

UNIVERSIDAD POLITECNICA DE VALENCIA

DEPARTAMENTO DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS



DESARROLLO DE UN SISTEMA INTEGRADO DE CALIDAD PARA REDUCIR LA CONCENTRACIÓN DE AFLATOXINAS EN MANÍ BLANQUEADO

TESIS DOCTORAL

FRANCISCO JOSE GARAVELLO

DIRECTOR

DELIA ELISA LOCASO

TUTOR

DANIEL JOSÉ VIDAL BROTONS

Octubre, 2015

La vida sólo puede ser comprendida mirando hacia atrás,
pero ha de ser vivida mirando hacia adelante.

Sören Kierkegaard

Agradecimientos

A Dios por iluminarme en este largo camino de la vida y permitirme culminar esta tesis junto a mi familia.

A la Facultad de Ciencias de la Alimentación de la Universidad Nacional de Entre Ríos, sus autoridades, docentes y personal por brindarme sus instalaciones.

A mi directora de tesis Dra. Delia Locaso por estar presente todos estos años.

A mi tutor Daniel Vidal Brotons por acompañar y ser parte de este desafío.

Al sector industrial, instituciones, organismos, laboratorios, agencias y empresas privadas que facilitaron la ejecución en cada una de las etapas a lo largo de estos años.

A mis padres, por inculcarme que con paciencia, perseverancia y providencia se pueden lograr los anhelos.

A mi esposa e hijos, perdón, por sustraerles momentos de vida durante la ejecución de esta tesis.

Finalmente a todos los que me apoyaron para escribir y concluir esta tesis.

Índice de Contenidos

1	INTRODUCCIÓN	19
1.1	PRODUCCIÓN Y EXPORTACIONES	19
1.2	MICOTOXINAS	26
1.3	EL CULTIVO DE MANÍ EN ARGENTINA	30
1.3.1	ETIOLOGÍA DE <i>ASPERGILLUS</i>	34
1.3.2	OCURRENCIA DE <i>ASPERGILLUS</i> EN EL CULTIVO DE MANÍ EN ARGENTINA	35
1.3.3	CONDICIONES DE PRODUCCIÓN DE AFLATOXINAS	37
1.3.4	SUELOS	39
1.3.5	RESISTENCIA DEL CULTIVO A LA INFECCIÓN POR <i>ASPERGILLUS</i>	42
1.4	AFLATOXINAS	44
1.4.1	ESTRUCTURA Y TOXICIDAD	46
1.4.2	METABOLISMO	50
1.4.3	ALIMENTOS CONTAMINADOS POR AFLATOXINAS	53
1.5	LEGISLACIÓN Y VIGILANCIA DE LAS AFLATOXINAS	56
1.5.1	AFLATOXINAS TOTALES EN LOS ALIMENTOS	58
1.5.2	AFLATOXINA AFB ₁ EN LOS ALIMENTOS	59
1.5.3	CODEX ALIMENTARIOUS	60
1.5.4	ARGENTINA	60
1.5.5	EUROPA	61
1.5.6	ESTADOS UNIDOS	62
1.6	DATOS ESTADÍSTICOS DE OCURRENCIA DE MICOTOXINAS	63
1.6.1	EUROPA	68
1.6.2	ASIA	68
1.6.3	NORTEAMÉRICA	68
1.6.4	SUDAMÉRICA	69
1.6.5	MEDIO ESTE	69

Índice de Contenidos

1.6.6	ÁFRICA	69
1.7	PLANES DE MUESTREO DE AFLATOXINAS Y TOMA DE DESICIONES.....	71
1.7.1	CODEX ALIMENTARIOUS	72
1.7.1.1	Plan de muestreo para maní.....	73
1.7.1.2	Preparación de la muestra.....	74
1.7.1.3	Homogeneización - trituración	74
1.7.1.4	Porción de ensayo.....	75
1.8	PLANES DE MUESTREOS UTILIZADOS EN ARGENTINA.....	75
1.8.1	CRITERIOS DE ACEPTACIÓN Y RECHAZO DEL LOTE	77
1.9	PLANES DE MUESTREO EN LA COMUNIDAD EUROPA.....	77
1.9.1	ACEPTACIÓN DE UN LOTE O SUBLOTE	77
1.10	PLANES DE INSPECCIÓN EN LOS ESTADOS UNIDOS.....	78
1.10.1	PLAN DE INSPECCIÓN	78
1.10.2	CRITERIO DE ACEPTACIÓN Y RECHAZO.....	79
1.11	MÉTODOS DE ANÁLISIS DE AFLATOXINAS.....	80
1.11.1	VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS DE ANÁLISIS.....	83
1.12	TRATAMIENTOS PARA ELIMINAR AFLATOXINAS.....	85
1.13	PROCESAMIENTO DE MANÍ BLANQUEADO	91
1.13.1	SELECCIÓN DE LOTES DE MANÍ CONFITERÍA.....	93
1.13.2	TRATAMIENTO TÉRMICO.....	93
1.13.3	ESTABILIZACIÓN	99
1.13.4	BLANQUEADO.....	99
1.13.5	SELECCIÓN ELECTRÓNICA	100
1.13.6	TAMIZADO	102
1.13.7	SELECCIÓN MANUAL	102
1.13.8	RENDIMIENTOS DEL PROCESO DE BLANQUEADO.....	103

Índice de Contenidos

2	OBJETIVOS	111
3	MATERIALES Y MÉTODOS	115
3.1	ANÁLISIS DE HUMEDAD	117
3.2	MUESTREO DE PRODUCTO BLANQUEADO	118
3.3	ANÁLISIS DE AFLATOXINAS	120
3.3.1	REDUCCIÓN DE LA MUESTRA.....	123
3.3.2	HOMOGENEIZACIÓN DE LA MUESTRA	123
3.3.3	EXTRACCIÓN DE AFLATOXINAS	124
3.3.4	PURIFICACIÓN.....	124
3.3.5	ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO DE AFLATOXINAS.....	124
3.3.6	ESTANDARES CROMATOGRÁFICOS	125
3.4	ANÁLISIS DE ÁCIDO OLEICO.....	125
3.4.1	EXTRACCIÓN DEL ACEITE EN FRÍO.....	126
3.4.2	DERIVATIZACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS.	126
3.4.3	ANÁLISIS CROMATOGRÁFICOS.....	127
3.5	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	128
3.5.1	LINEALIDAD	128
3.5.2	LÍMITE DE DETECCIÓN.....	129
3.5.3	LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN	130
3.5.4	EXACTITUD	130
3.5.5	REPETIBILIDAD	132
3.5.6	REPRODUCIBILIDAD (PRECISIÓN INTERMEDIA)	132
3.5.7	EVALUACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE	134
3.5.8	ESTUDIO DE LA EXACTITUD (RECUPERACIONES).....	137

Índice de Contenidos

3.5.9 ESTUDIO DE LA INCERTIDUMBRE DE LA CONCENTRACIÓN DE LOS ESTÁNDARES PARA LA CALIBRACIÓN	137
3.5.10 CÁLCULO DE LA INCERTIDUMBRE EXPANDIDA.....	138
3.6 LÍNEAS DE PROCESO INDUSTRIAL	139
3.7 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS: RECUENTO DE HONGOS Y LEVADURAS EN MUESTRAS DE MANÍ	141
<u>4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u>	<u>147</u>
4.1 VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE ANÁLISIS DE AFLATOXINAS.....	147
4.1.1 LINEALIDAD	147
4.1.2 LÍMITE DE DETECCIÓN	155
4.1.3 LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN	156
4.1.4 EXACTITUD	157
4.1.5 REPETIBILIDAD	157
4.1.6 REPRODUCIBILIDAD (PRECISIÓN INTERMEDIA)	158
4.1.7 EVALUACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE	159
4.1.8 ESTUDIO DE LA PRECISIÓN	160
4.1.9 ESTUDIO DE LA EXACTITUD (RECUPERACIONES)	160
4.1.10 ESTUDIO DE LA INCERTIDUMBRE DE LA CONCENTRACIÓN DE LOS ESTÁNDARES PARA LA CALIBRACIÓN	161
4.1.11 CÁLCULO DE LA INCERTIDUMBRE EXPANDIDA.....	163
4.1.12 RESULTADOS FINALES.....	166
4.2 ANÁLISIS DE MANÍ EN CAJA	167
4.3 ZONAS GEOGRÁFICAS DE PRODUCCIÓN CONSIDERADAS.....	168
4.3.1 CICLO 2010/2011.....	170
4.3.2 CICLO 2011/2012.....	172

Índice de Contenidos

4.3.3	CICLO 2012/2013.....	174
4.4	ACONDICIONAMIENTO Y ALMACENAMIENTO DE MANÍ EN CAJA	180
4.5	MICROBIOLOGÍA	184
4.6	ANÁLISIS DEL CONTENIDO DE ÁCIDO OLEICO.....	186
4.7	TRATAMIENTOS DE DESTRUCCIÓN DE AFLATOXINAS.....	190
4.8	PROCESO DE BLANQUEADO EN SECO	192
4.8.1	SELECCIÓN ELECTRÓNICA	192
4.9	DISMINUCIÓN DEL CONTENIDO DE AFLATOXINAS	206
4.10	CONSIDERACIONES FINALES	216
5	<u>CONCLUSIONES.....</u>	<u>224</u>
6	<u>BIBLIOGRAFÍA.....</u>	<u>229</u>

Índice de Tablas

Tabla 1: Rango de temperatura para el crecimiento fúngico.	39
Tabla 2: Rango de temperatura para la formación de micotoxinas.	39
Tabla 3: Propiedades físicas y químicas de los compuestos de aflatoxinas	46
Tabla 4: Frecuencia de los controles físicos de maní de acuerdo al origen para ingresar a Unión Europea.	64
Tabla 5: Criterios de funcionamiento de un método para el análisis de aflatoxinas. reglamento Unión Europea 401/2006.	84
Tabla 6: Requerimientos de validación analítica en Estados Unidos.....	85
Tabla 7: Resultados de aflatoxinas de lotes en origen y en destino	122
Tabla 8: Concentración de las soluciones de estándares preparadas (ng/ml).....	128
Tabla 9: Concentraciones teóricas agregadas sobre una muestra de maní negativa	130
Tabla 10: Concentraciones teóricas agregadas sobre una muestra de maní negativa	131
Tabla 11: Esquema ilustrativo de precisión intermedia	133
Tabla 12: Resumen de ensayos.....	134
Tabla 13: Resultados de inyecciones de linealidad	147
Tabla 14: Datos del cálculo de residuales para AFG2	150
Tabla 15: Datos del cálculo de residuales para AFG1	152
Tabla 16: Datos del cálculo de residuales para AFB2.....	153
Tabla 17: Datos del cálculo de residuales para AFB1.....	155
Tabla 18: Resultados recuperaciones a 6,27 µg/kg.....	156
Tabla 19: Límites de detección obtenidos.....	156
Tabla 20: Límites de cuantificación de aflatoxinas obtenidos	157
Tabla 21: Concentraciones obtenidas y porcentajes de recuperación ...	157

