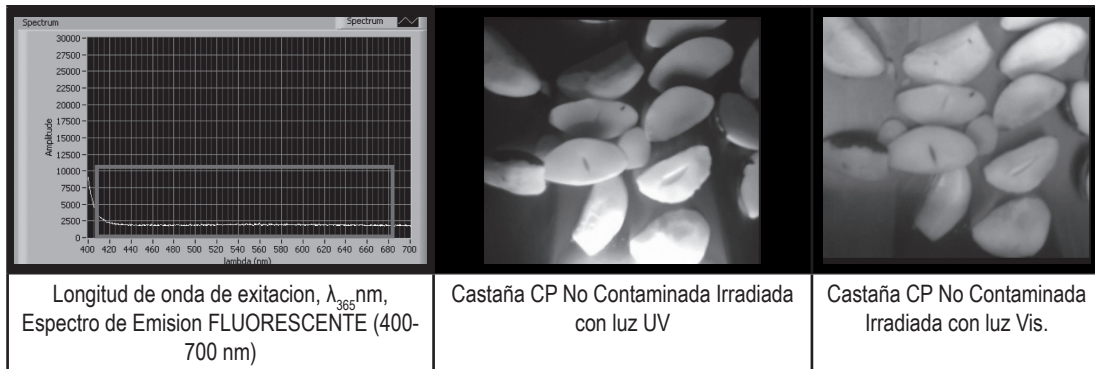


Figura N.º 6. Espectro de Fluorescencia de Castaña Sin Contaminación por Aflatoxinas

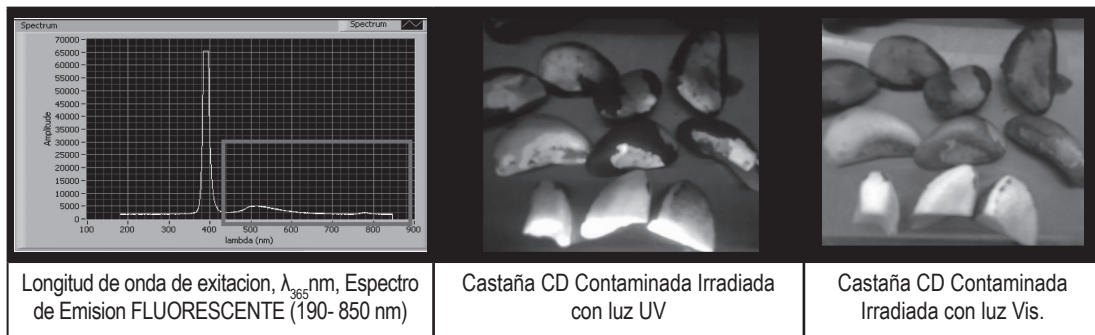


Figura N.º 7. Espectro de Fluorescencia de Castaña Contaminada por Aflatoxinas

IV. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El sistema de control de calidad no emplea la zona primaria de emisión fluorescente y, contrariamente, ha sido diseñado para evaluar la intensidad del espectro de fluorescencia perteneciente a regiones diferentes de aquellas que, de manera clásica, han permitido identificar a las Aflatoxinas. Para ello, se evalúa la calidad de la emisión y se establece una correlación directa con la presencia o ausencia de AFs. Esto permite poner en evidencia las modificaciones producidas por la presencia de los hongos y la producción de sus micotoxinas, los que al actuar sobre los componentes primarios y/o secundarios de la castaña, alteran sus emisiones espectrales luminiscentes. Los límites de detección, para la determinación de AFS contenida en la castaña pelada para exportación mejoran, considerablemente, mediante su aplicación inversa. El empleo del sistema óptico; conformado por el espectrómetro, la fibra óptica como sensor y el software de interface; permiten la adquisición

de la data e identificación espectral, "in situ", de la fluorescencia característica emitida por la muestra; cuando ésta es sometida a una fuente de energía externa, tal como la fuente de excitación UV₃₆₅ nm. Mediante esta información ha sido posible detectar la emisión fluorescente característica, producida por la presencia de las AFs B₁, B₂, G₁ y G₂, presentes en las semillas cuya composición ha sido alterada por el crecimiento de hongos. La longitud de onda de las emisiones fluorescentes, que emite la semilla que ha sido atacada por hongos (enferma), difiere sustantivamente de una semilla sin AFs y sirve de análisis superficial rápido, dentro de los límites de detección instrumental empleado.

V. CONCLUSIONES

El sistema implementado, para la selección de castañas peladas, permite diferenciar entre castañas afectadas por las AFs y las sanas. Se comprueba la relación que existe entre la emisión fluorescente, producida por

los fitoquímicos alterados debido a la presencia de las AFs, y la emisión de aquellas nueces cuyos componentes no han experimentado cambio alguno.

VI. AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su agradecimiento por el apoyo que vienen recibiendo para el desarrollo de las investigaciones que están siendo financiadas con los fondos del Ministerio de la Producción a través del Proyecto PIPEI 2010, contrato N°159-2010 en el marco de colaboración entre la Empresa La Nuez SRL y la UNMSM.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- [1] Freitas, O. y Venancio, A., Brazil Nuts: Benefits and risks associated with contamination by fungi and mycotoxins, *Food Research International*, 2011, 44, 1434-1440.
- [2] Yang, J., Brazil Nuts and associated health benefits: A review, *LWT-Food Science and Technology*, 2009, 42, 1573-1580.
- [3] Rojas, O.L. y Wilches, A.M., Determinación de las AFs en Alimentos de mayor consumo Infantil Comercializados en la Ciudad de Pamplona, Norte de Santander, *Rev. Vistua*, ISSN 01204211, 2009, Vol. 7, Núm. 1.
- [4] Williams, J. y Wilson, D., Informe sobre las Aflatoxinas de la Castaña (*Bertholletia excelsa*) en Bolivia, Documento Técnico 71, 1999.
- [5] Pomenranz, Y., Biochemical, functional, and nutritive changes during storage. In: *Storage of Cereal Grains and Their Products*, Sauer, D.B. (Ed.), 4th ed., American Association of Cereal Chemists, St. Paul, Minesota, USA, 1992, 55-141.
- [6] Wacowicz, E., Changes of chemical grain components, especially lipids, during their Deterioration by fungi. In: *Cereal Grain Mycotoxins, Fungi and Quality in Drying and Storage*, Chelkowski, J(Ed.), Elsevier Amsterdam, Netherlands, 1991, 259-280.
- [7] Kumar, M. & Agarwal, V. K., Fungi detected from different types of seeds discoloration in maize, *Seed Research*, 1997, Vol. 25, 88-91.
- [8] Robin, Y; Chiou, Y; Wu, P.Y. & Yen, Y.H. Color sorting of lightly roasted and deskinnd peanut kernels to diminish aflatoxin and retain the processing potency, *Developments in Food Science*, 1995, Vol. 37, 1533-1546.
- [9] *IARC monographs on the Evaluation of Carcinogenic risk to humans, Vol. 82, 2002, 174. OMS, IARC Press, Lyon-France.*
- [10] Forno, R; Velarde A. Estudios sobre la detección de Aflatoxina en la castaña (*Bertholletia excelsa*) mediante fluorescencia bajo luz UV, *Revista Boliviana de Física*, 11, 2005, 1-8.