Índice de Tablas

Tabla 22: Resultados de Repetibilidad para aflatoxinas por HPLC	158
Tabla 23: Resultados precisión intermedia	158
Tabla 24: Valores de ru_precisión	160
Tabla 25: Factores de recuperación para aflatoxinas AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 y totales.....	160
Tabla 26: Valores de recuperación para cada toxina.....	161
Tabla 27: Valores de ru_conc.std para cada toxina	161
Tabla 28: valor de ru_vol.std.conc	162
Tabla 29: Valor de ru_dilución.std.....	162
Tabla 30: Datos ru_conc.std.calib	162
Tabla 31: Incertidumbre combinada relativa e incertidumbre expandida relativa de AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 y aflatoxinas totales.....	163
Tabla 32: Resumen de resultados de la validación del método analítico	166
Tabla 33: Niveles porcentuales de aflatoxinas detectados durante el muestreo y análisis de recepción de maní en caja	179
Tabla 34: Granos dañados en muestras de maní en caja durante la recepción en lotes de maní con aflatoxinas	183
Tabla 35: Carga microbiana de granos de maní contaminado con aflatoxinas	185
Tabla 36: Niveles medio de ácido oleico hallados en las muestras de maní en caja de las diferentes campañas analizadas.....	190
Tabla 37: % rechazo de granos dañados a diferentes flujos másicos de operación	194
Tabla 38: % medios de eficiencia de remoción de granos dañados en el primer paso	195

Índice de Tablas

Tabla 39: eficiencia de la selección electrónica a diferentes flujos en el segundo paso	198
Tabla 40: % medios de eficiencia de remoción de granos dañados en el segundo paso	199
Tabla 41: Eficiencia de la selección electrónica en la remoción de granos dañados (1° y 2° paso)	200

Índice de Gráficos

Figura 1: Evolución de las exportaciones del complejo maní argentino - (Cámara Argentina del Maní, 2015).	23
Figura 2: Micotoxinas de mayor importancia mundial y los correspondientes hongos toxigénicos productores. Adaptado de Miller (1994).	30
Figura 3: Calendario de producción de maní en Argentina.....	32
Figura 4: Área geográfica del cultivo de maní en Argentina – (Adaptado de Fernández y Giayetto, 2006).....	40
Figura 5: Rendimientos de maní. Campaña 2014/2015 en qq/ha.	41
Gráfico 6: Estructura de las aflatoxinas más importantes que contaminan alimentos	46
Figura 7: Etapas de la activación metabólica de la AFB1 y moléculas resultantes. (Adaptado de Rodriguez, 2010).....	52
Figura 8: Países con reglamentación de aflatoxinas (FAO, 2003).....	56
Figura 9: Límites para el contenido de aflatoxinas totales en $\mu\text{g}/\text{kg}$ (FAO, 2003).....	59
Figura 10: Límites establecidos para el contenido de AFB1 (FAO, 2003)	60
Figura 11: Cantidad de notificaciones RASFF para maní de los principales países productores y exportadores emitidos por la Unión Europea.....	66
Figura 12: Materia prima, producto final y subproductos obtenidos en el proceso de blanqueado	92
Figura 13: Diagrama de flujo del proceso de blanqueado en seco	95
Figura 14: Esquema del funcionamiento de la clasificación electrónica	101

Índice de Gráficos

Figura 15: Diagrama del balance de masas para el blanqueado en seco de maní.....	104
Figura 16: Daños hallados en los granos de maní (Fuente propia)	109
Figura 17: Muestreador neumático empleado en el muestreo de maní en caja.....	116
Figura 18: Esquema de muestreo y principio de funcionamiento del muestreador neumático.....	116
Figura 19: Muestreo de lotes de maní blanqueado.....	119
Figura 20: Línea de producción de maní blanqueado empleada	141
Ilustración 21: Esquema de la metodología empleada para el análisis de maní en caja en cada uno de los tres ciclos productivos	143
Ilustración 22: Análisis y selección de variables del proceso de blanqueado de maní con aflatoxinas.....	144
Ilustración 23: Proceso de blanqueado de maní de lotes con aflatoxinas para la determinación de la reducción de la contaminación	145
Figura 24: Cromatograma de diferentes niveles de concentración de aflatoxinas	148
Figura 25: Regresión lineal para AFG2.....	149
Figura 26: Residuos y valores ajustados para AFG2	149
Figura 27: Regresión lineal para AFG1.....	151
Figura 28: Residuos y valores ajustados para AFG1	151
Figura 29: Regresión lineal para AFB2	152
Figura 30: Residuos y valores ajustados para AFB2.....	153
Figura 31: Regresión lineal para AFB1	154
Figura 32: Residuos y valores ajustados para AFB1.....	154
Ilustración 34: Fuentes de incertidumbre.....	159

Índice de Gráficos

Gráfico 35: Comparaciones gráficas de las incertidumbres relativas para AFG2.....	163
Gráfico 36: Comparaciones gráficas de las incertidumbres relativas para AFG1.....	164
Gráfico 37: Comparaciones gráficas de las incertidumbres relativas para AFB2	164
Gráfico 38: Comparaciones gráficas de las incertidumbres relativas para AFG2.....	165
Gráfico 39: Comparaciones gráficas de las incertidumbres relativas para AFG2.....	165
Figura 40: Departamentos de la provincia de Córdoba.....	169
Gráfico 41: Registro pluviométricos promedios por mes y departamento Ciclo 2010/2011	172
Gráfico 42: Registro pluviométricos promedios por mes y departamento	174
Gráfico 43: Registro pluviométricos promedios por mes y departamento	176
Figura 44: Histogramas del contenido de humedad de las muestras de maní analizadas en cada ciclo.....	178
Ilustración 45: Evolución de la apariencia de los granos de maní con daños por frío y heladas – Fuente propia.....	183
Gráfico 46: Curvas de evolución de humedad y total de granos dañados y defectuosos durante el almacenamiento (en semanas)	184
Gráfico 47: Histogramas comparativos del nivel de hongos y levaduras (CFU/g) en lotes con y sin aflatoxinas	185
Figura 48: Cromatograma indicando el pico mayor de ácido oleico (C18:1 cis-9)	188

Índice de Gráficos

Gráfico 49: Determinación de ácido oleico en aceite de muestras de maní en caja.....	189
Gráfico 50: Niveles de concentración de H ₂ O ₂ y su incidencia sobre la concentración de alfatoxina.....	192
Gráfico 51: Eficiencia del proceso de remoción de daños en selectora electrónica Sortex Buhler Z+ en primer paso para maní blanqueado calibre 38/42	196
Gráfico 52: Eficiencia de remoción de daños en selectora electrónica Sortex Buhler Z+ en segundo paso para maní blanqueado calibre 38/42	199
Figura 53: Esquema de selección electrónica de doble paso.....	201
Figura 54: Granos de maní con restos de tegumento al egreso de los blanchers – Fuente propia.....	202
Figura 55: Diagrama del proceso completo de blanqueado en seco realizado	205
Gráfico 56: Resultados de aflatoxinas en lotes de maní confitería empleados para los ensayos.....	210
Figura 57: Cromatogramas de aflatoxinas estándar (rojo) y muestra (azul).....	210
Figura 58: Cromatogramas de aflatoxinas estándar (rojo) y muestra (azul).....	211
Gráfico 59: Resultados obtenidos de aflatoxinas luego del blanqueado y selección electrónica con dos pasos y doble etapa.....	212
Gráfico 60: Regresión exponencial y los límites de confianza	213
Ilustración 61: Residuos de regresión.....	214

Resumen

El cultivo, producción y exportación de maní en la región centro-sur de Córdoba es un pilar fundamental de la economía regional. Argentina es el principal exportador a nivel mundial de maní con más de 400.000 toneladas anuales que tienen como destino principal la Unión Europea (UE) en más de un 70% de las exportaciones.

El principal factor de riesgo para la salud es la presencia de micotoxinas en maní, principalmente aflatoxinas AFB1, AFB2, AFG1 y AFG2, que son producidas por hongos filamentosos del género *Aspergillus*, más específicamente por *A. flavus* y *A. parasiticus*.

La AFB1 fue clasificada por la Organización Mundial de la Salud como cancerígena en humanos. Por esto, la comunidad internacional ha establecido límites para estas aflatoxinas. Al menos 99 países tienen reglamentos para las micotoxinas en los alimentos o en piensos, siendo los más estrictos los establecidos por el reglamento UE 165/2010, con un valor máximo de 2 µg/kg para AFB1 y 4 µg/kg para el total de aflatoxinas.

Para el control del cumplimiento de estos límites, la autoridad sanitaria en Argentina ha establecido criterios de acuerdo a los requerimientos de la UE, y esta ha implantado un sistema de vigilancia en destino que

Resumen

informa inmediatamente de los riesgos para el consumidor impidiendo el ingreso de productos contaminados.

Es por ello importante determinar la ocurrencia de aflatoxinas en el cultivo de maní en Argentina, en la principal variedad de la región, y establecer ciertos puntos de control para minimizar la contaminación y desarrollar un método de análisis y sistema de control de riesgos a través del proceso de blanqueado.

En este marco se desarrolla la presente tesis doctoral, en la que se cumple con varios objetivos, entre los cuales se destacan como principales el muestreo y análisis durante tres ciclos agrícolas de más de 150.000 toneladas de maní provenientes de la región centro-sur de la provincia de Córdoba para determinar la ocurrencia de aflatoxinas en el cultivo como resultado de las condiciones climáticas.

Para el análisis se desarrolló y validó un método analítico simple, preciso y económico, basado en la cromatografía líquida de alta performance, para la detección y cuantificación de las aflatoxinas, AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂, el cual arrojó valores de límites de detección para AFG₂=0,22 µg/kg, AFG₁=0,37 µg/kg, AFB₂=0,12 µg/kg y AFB₁=0,18 µg/kg con un porcentaje de recuperación promedio de 83,4% para las aflatoxinas totales cumpliendo los requerimientos de la UE y los EEUU.

Resumen

De acuerdo con los resultados analíticos se puede aseverar que en la región centro-sur de Córdoba, el maní no tiene una alta tasa de contaminación por aflatoxinas, siendo la incidencia máxima en la ocurrencia de aflatoxinas del 2,5% para el ciclo productivo 2012/2013 y un valor promedio del 1,3% para los tres períodos estudiados.

Se verificó que los requerimientos hídricos totales durante el ciclo del maní son importantes para la implantación y desarrollo del cultivo como así también para lograr elevados rendimientos, sin embargo, para evitar la proliferación de hongos y posterior generación de aflatoxinas, es importante mitigar el estrés hídrico y aplicar medidas de control de plagas, en las etapas fenológicas R2 a R4, desde la formación hasta el llenado de los granos, que acontecen desde el mes de febrero hasta fin el mes de marzo.

También se encontró que en esta región el cultivo es prácticamente mono-varietal, donde el maní tipo runner *granoleico* prevalece sobre otras variedades. Los valores de ácido oleico promedio hallados en las muestras fueron de $78,97\% \pm 2,29$.

Se determinó el porcentaje de humedad y granos dañados en las muestras durante la recepción de los granos provenientes de los campos, y se monitorearon las condiciones de almacenamiento, para finalmente,

Resumen

establecer criterios que permitiesen la implementación de un sistema de análisis de riesgos y puntos críticos de control durante las etapas críticas del cultivo.

El proceso de blanqueado en seco de lotes con aflatoxinas, con un flujo másico de 2.000 kg/h, en dos etapas consecutivas de selección electrónica por color, sumado al tratamiento de los granos rechazados con alto nivel de daños y defectos, con peróxido de hidrógeno al 0,5% v/v disminuyó la concentración de AFB1 en un $83,31\% \pm 15,98$ y de las aflatoxinas totales hasta en un $75,99\% \pm 17,33$ con una pérdida de peso del lote inferior al 6%, pudiendo considerarse al mismo como capaz de reducir el peligro de las aflatoxinas a un nivel aceptable.

Finalmente, es posible para la industria manisera predecir el comportamiento del proceso de blanqueado y determinar la concentración final de aflatoxinas en lotes de exportación sin malgastar recursos mediante el empleo de una ecuación logarítmica conociendo la concentración inicial de aflatoxinas.

Resum

El cultiu, producció i exportació de cacauet en la regió centre-sud de Còrdova és un pilar fonamental de l'economia regional. Argentina és el principal exportador a nivell mundial de cacauet amb més de 400.000 tones anuals que tenen com a destí principal la Unió Europea (UE) en més d'un 70% de les exportacions. El principal factor de risc per a la salut és la presència de micotoxines en cacauet, principalment aflatoxines AFB₁, AFB₂, AFG₁ i AFG₂, que són produïdes per fongs filamentosos del gènere *Aspergillus*, més específicament per *A. flavus* i *A. parasiticus*. L'AFB₁ va ser classificada per l'Organització Mundial de la Salut com cancerígena en humans. Per açò, la comunitat internacional ha establert límits per a estes aflatoxines. Almenys 99 països tenen reglaments per a les micotoxines en els aliments o en pinsos, sent els més estrictes els establerts pel reglament UE 165/2010, amb un valor màxim de 2 µg/kg per a AFB₁ i 4 µg/kg per al total d'aflatoxines.

Per al control del compliment d'estos límits, l'autoritat sanitària a Argentina ha establert criteris d'acord amb els requeriments de la UE, i esta ha implantat un sistema de vigilància en destí que informa immediatament dels riscos per al consumidor impedit l'ingrés de productes contaminats. És per això important determinar la idea d'aflatoxines en el cultiu de cacauet a Argentina, en la principal varietat

Resum

de la regió, i establir certs punts de control per a minimitzar la contaminació i desenrotllar un mètode d'anàlisi i sistema de control de riscos a través del procés de blanquejat.

En este marc es desenrotlla la present tesi doctoral, en la que es compleix amb diversos objectius, entre els quals es destaquen com a principals el mostratge i anàlisi durant tres cicles agrícoles de més de 150.000 tones de cacauet provinents de la regió centre-sud de la província de Còrdova per a determinar la idea d'aflatoxinas en el cultiu com resultat de les condicions climàtiques. Per a l'anàlisi es va desenrotllar i va validar un mètode analític simple, precís i econòmic, basat en la cromatografia líquida d'alta performance, per a la detecció i quantificació de les aflatoxinas, AFB₁, AFB₂, AFG₁ i AFG₂, el qual va presentar valors de límits de detecció per a AFG₂=0,22 µg/kg, AFG₁=0,37 µg/kg, AFB₂=0,12 µg/kg i AFB₁=0,18 µg/kg amb un percentatge de recuperació mitjana de 83,4% per a les aflatoxinas totals complint els requeriments de la UE i els EUA.

D'acord amb els resultats analítics es pot asseverar que en la regió centre-sud de Còrdova, el cacauet no té una alta taxa de contaminació per aflatoxinas, sent la incidència màxima en la idea d'aflatoxinas del 2,5% per al cicle productiu 2012/2013 i un valor mitjana del 1,3% per als

Resum

tres períodes estudiats. Es va trobar que els requeriments hídrics totals durant el cicle del cacauet són importants per a la implantació i desenrotllament del cultiu com així també per a aconseguir elevats rendiments, no obstant això, per a evitar la proliferació de fongs i posterior generació d'aflatoxinas, és important mitigar l'estrés hídric i aplicar mesures de control de plagues, en les etapes fenològiques R2 a R4, des de la formació fins a l'ompliment dels grans, que succeïen des del mes de febrer fins a fi el mes de març.

També es va trobar que en esta regió el cultiu és pràcticament monavarietal, on el cacauet tipus runner granoleico preval sobre altres varietats. Els valors d'àcida oleica mitjana trobats en les mostres van ser de $78,97\% \pm 2,29$. Es va determinar el percentatge d'humitat i grans danyats en les mostres durant la recepció dels grans provinents dels camps, i es monitoraran les condicions d'emmagatzemament, per a finalment, establir criteris que permeteren la implementació d'un sistema d'anàlisi de riscos i punts crítics de control durant les etapes crítiques del cultiu.

El procés de blanquejat en sec de lots amb aflatoxinas, amb un flux màssic de 2.000 kg/h, en dos etapes consecutives de selecció electrònica per color, sumat al tractament dels grans rebutjats amb alt nivell de

Resum

danys i defectes, amb peròxid d'hidrogen al 0,5% v/v va disminuir la concentració d'AFB1 en un $83,31\% \pm 15,98$ i de les aflatoxinas totals fins en un $75,99\% \pm 17,33$ amb una pèrdua de pes del lot inferior al 6%, podent considerar-se al mateix com capaç de reduir el perill de les aflatoxinas a un nivell acceptable. Finalment, és possible per a la indústria manisera predir el comportament del procés de blanquejat i determinar la concentració final d'aflatoxinas en lots d'exportació sense malgastar recursos per mitjà de l'ocupació d'una equació logarítmica coneixent la concentració inicial d'aflatoxinas.

Abstract

Peanut Agricultural and Industrial Sector chiefly extend across the Province of Córdoba and constitute a flagship regional economy. Argentina is the main world exporter of peanuts with over 400,000 tons per year, which are mainly destined for European Union (EU) by more than 70% of exports.

The main health-risk factor is the presence of mycotoxins in peanuts, mainly aflatoxins AFG2, AFG1, AFB2 and AFB1, which are produced by filamentous mold of the genus *Aspergillus*, more specifically by *A. flavus* and *A. parasiticus*.

AFB1 was classified by the World Health Organization as a carcinogen in humans. Therefore, the international community has set limits for these aflatoxins. At least 99 countries have regulations for mycotoxins in food or feed; the tightest was set by the EU regulation 165/2010 with a maximum value of 2 µg/kg for AFB1 and 4 µg/kg for total aflatoxins.

For monitoring compliance with these limits, the Health Authority in Argentina (SENASA) has established criteria according to the EU requirements. This has set a monitoring system that informs the consumer risks immediately on arrival by preventing the entry of contaminated products.

Abstract

It is important to determine the occurrence of aflatoxin in peanut Argentina crops, in the main variety of the region, and to establish certain criteria to minimize contamination. Furthermore, it is essential to develop a method of analysis and a system of control risk through the blanching process.

The aim of this thesis was to sample and analyze three agricultural cycles of more than 150,000 tons of peanuts from the central-southern of Cordoba province to determine the occurrence of aflatoxin in growing as a result of weather conditions.

It was developed and validated a simple, accurate and economical analytical method based on high performance liquid chromatography performance for the detection and quantification of aflatoxins, AFG₂, AFG₁, AFB₂ and AFB₁. Returned values of detection limits were AFG₂ = 0.22 µg/kg, AFG₁ = 0.37 µg/kg, AFB₂ = 0.12 µg/kg and AFB₁ = 0.18 µg/kg with an average recovery rate of 83.4% for total aflatoxins. By this way, as possible to meet the requirements of the EU and the USA.

Analytical results indicate that, in the south-central region of Córdoba, aflatoxin contamination does not have a high incidence on the peanuts. Maximum impact on the occurrence of aflatoxins was 2.5% for

Abstract

2012/2013 production cycle and an average value of 1.3% for the three annual periods studied.

It was found that the total water requirements for peanut cycle are important for the implementation and development of the crop as well as to achieve high yields. However, to prevent fungal growth and subsequent generation of aflatoxins, it is determining to mitigate water stress and apply pest control measures, from formation to grain filling - in R2 to R4 growth stages- taking place from February to end March.

It was also found that in this region the crop is virtually mono-varietal where a runner-type peanut *Granoleico* prevails over other varieties. The average values of oleic acid in the samples were $78.97 \pm 2.29\%$.

During crop reception from the fields, samples moisture and damaged kernels were determined. Also the storage conditions were controlled. Finally, criteria that would allow implement of hazard analysis and critical points control system during critical stages of the crop, were established.

Due to the dry blanching process of batches with aflatoxin (with a mass flow of 2,000 kg / h in two consecutive steps of electronic color sorting) and the treatment of rejected kernels (due to the high incidence of damage and defects, with hydrogen peroxide at 0.5% v/v concentration)

Abstract

was possible to reduce AFB1 $83.31 \pm 15.98\%$ and total aflatoxin up to $17.33 \pm 75.99\%$ with weight loss less than 6% w/w. It can be considered as a step that could reduce the food safety hazard of aflatoxin to an acceptable level.

Finally, using a logarithmic equation knowing the initial concentration of aflatoxin, peanut industry could predict the behavior of blanching process and determine the aflatoxin final concentration in lots for export without losing resources.

INTRODUCCIÓN

1 Introducción

1.1 Producción y exportaciones

La producción de maní (*Arachis hypogaea*) en Argentina se concentra en la provincia de Córdoba en más del 95% de la producción nacional. La industria manufacturera de maní está dedicada en su mayoría al mercado de exportación, con destino principalmente a la Unión Europea donde se exporta alrededor del 70% de la producción nacional, mayormente a Holanda, Alemania, Inglaterra, España, Italia, Grecia y Francia, y el 30% restante se reparte entre Estados Unidos, Canadá, México, Emiratos Árabes, Sudáfrica, Australia, Chile, Rusia, Argelia, Ucrania, China, India, Jordania, Taiwán, Japón, Tailandia entre otros países.

En la década anterior, China exportaba un promedio de 500.000 toneladas anuales de maní, Argentina 300.000 toneladas y los Estados Unidos, unas 200.000 toneladas. A partir de 2006 y hasta la fecha, las exportaciones Argentinas se mantuvieron por sobre las 400.000 toneladas anuales si bien por razones climatológicas y de mercado, el volumen de las exportaciones del sector se ha reducido en los últimos tres años acumulando una caída del 13% (SENASA; 2013)

Introducción

Sin embargo se han desarrollado nuevos mercados y destinos para las exportaciones argentinas, alcanzando para el año 2011 un total de 106 países, comparado con los 84 países que tenía como destino en el año 2011 (Cámara Argentina del Maní, 2015).

Argentina ocupa el sexto lugar entre los principales productores mundiales de maní con cáscara. Por encima se ubican China, India, Nigeria y Estados Unidos. La producción mundial de maní supera en la actualidad las 36 millones de toneladas. China produce 45% de la misma, seguida por India con 14% y Estados Unidos con 8%.

Estados Unidos, por su lado, produce anualmente entre 1,6 y 2,0 millones de toneladas de maní en caja, y el consumo doméstico norteamericano demanda la mayor parte de la producción. Los productores gozan de importantes subsidios a la producción, en contrapartida, en Argentina los exportadores tienen aranceles a la exportación (Cámara Argentina del Maní, 2015).

China produce unas 14.000.000 de toneladas de maní y exporta menos del 5% de su producción anual –principalmente a sus vecinos del sud-este asiático-, destinando casi la totalidad al consumo interno. Los problemas de calidad y presencia de aflatoxinas de su maní le han

Introducción

significado reiteradas sanciones por parte de las autoridades sanitarias Europeas.

Por otra parte, China está incrementando fuertemente su consumo doméstico de maní y aceite de maní, por lo cual, sus saldos exportables van disminuyendo drásticamente, y al mismo tiempo, crecen sus importaciones de estos productos desde Argentina (SENASA, 2013).

Una parte de la producción de maní se destina al complejo oleaginoso, maní para la industria aceitera para consumo humano y harinas para el consumo animal, y otra al sector de frutas secas como maní confitería para el consumo humano. En la actualidad, aproximadamente 20% de la producción se destina a la industria aceitera y 60% se destina a la elaboración de maní tipo confitería.

Las exportaciones abarcan desde maní confitería incluyendo maní blanqueado (sin piel) hasta productos con mayor grado de industrialización como aceite de maní, manteca y pasta de maní además de otros subproductos para alimentación animal como pellets y expellers. Argentina, además, es el primer exportador mundial de aceite de maní.

El producto exportado a la Unión Europea se utiliza como materia prima para la elaboración de snacks, golosinas, salsas y platos

Introducción

preparados. Los países con importaciones de mayor relevancia dentro del grupo son Alemania, Reino Unido y España.

Aproximadamente 65% de las importaciones de maní de la UE provienen de Argentina. La mayor parte, según datos estadísticos, es en los Países Bajos, dado que las exportaciones ingresan por el puerto de Rotterdam y desde allí la mercadería es distribuida a los países dentro del bloque (Cámara Argentina del Maní, 2015).

Entre 2007 y 2012 los envíos de maní hacia los Países Bajos se incrementaron un 76%. En 2012 se exportaron 89 mil toneladas a un valor de US\$ 148 millones. Actualmente las exportaciones de maní a ese destino representan el 40% del total de envíos de maní confitería, posición que se ha mantenido a lo largo de los últimos 5 años.

En el siguiente gráfico se puede observar la evolución de las exportaciones del sector desde el año 2007 al 2012 (Cámara Argentina del Maní, 2015).

Introducción

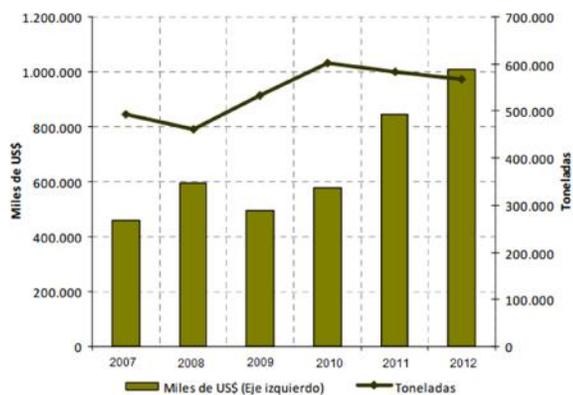


Figura 1: Evolución de las exportaciones del complejo maní argentino - (Cámara Argentina del Maní, 2015).

La UE es un mercado tradicional y se espera que su demanda se mantenga en el tiempo en línea con los patrones de consumo local. Este factor sumado al avance en la relación comercial que sostiene con el sector exportador de maní en Argentina y el cumplimiento de las exigencias del mercado europeo en términos de calidad y sanidad, han fortalecido la relación comercial y las perspectivas de mercado para las exportaciones nacionales.

Respecto a otros subproductos, el aceite crudo de maní y sus fracciones, el principal importador es China con una participación de 61% del total, seguida por Francia, Holanda, Estados Unidos y Hong Kong, con participaciones de 16%, 12%, 6% y 5% respectivamente.

Introducción

Para pasta o manteca de maní entre otros preparados, el principal destino son los Países Bajos. El 27% del total exportado se destina allí, luego el 9% se dirige a Estados Unidos, el 7% a Rusia, el 5% a Brasil y el restante 5% a Francia.

Para pellets y expellers de maní Chile concentra el 79% de las exportaciones argentinas, seguido por Canadá con 13% y Uruguay con 3%.

Solamente un 10% de la producción nacional se destina para el mercado interno.

Estos datos reflejan la importancia que tiene el sector en Argentina. La región productora de maní se localiza en el centro sur de la provincia de Córdoba, y hay muchas localidades que sostienen sus economías gracias a esta agroindustria. Directa e indirectamente el sector, conformado por 24 empresas, genera más de 12.000 puestos de trabajo, además de sectores vinculados como los agroquímicos, fabricación de equipos y maquinaria específica, laboratorios de control de calidad y certificación de cargas, transporte, ingeniería y tecnología agro-industrial, construcción, comunicaciones e informática para la exportación del complejo, etc. con lo cual lo convierte en una verdadera economía regional (Ackermann, 2008).

Introducción

El maní representa más del 10% del total del monto de las exportaciones de la Provincia de Córdoba, alcanzando volúmenes de exportación cuya facturación supera los 1.000 millones de dólares. El volumen de estas exportaciones significó el 1,5% del total de las exportaciones argentinas de cereales del año 2013 (Cámara Argentina del Maní, 2015).

El maní de Córdoba ha logrado la certificación de origen a través de la ley provincial 10.094/12, que es un es un sello de calidad que brinda garantías de un producto cultivado bajo normas de aseguramiento de la calidad y sustentabilidad social, ambiental y económica como las buenas prácticas agrícolas. La industria manisera, está desarrollada totalmente al mercado de exportación, por lo cual implementa y certifica diferentes normas y estándares de calidad internacionalmente reconocidos.

La producción anual de la campaña 2013/2014 fue de 997.225 toneladas de maní con cáscara con un área sembrada de 383.116 hectáreas con un rendimiento de 26,4 qq/ha y 672.894 toneladas de granos de maní (Bolsa de Cereales de Córdoba, 2015).

Recientemente, en la campaña 2014/2015 la producción nacional se incrementó significativamente, a pesar de una menor

Introducción

superficie sembrada, 6% menos que la campaña anterior, alcanzando 322.700 has, debido a condiciones climáticas favorables que aumentaron notablemente los rendimientos en campo en un 28%, alcanzando 34,6 qq/ha, y logrando de esta forma 1.102.200 toneladas de maní con cáscara y 778.700 toneladas de granos de maní (Bolsa de Cereales de Córdoba, 2015).

En el año 2002 la producción anual de maní fue de 362.000 toneladas, lo que representa desde entonces un incremento del 204%.

En el mundo, el principal problema que tiene el maní es la presencia de micotoxinas, específicamente aflatoxinas, y es por ello que muchos países han adoptado legislación para afrontar este problema en defensa de los consumidores.

1.2 Micotoxinas

Las micotoxinas son un grupo muy amplio de metabolitos secundarios de origen fúngico caracterizados por presentar una elevada toxicidad tanto para el hombre como para los animales, toxicidad que puede variar desde el desarrollo de actividades carcinógenas, teratógenas o mutágenas, hasta la producción de desórdenes de tipo hormonal o inmunosupresor, dependiendo de la micotoxina considerada (Bennet y Klich, 2003).

Introducción

Estas micotoxinas se producen en los alimentos bajo determinadas condiciones ambientales físicas, (FAO, 2009; Bennett y Klitch, 2003; D' Mello, 1997) principalmente de humedad y temperatura, incidiendo además las condiciones químicas como el pH, la disponibilidad de nutrientes, el nivel oxígeno y de ciertas condiciones biológicas como ser presencia de daño físico en la materia prima, esporas de hongos, presencia de invertebrados, cepas específicas, entre otras (Sforza et al., 2005). Los hongos micotoxigénicos implicados en la cadena alimentaria pertenecen básicamente a los géneros *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*, y son capaces de producir un síndrome tóxico por la ingestión de las micotoxinas producidas denominado micotoxicosis (Van Egmond et al., 2007).

Las micotoxinas son compuestos policetónicos resultantes de las reacciones de condensación, que tienen lugar cuando se interrumpe la reducción de los grupos cetónicos, durante la biosíntesis de los ácidos grasos, realizada por los hongos. Estos ácidos grasos son metabolitos primarios utilizados por los hongos como fuente de energía. Las micotoxinas se suelen formar al final de la fase exponencial o al principio de la fase estacionaria del crecimiento de los hongos toxigénicos (Gimeno y Martins, 2006), ya que no son necesarias para el crecimiento

Introducción

de los mismos pero contribuyen al mantenimiento del organismo en su ambiente natural (Georgianna y Payne, 2009).

Los cultivos en las áreas tropicales y subtropicales son los más expuestos a la contaminación con micotoxinas, dado que la elevada temperatura y humedad brindan condiciones óptimas para la formación de estos metabolitos. Además de esto, las prácticas inapropiadas durante la recolección, el transporte, el acondicionamiento y el almacenamiento pueden contribuir al crecimiento de los hongos o incrementar el riesgo de producir micotoxinas (Rubio Martínez, 2011, Bahat y Basanti, 2003).

Se estima que aproximadamente un 25% de los cultivos mundiales de granos, dentro de los que se encuentran muchos alimentos básicos, se ven afectados por hongos productores de micotoxinas (FAO, 2009).

Las micotoxinas son perjudiciales para los vertebrados cuando son absorbidas a través de la ingestión, inhalación, o absorción dérmica. Se ha demostrado que la ingestión de alimentos contaminados es la principal causa de intoxicación en animales y humanos. (Milicevic et al., 2010).

Actualmente hay más de 300 micotoxinas conocidas, pero de ellas solo hay aproximadamente diez compuestos que tienen impacto

Introducción

toxicológico sobre la salud humana. (Arroyo Manzanares et al, 2014). Una micotoxina se considera "*importante*" si se ha demostrado su capacidad para causar efectos considerables sobre la salud de las personas o afectar la productividad de los animales en diversos países. (FAO, 2003)

Entre ellas, las aflatoxinas (AFs), las ocratoxinas, fumonisinas, tricotecenos (deoxinivalenol), y zearalenona (ZEA) son las micotoxinas más ampliamente estudiadas. Estas micotoxinas han mostrado estar asociadas a efectos cancerígenos, inmunotóxicos, mutagénicos en animales y seres humanos (Moss, 1996).

En 1993 la aflatoxina AFB1 fue clasificada por la Agencia Internacional de Investigaciones sobre Cáncer como perteneciente al Grupo 1: cancerígena en humanos (IARC, 2002).

En la figura 2, se reflejan los hongos y micotoxinas considerados importantes mundialmente (Miller, 1994).

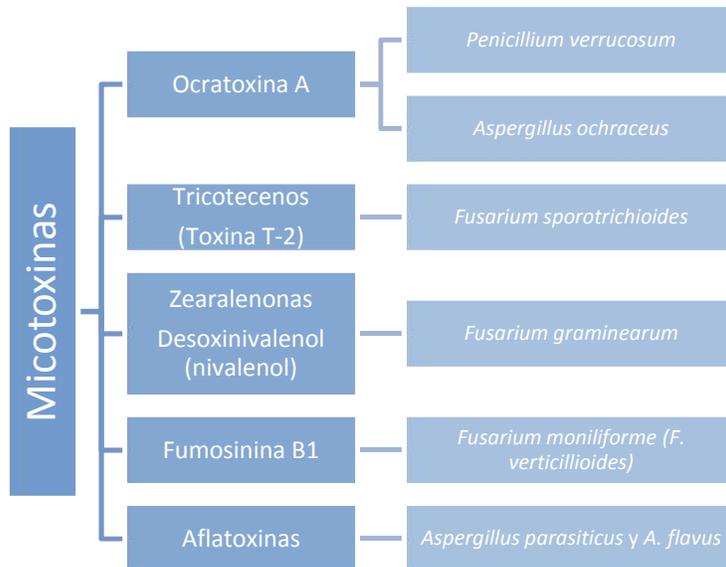


Figura 2: Micotoxinas de mayor importancia mundial y los correspondientes hongos toxigénicos productores. Adaptado de Miller (1994).

1.3 El cultivo de maní en Argentina

El maní es una leguminosa tropical que crece en un amplio rango de condiciones ambientales, desde los 40° latitud norte hasta los 40° latitud sur (Ketring et al, 1982). Existe un reconocimiento general que el cultivo requiere temperaturas cálidas para el crecimiento y desarrollo (Bell et al, 1992).

La temperatura es el factor determinante de la tasa de desarrollo del maní, y el crecimiento ocurre, generalmente, entre los 20°C y 35°C,

Introducción

aunque la temperatura mínima es inferior a estos valores, estimándose que para la mayoría de los estadios fenológicos estos valores oscilan entre 9°C y 11°C (Ketring et al, 1982).

A medida que avanza el desarrollo del cultivo, el efecto de la temperatura sobre el crecimiento de la parte foliar es menor.

La temperatura óptima para la germinación es de 29°C, y la tasa disminuye significativamente a medida a temperaturas más bajas hasta 11°C. Las temperaturas mínimas son las que influyen la emergencia de las plántulas (Davidson et al 1991). La temperatura máxima a la cual se obtiene germinación es de 36,5°C (Mohamed et al, 1988)

Mayoritariamente en Argentina los cultivares son de la variedad *granoleico*, donde la elevada relación de los ácidos grasos oleico y ácido linoleico otorga a estos granos mayor vida útil, disminuyendo la incidencia de la oxidación lipídica del aceite, y tienen un ciclo en campo que varía entre 140 y 160 días.

Antes de la siembra, la semilla se cubre exteriormente por una película de fungicida que la protege de los organismos patógenos presentes en el suelo durante la germinación y desarrollo de las plántulas.

Introducción

El calendario de producción implica labores para el productor según el calendario detallado en la figura 3.

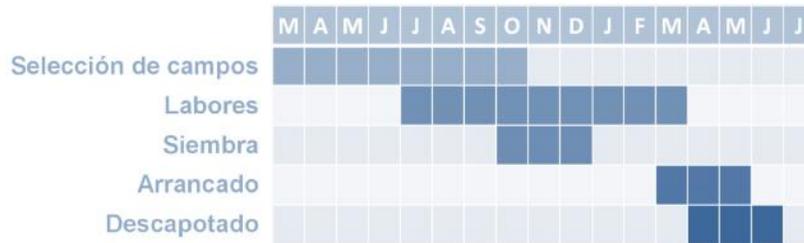


Figura 3: Calendario de producción de maní en Argentina

La selección de los campos es una etapa importante ya que tendrá un efecto sobre el cultivo y su calidad. Los suelos livianos con buen drenaje, de textura arenosa, profundos, libre de sales y de reacción ligeramente ácida (pH 5,8 a 6,5) son los mejores para la producción de maní (Pedelini, 2008).

El maní tiene varios mecanismos fisiológicos para evitar los efectos de la sequía y un sistema radicular muy extendido, que le permiten la búsqueda de agua en profundidad. Sin embargo, para mantener el rendimiento y la calidad durante los años muy secos o cuando las lluvias son insuficientes en los periodos críticos del cultivo, el riego complementario puede ser primordial.

Introducción

Para lograr el máximo rendimiento, el maní requiere un adecuado nivel de humedad durante todo el ciclo. Sin embargo, algunos periodos del crecimiento y desarrollo son más críticos que otros (Pedelini, 2008, Beasley et al, 2002).

Hay tres periodos en el ciclo del cultivo en los que el estrés por sequía pueden causar pérdidas significativas en el rendimiento o la calidad del maní producido (Beasley et al, 2002).

1) Desde la siembra hasta los 50 días (germinación y crecimiento vegetativo inicial)

2) Desde los 50 a los 110 días después de la siembra (floración, clavado, formación de vainas y llenado de granos).

3) Desde los 110 días hasta la cosecha, donde disminuye la necesidad de agua, pero la combinación de sequía con altas temperaturas aumenta el riesgo de contaminación por hongos y posible ocurrencia de aflatoxinas.

Un buen nivel de humedad en la germinación favorece la implantación del cultivo y asegura el efecto de los plaguicidas que recubren la semilla.

Por otro lado, si en el desarrollo vegetativo falta algo de humedad, el maní la tolera sin problemas. Sin embargo, es fundamental que haya un correcto nivel de humedad durante el estadio de desarrollo

reproductivo, el que comienza con la floración y sigue con el clavado, formación de vainas y de granos. La exigencia de agua es máxima durante este periodo, y mayor la respuesta al riego. Mientras tanto, en el periodo comprendido desde la madurez óptima hasta la cosecha, las exigencias de agua disminuyen. Es decir, una combinación de sequía con elevada temperatura durante este lapso, favorece la contaminación con aflatoxinas, afectando más la calidad que el rendimiento (Pedelini, 2008).

La cantidad de agua requerida por el maní durante todo el ciclo depende de las condiciones ambientales, incluyendo temperatura, lluvias, vientos y humedad relativa. Para que el maní pueda expresar todo su potencial de rendimiento, necesita entre 600 a 700 mm de agua bien distribuidos en el ciclo de cultivo (Pedelini, 2008).

1.3.1 Etiología de *Apergillus*

El *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius* y *A. tamarii* están ampliamente distribuidos en áreas agrícolas de baja elevación entre las latitudes 35°norte a 35°sur, formando parte de la biota del suelo. *A. parasiticus* parece estar más adaptado al ambiente del suelo y *A. flavus* al aire, encontrándose frecuentemente en semillas (Horn et al., 1994)

Introducción

En la región productora de maní en la provincia de Córdoba, se observaron diferencias en la densidad de *A. flavus* y *A. parasiticus* según sitio y especie, pero una alta proporción de cepas aisladas, mayor al 40% produjeron esclerocios en condiciones de cultivo in vitro. El nivel de infección tuvo una relación directa con el inóculo en el suelo (Barros et. al., 2003; Barros et. al. 2005)

Además en Argentina se han constatado diferencias entre especies cultivadas respecto a la capacidad toxigénica de *A. flavus* y *A. parasiticus*. En maní se encontró mayor incidencia de cepas aflatoxigénicas que en trigo y soja, y también se observó que algunas cepas son capaces de producir simultáneamente ambas toxinas en todos los sustratos (Barros et. al. 2006)

1.3.2 Ocurrencia de *Aspergillus* en el cultivo de maní en Argentina

La infección por *Aspergillus* puede ocurrir en diferentes estados fenológicos y órganos del maní, tales como las flores o ginóforos aéreos (Sanders et al. 1984) pero más frecuentemente en el tálamo, parte de la flor donde concurren el androceo y el gineceo, después de la penetración en el suelo y durante el desarrollo de los frutos y las semillas (Diener et al., 1982)

Introducción

La temperatura del suelo en el período de desarrollo de los frutos es muy importante para la invasión de *A. flavus* y *A. parasiticus* y la subsecuente contaminación con aflatoxinas (Cole et al., 1982). La temperatura óptima para el crecimiento de estos hongos es de 25°C a 34°C (Hill et al. 1985) mientras que para la producción de aflatoxina los valores son de 26°C a 31°C y de 25°C a 27°C al finalizar el ciclo (Blankeship et al., 1984). El pico de contaminación se alcanza con 30°C (Hill et al., 1985).

La contaminación por *A. flavus* es favorecida por el estrés hídrico, que modifica la temperatura del suelo. En esta condición la planta reduce el volumen del canopeo permitiendo el mayor pasaje de radiación hacia el suelo, lo que aumenta la temperatura de este y consecuentemente de los frutos (Sanders et al., 1984)

Además el estrés hídrico durante el desarrollo produce fisuras en el pericarpio y cotiledones, con la consecuente salida del contenido celular lo que favorece la colonización fúngica (Young et al, 1993). Se observa mayor infección y contaminación con *A. flavus* cuando se producen déficit hídricos durante el llenado de granos con temperaturas próximas al óptimo para el desarrollo de este hongo (Craufurd et al., 2006)

Los suelos arenosos que tienen menor capacidad de almacenamiento de agua son más susceptibles al estrés hídrico y consecuentemente más favorables al desarrollo de estos hongos (Graham, 1982)

1.3.3 Condiciones de producción de aflatoxinas

Las condiciones más importantes para el crecimiento y la producción de micotoxinas son la temperatura y la actividad de agua (aW). La aW óptima para la proliferación de *A. flavus* es alta (alrededor de 0,99); el valor máximo es al menos 0,998 y el mínimo de 0,82 (Pitt et.al. 1991).

En general, parece que una aW alta favorece la producción de toxinas. Se ha informado que *A. flavus* puede proliferar a temperaturas de 10°C hasta 43°C. La tasa de crecimiento óptima, hasta 25 mm al día, se produce a una temperatura ligeramente superior a 30°C. *Aspergillus flavus* produce aflatoxinas en el intervalo de temperaturas de al menos 12°C a 37°C con una temperatura óptima para la producción de toxinas, entre 30°C y 33°C. (Gimeno y Martins, 2006).

Las pautas de comportamiento del *A. parasiticus* son similares, aunque la aW óptima para su crecimiento es inferior a 0,83, y para la

Introducción

producción de toxinas es de 0,87, con unas temperaturas entre 28 y 30°C (Soriano del Castillo, 2007; Pitt y Miscamble 1995).

El pH óptimo para el crecimiento de estos hongos oscila entre 3,5 y 5,5. Otro factor que influye en su crecimiento y en la síntesis de aflatoxinas es la composición gaseosa ambiental. Los hongos aerobios dependen del oxígeno y su crecimiento se detiene a concentraciones de CO₂ del 25%, mientras que se concentraciones de al menos 50% detienen la síntesis de aflatoxinas (Giorni et al., 2008)

Bajo determinadas condiciones de temperatura y actividad de agua, *A. flavus* produce aflatoxinas del tipo B, mientras que *A. parasiticus* y *A.* es capaz de producir tanto la B como la G. *Aspergillus flavus* es un contaminante habitual en agricultura, y otras especies como *A. bombycis*, *A. ochraceoroseus*, *A. nomius* y *A. pseudotamari* también son productoras de aflatoxinas, pero se encuentran con menos frecuencia (Bennett et al, 2003).

En las siguientes tablas 1 y 2 se resumen las condiciones de temperaturas óptimas para el crecimiento y formación de aflatoxinas.

Tabla 1: Rango de temperatura para el crecimiento fúngico.

Rango de temperatura para el crecimiento fúngico (°C)			
	Mínimo	Óptimo	Máximo
<i>Aspergillus Flavus</i>	10-12	25-35	42-43
<i>A. Parasiticus</i>	10-12	32-35	42-42
<i>A. Ocharaceus</i>	8	24-37	37

Tabla 2: Rango de temperatura para la formación de micotoxinas.

Rango de temperatura para la formación de micotoxinas (°C)			
	Mínimo	Óptimo	Máximo
<i>Aspergillus Flavus</i>	12-15	30-33	37-40
<i>A. Parasiticus</i>	12	33	40
<i>A. Ocharaceus</i>	12-15	25-31	37

1.3.4 Suelos

El cultivo de maní tiene requerimientos edáficos muy particulares en razón de su fructificación subterránea, y es en función de estos requerimientos que el maní requiere suelos livianos, de textura arenosa a franco arenosa, con alto porcentaje de arcilla, blandos a friables, no plásticos y no adhesivos, bien drenados y con buenas condiciones físicas para el clavado y desarrollo del fruto (Fernández y Giayetto, 2006).

Las condiciones biológicas que reduzcan la incidencia de enfermedades del suelo, como aquellas dadas por la rotación de cultivos, el incremento de materia orgánica la disminución de la erosión hídrica y

Introducción

eólica y balance adecuado de nutrientes son las apropiadas para el cultivo (Fernández y Giayetto, 2006).

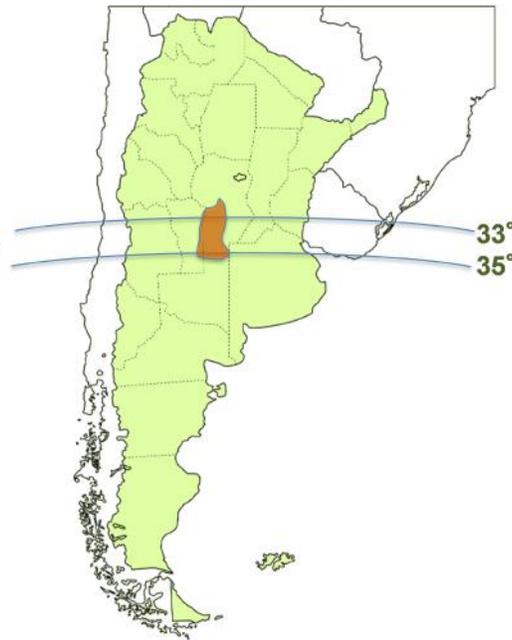


Figura 4: Área geográfica del cultivo de maní en Argentina – (Adaptado de Fernández y Giayetto, 2006).

Tradicionalmente el cultivo de maní se concentró en el centro norte provincial en suelos limo-arenosos (ver figura 4), y actualmente la siembra en estas regiones ha sido reemplazada por el cultivo de soja, desplazando hacia el sur el cultivo de maní con suelos más arenosos aunque de comportamiento limoso. Este desplazamiento del cultivo continúa hacia el sur provincial, en razón de un creciente deterioro físico y biológico de los suelos (Cisneros et.al., 1998) y de la fuerte expansión

Introducción

de la soja como cultivo de menores costos, mayor seguridad de cosecha y menor incidencia de las enfermedades del suelo (Fernández y Giayetto, 2006).

Los suelos arenosos, con menor historia de uso agrícola y mayor historial de pasturas aunque con menor contenido de materia orgánica y menor riqueza en nutrientes, son los que han logrado buenas respuestas productivas en razón de su mejor calidad físico-química y biológica.

Esto se puede observar en la última campaña, en donde, en la región sur, la cual históricamente presenta rendimientos más bajos, ha sido mostrado rendimientos superiores a niveles hídricos similares, según se observa en la figura 5.



Figura 5: Rendimientos de maní. Campaña 2014/2015 en qq/ha. (Bolsa cereales de Córdoba, 2015)

1.3.5 Resistencia del cultivo a la infección por *Aspergillus*

En el maní, el pericarpio y el tegumento de la semilla son una barrera natural a la penetración de *A. flavus* (Zambettakis, 1975), es por esto que es importante evitar los daños mecánicos durante el arrancado, descapotado y cosecha.

Diferentes genotipos de maní presentan diferencias en las estructuras debido a características físicas o químicas que los hacen en mayor o menor medida resistentes a la invasión de *A. flavus*. El pericarpio es fácilmente invadido por este hongo en los estadios iniciales del crecimiento del fruto, pero es menor en aquellos cultivares que presentan bandas de esclerénquima que se forman en los estadios iniciales (Pettit et al, 1989).

El tegumento es la otra barrera contra la invasión, los genotipos que tienen los hilos cubiertos y gruesas disposiciones cerosas, son más resistentes a la misma y aquellos que presentan imperfecciones o daños son más susceptibles a este hongo (Zambettakis, 1976)

El crecimiento del hongo es dificultado cuando el tegumento es compacto, más grueso y está adherido a los cotiledones (Fernandez et. al.,1997)

Introducción

Por otra parte, el tegumento regula la tasa de intercambio de agua en la semilla, y las variedades que tienen menor tasa de absorción y mayor tasa de secado son más resistentes a la invasión por *A. flavus* (Ketring, et. al, 1976)

En cuanto a la influencia química sobre el crecimiento de *Aspergillus spp.* y la formación de aflatoxinas, puede ser debida a compuestos presentes en el tegumento. Las variedades de tegumento claro son más susceptibles a la invasión por *A. flavus* (Sanders et al, 1979) y *A. parasiticus* (Singh et. al, 1992) y tienen menor contenido de taninos; éstos en alta proporción inhiben el crecimiento de este hongo y la producción de aflatoxinas. La presencia y composición de carbohidratos en el tegumento pueden influenciar la resistencia (Amaya et al, 1980). También mayor contenido de calcio en el tegumento disminuye el crecimiento fúngico (Pitt et al, 1991) cuando este nutriente influencia el espesor del mismo (Fernandez et. al.,1997).

En condiciones naturales la planta produce *fitoalexinas*, flavonoides de bajo peso molecular, que se sintetizan en los vegetales después de una infección microbiana y que inhiben la germinación de las esporas y el crecimiento de las hifas, principalmente en frutos y semillas inmaduros (Arora y Strange, 1991)

Los cultivares difieren en su respuesta a la colonización de *Aspergillus spp* y la formación de aflatoxina. Las variedades más resistentes, retardan la colonización que ocurre después de la formación de los granos (Fernandez, et al 2006).

1.4 Aflatoxinas

Aunque se han aislado 17 aflatoxinas, sólo 4 de ellas han sido ampliamente estudiadas debido a su toxicidad las AFB1 y AFB2 y las AFG1 y AFG2. Otras dos aflatoxinas, AFM1 y AFM2 son metabolitos presentes en la leche de animales expuestos a AFB1 y AFB2. De todas ellas, la aflatoxina AFB1 es la más tóxica para varias especies (OMS, 1979).

Otros metabolitos tales como AFB2a, aflatoxicol, H1 aflatoxicol y aflatoxinas P1 y Q1 han sido identificados estar presentes en alimentos (FDA, 1979). La AFM es un metabolito hidroxilado de la AFB1 secretada en la leche de los animales que consumen piensos contaminados con AFB1 (Wilson, 1995).

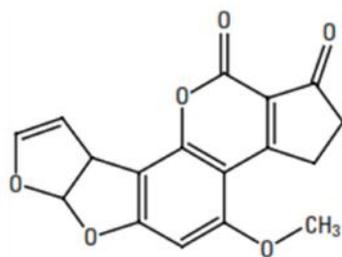
Aunque las aflatoxinas AFB1, AFB2 y AFG1 son comunes en la misma muestra de alimento, AFB1 predomina (60-80% del contenido total de aflatoxinas). Generalmente AFB2, AFG1 y AFG2 no están presentes en ausencia de AFB1. En la mayoría de los casos AFG1 se

Introducción

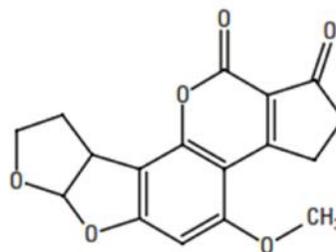
encuentra en concentraciones más altas que AFB₂ y AFG₂ (Panda y Metha, 2013).

Los pesos moleculares de las aflatoxinas oscilan entre 312 y 350 Daltons (tabla 3), y todas contienen en su molécula una mitad dihidrofurano unida a un anillo cumarina y son fuertemente fluorescentes (AFBlue-azul o AFGreen-verde) bajo luz ultravioleta, habiéndose aprovechado esta propiedad como base de los procedimientos analíticos (Rubio Martinez, 2011, Soriano et al., 2007; Bennett, 2003;).

En el gráfico siguiente se observan las estructuras de las cuatro principales aflatoxinas.



AFB₁



AFB₂

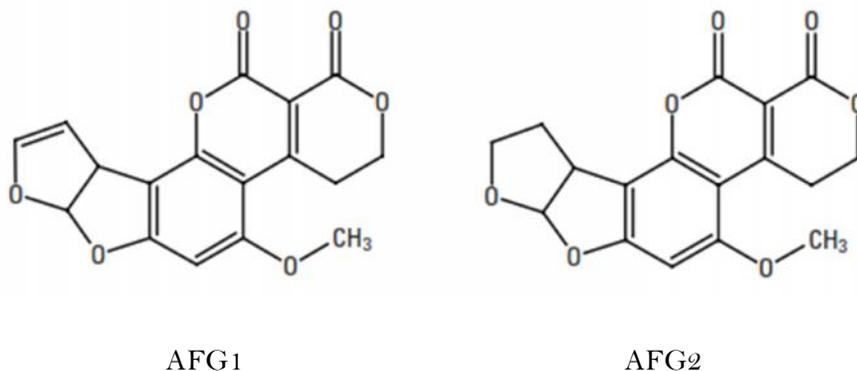


Gráfico 6: Estructura de las aflatoxinas más importantes que contaminan alimentos

Tabla 3: Propiedades físicas y químicas de los compuestos de aflatoxinas

	AFB1	AFB2	AFG1	AFG2
Fórmula molecular	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	C ₁₇ H ₁₄ O ₇
Peso molecular (daltons)	312	314	328	330
Cristales	Amarillos	Amarillos	Sin color	Sin color
Punto de fusión (°C)	268,9	286,9	244,6	237,4
Fluorescencia bajo luz UV	Azul	Azul	Verde	Verde
Solubilidad	Solubles en agua y solventes orgánicos polares. Solventes normales: metanol, agua, acetonitrilo, ácido trifluoroacético, metanol y acetona.			

1.4.1 Estructura y toxicidad

Químicamente, las aflatoxinas son difuro-cumaro-lactonas. Su estructura se compone de un anillo bifurano fusionado a un núcleo de cumarina con un anillo pentenona (en aflatoxinas B y M) o un anillo de seis radicales lactona en las aflatoxinas AFG. Los cuatro compuestos,

Introducción

AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂, están separados por el color de su fluorescencia bajo la acción de la luz ultravioleta (Devero, 1999).

El furano de la estructura de las aflatoxinas es esencial para la actividad tóxica y cancerígena, además de la presencia del doble enlace en el anillo furano terminal que es un determinante de los efectos agudos y crónicos (Wogan et al., 1999). Sumado a esto, la AFB₁, tiene propiedades anticoagulantes que se las aporta la cumarina (Bababunmi y Bassir, 1969).

Bajo determinadas condiciones de pH y aW, la enzima fúngica policétido sintasa tipo A (PKS-A), junto con dos subunidades de ácido graso sintasa especializadas (FAS-1 y FAS-2), forman un complejo para sintetizar el ácido norsolorínico, primer intermediario de la biosíntesis de AFB₁ (Minto y Townsend, 1997).

Estos cuatro compuestos, AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂, fueron aislados originalmente por grupos de investigadores en Inglaterra (Nesbitt et al., 1962). La fórmula molecular de la aflatoxina AFB₁ fue establecida como C₁₇H₁₂O₆ y de aflatoxina G₁ como C₁₇H₁₂O₇; aflatoxinas AFB₂ y AFG₂ se encontró que eran los derivados dihidro de los compuestos parentales, C₁₇H₁₄O₆ y C₁₇H₁₄O₇ (Hartley et al., 1963).

Introducción

La AFB1 es la más tóxica que se conoce, seguida de la AFM1 (derivado metabólico de la B1). La dosis letal aguda de AFB1 para humanos adultos está comprendida entre 10 y 20 mg de aflatoxinas (Pitt, 2000), y en concreto, Gimeno y Martins (2006) han descrito una TD_{50} (dosis de aflatoxinas con la que el 50% de los individuos pueden desarrollar tumores malignos) por peso corporal y día de 1,15 $\mu\text{g} / \text{kg}$ de AFB1, y una Ingesta Diaria Tolerable (TDI) de 0,11-0,19 ng/kg . Sin embargo, para las distintas especies animales como la ovina, porcina, canina, etc., varía entre 0,3 y 17,9 mg / kg de peso vivo, siendo la rata, la especie más resistente (Patterson, 1972). La toxicidad es tan elevada que existen evidencias de que las aflatoxinas podrían haber sido producidas en grandes cantidades por científicos iraquís durante la década del 80 para ser utilizadas como armas biológicas (Stone, 2001).

Las aflatoxicosis o enfermedades causadas por la ingestión de aflatoxinas, pueden ser agudas y causar hasta la muerte, o crónicas, dando lugar a cáncer o inmunosupresión (Hsieh, 1988). Dentro de los efectos agudos se han descrito los síndromes de *Kwashiorkor* y de *Reye* que afectan a niños produciendo una severa malnutrición, encefalopatía y degeneración grasa de las vísceras, respectivamente (Hendrickse, 1997; Hayes, 1980). Estas micotoxinas pueden reaccionar con el ADN, dando

Introducción

lugar a lesiones pro-mutagénicas que provocan la activación de proto-oncogenes y la inactivación de genes supresores de tumores (Kensler et al., 2003).

Además las aflatoxinas son genotóxicas, teratogénicas y poseen efectos que afectan la nutrición (Wangikar et al., 2005; Williams et al., 2004).

Las dos vías de la exposición a las aflatoxinas que se han identificado son:

a. La ingestión directa de aflatoxinas (principalmente AFB1) en los alimentos contaminados de origen vegetal, tales como frutos secos de subproductos

b. La ingestión de aflatoxinas a través de la leche y los productos lácteos, donde aparecen principalmente como AFM1. Además residuos de aflatoxinas pueden estar presentes en los tejidos de animales que consumen alimentos contaminados (OMS, 1979). Se han encontrado residuos de aflatoxinas en los tejidos animales, huevos y aves tras la ingestión experimental de piensos contaminados con aflatoxinas (Rodricks y Stoloff, 1977).

El hígado es el órgano primario afectado por la toxicidad y carcinogenicidad de las aflatoxinas (Abdel-Wahhab et al., 2007). Los

primeros síntomas de la hepatotoxicidad ocurren a nivel proteico y pueden confundirse por otras muchas toxemias, con manifestaciones de anorexia, malestar general y fiebre baja. Las aflatoxicosis pueden progresar a hepatitis aguda potencialmente mortal con vómitos, dolor abdominal y finalmente muerte (Etzel, 2006; Krishnamachari et al., 1975). En poblaciones expuestas como las de Asia y África occidental, la infección por el virus de la hepatitis B puede enmascarar la relación entre la ingestión de aflatoxinas y el cáncer de hígado (Wogan, 1999). A pesar de que los controles han aumentado, no deja de ser un problema de actualidad, con ocurrencia de brotes de aflatoxicosis agudas en el continente africano y en otras áreas en donde no se llevan estadísticas, causando numerosos enfermos crónicos y casos de muertes (Azziz-Baumgartner et al., 2005; Lewis et al., 2005).

1.4.2 Metabolismo

La absorción ocurre en el tracto gastrointestinal, sin embargo, después de la absorción, la mayor concentración de la toxina se encuentra en el hígado (Mintzlaff et al., 1974).

Tradicionalmente se ha conceptualizado que este proceso se produce en dos fases conocidas como fase I y fase II. La fase I consiste principalmente en el metabolismo de hidrólisis, reducción y oxidación

Introducción

reacciones mediadas por enzimas, mientras que el metabolismo de fase II implica reacciones de conjugación del compuesto original o el compuesto modificado por una reacción en fase I anterior (Mejía-Teniente, 2011).

La AFB1 es bioactiva a través de las citocromos P450 a un metabolito electrofílico altamente reactivo e inestable que una vez formado reacciona con macromoléculas, especialmente con el ADN. Este metabolito, conocido como aflatoxina-8,9-epóxido (AFBO) es capaz de unirse a los residuos de guanina de los ácidos nucleicos causando alteraciones irreversibles que pueden llevar a carcinogenicidad, mutagenicidad y teratogenicidad (Do et al, 2007; Eaton y Gallagher, 1994; Ferguson et al, 2008; Verma, 2004). La biotransformación de la AFB1 se inicia en las enzimas citocromo P450 (CYP450) donde sufre oxidación a AFBO. La forma epóxido puede conjugarse con glutatión para continuar con la vía de detoxificación o ser hidrolizada por una epóxido hidrolasa para generar un hidrodíol (AFB1-8,9-dihidrodíol o dhd-AFB1), el cual puede reaccionar fuertemente con proteínas y tener efectos citotóxicos. En los casos en que el epóxido llega a conjugarse con glutatión, o la AFB1 no sufre epoxidación sino adición grupos hidroxilos y posterior conjugación con ácido glucurónico o sulfato, y los efectos tóxicos de la molécula se ven neutralizados (Eaton y Gallagher, 1994).

Introducción

Se han reconocido que tanto la CYP1A2 como la 3A4 son capaces de oxidar la AFB1 tanto a formas reactivas que incluyen la AFB1 endo-8,9-epóxido y AFB1 exo-8,9-epóxido, como a productos no activos que no son sustratos óptimos para epoxidación, como la AFM1, AFQ1 (Gallagher et al, 1996; Guengerich et al., 1998; Guengerich et al, 1996). En la figura siguiente se representan estas reacciones.

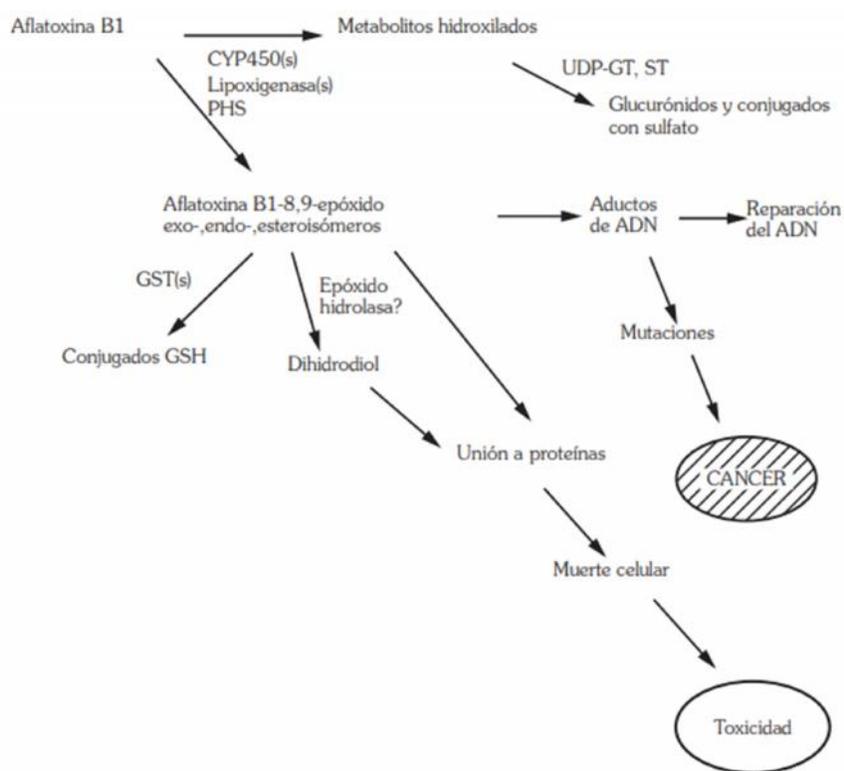


Figura 7: Etapas de la activación metabólica de la AFB1 y moléculas resultantes. (Adaptado de Rodríguez, 2010)

1.4.3 Alimentos contaminados por aflatoxinas

A pesar que la contaminación con aflatoxinas ha sido observada en diferentes *commodities*, la contaminación del maíz, el maní y las oleaginosas pueden ser consideradas, en términos de exposición según la dieta, las más importantes a nivel global (Benford et al., 2010).

La contaminación puede suceder en cualquier etapa del proceso productivo de alimentos, desde antes de la cosecha hasta el almacenamiento (Turner et al., 2009; Soriano del Castillo et al., 2007), en donde generalmente suelen aparecer los niveles más elevados (Moss, 2002).

En poscosecha, factores tales como la temperatura, disponibilidad de agua, el oxígeno y el dióxido de carbono, la infestación por insectos y roedores, que producen condiciones de calor y humedad, además de alterar físicamente los granos, la incidencia de granos sueltos, partidos o quebrados, la limpieza del producto, la carga de hongos toxigénicos, la competencia microbiana presente, son importantes para determinar la susceptibilidad a la contaminación.

El transporte, el tiempo de espera para el secado en condiciones de humedad elevada, el sistema y condiciones de secado (temperatura y velocidad de secado), y el almacenamiento, pueden incidir sobre estos

Introducción

factores durante el período de post-cosecha (Dorner, 2008; Diener et al., 1987; Molyneux et al., 2007; Campbell et al., 2006).

De acuerdo a cultivos realizados durante el período 2010/2012, algunas plantas productoras-exportadoras, si comparamos el cultivo de maní en la provincia de Córdoba y en la provincia de Salta, al noroeste del país, las mismas semillas de maní, en la misma campaña agrícola, debido a la incidencia del clima, el desarrollo de aflatoxinas es mayor en el noroeste. Esta misma situación ocurre en Brasil con el cultivo de maní, en donde por ejemplo, entre Junio de 2007 y Febrero de 2007, se halló que un 38% las muestras de maní de góndolas contenían aflatoxinas en rangos de concentración de 21 to 138 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (Rocha, 2008).

La ocurrencia e incidencia de las aflatoxinas durante el almacenamiento de maní en vaina se pudo verificar durante los controles de calidad del maní almacenado en celdas, si bien el muestreo del cereal estacionado dificulta la representatividad de las muestras.

La invasión por parte de los hongos aflatoxigénicos y la contaminación por aflatoxinas depende de la cantidad de inóculo de esporas en el campo, el posible estrés en la planta, las infecciones de invertebrados, los daños causados por otros hongos, la resistencia y nutrición mineral de la planta, los daños mecánicos, la elevada humedad

Introducción

o el insuficiente secado de los cultivos y la temperatura (Rubio Martínez, 2011) entre otros factores.

Es una práctica habitual en la industria, que se destinen aquellos granos de menor calidad, que representan entre un 10% y un 15% del total de los granos, para la industria aceitera. Estos granos de menor calidad, tienen un mayor porcentaje de granos dañados por insectos, granos con presencia de hongo interno o externos, granos descoloridos o manchados, sucios, arrugados, helados, entre otros, y la incidencia de las aflatoxinas en ellos es mayor.

Cuando el maní es convertido a aceite, por extrusado-prensado y/o extracción con solventes, el contenido de aflatoxinas se distribuye entre el expeller obtenido y el aceite crudo de acuerdo a la diferente solubilidad y polaridad de los componentes. Este expeller es usado para alimentación animal, ya sea directamente o previa conversión a pellets con mezclas de otros cereales.

Al ingerir los animales alimentos contaminados por aflatoxinas, éstas se transfieren a otra etapa de la cadena alimentaria. En el caso de los rumiantes, la ingestión durante largos períodos de tiempo afecta la producción de leche y carne, la reproducción y el crecimiento. (Hussein y Brasel, 2001). Los rumiantes, poseen la micro flora del rumen, que es

una barrera inicial, aunque no se puede afirmar que ésta sea capaz de degradar las aflatoxinas (Driehuis et al., 2010; Kiessling et al., 1984).

1.5 Legislación y vigilancia de las aflatoxinas

Mundialmente, al menos 99 países tienen reglamentos para las micotoxinas en los alimentos y/o en las piensos (FAO, 2003) según se puede observar en la figura siguiente.

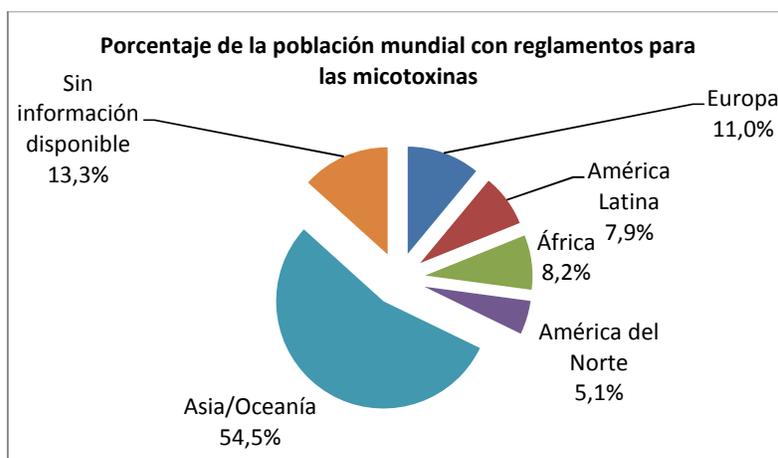


Figura 8: Países con reglamentación de aflatoxinas (FAO, 2003)

En África quince países cuentan con reglamentos específicos para las micotoxinas. En la mayoría de los países africanos, probablemente no existen reglamentos específicos para las micotoxinas pero el hecho de que los países carezcan de límites reglamentarios específicos para las micotoxinas no significa que se desconozca el problema. Muchos productores cultivan productos agrícolas para su propio consumo (agricultura de subsistencia), como sucede en muchos países africanos (FAO, 2003).

Introducción

Asia y Oceanía cubren una importante parte del globo, con la mayoría de países en las regiones tropical o subtropical, por lo que es de esperar que una parte de los importantes problemas resultantes de las micotoxinas sean causados por hongos que crecen a temperaturas superiores (Pitt y Hocking, 2006).

Una excepción es Nueva Zelanda, con un clima templado a fresco, que hace que sus problemas con las micotoxinas sean diferentes a los del Asia y el norte de Australia. Veintiséis países en Asia/Oceanía cuentan con reglamentos específicos para las micotoxinas. Los reglamentos para las aflatoxinas totales son los dominantes en los alimentos, en tanto que prevalecen en los piensos los reglamentos para la aflatoxina AFB1.

En Europa, 39 países, representando aproximadamente el 99 por ciento de la población del continente, cuentan con reglamentos específicos para micotoxinas. Comparativamente con otras regiones, Europa cuenta con los reglamentos para las micotoxinas en los alimentos más extensos y detallados (FAO, 2003).

En América Latina 19 países representan el 91 por ciento de la población de la región, cuentan con reglamentaciones específicas sobre micotoxinas. En el MERCOSUR, un bloque comercial integrado por

Argentina, Brasil, Paraguay, Uruguay y Venezuela existen reglamentos armonizados para las aflatoxinas.

En los Estados Unidos y en Canadá desde hace muchos años están vigentes reglamentos para las micotoxinas y se implementan técnicas avanzadas de muestreo y análisis. En ambos países, los límites para las aflatoxinas se han fijado para la suma de las aflatoxinas AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂.

1.5.1 Aflatoxinas totales en los alimentos

El límite de aflatoxinas totales en maní, que aparece con mayor frecuencia es de 4 µg/kg (aplicado por 29 países), un límite encontrado nuevamente en los reglamentos armonizados en la UE, la Asociación Europea de Libre Comercio y en los países candidatos a incorporarse a la UE donde están vigentes límites dobles tanto para la aflatoxina AFB₁ como para las aflatoxinas totales. Otro pico importante aparece en los 20 µg/kg, aplicado por 17 países, la mitad de ellos en América Latina (donde existe también un límite armonizado en el MERCOSUR) y en varios países del África. También los Estados Unidos, uno de los primeros en fijar un límite de acción para las aflatoxinas, se rigen por el valor de 20 µg/kg.

En la figura siguiente se puede observar la cantidad de países y los límites para el contenido de aflatoxinas totales expresados en µg / kg.

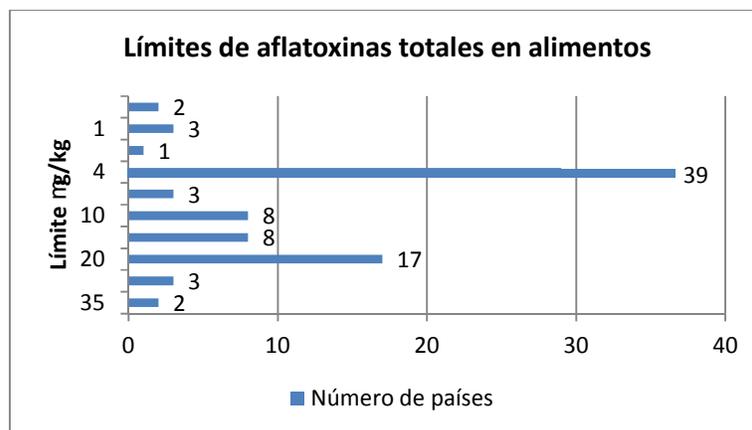


Figura 9: Límites para el contenido de aflatoxinas totales en $\mu\text{g}/\text{kg}$ (FAO, 2003)

1.5.2 Aflatoxina AFB₁ en los alimentos

Los niveles máximos tolerados para la aflatoxina B₁ en los alimentos están en el rango de 1 a 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$, con 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ como el límite vigente actualmente en por lo menos 29 países. La mayoría de estos países pertenecen a la UE. Otro valor límite importante es el de 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, seguido por 21 países de África, de Asia/Oceanía, de América Latina y de Europa. Los Estados Unidos y el Canadá no tienen un valor límite único para la aflatoxina AFB₁.

En la figura siguiente se observa el mismo gráfico para la aflatoxina AFB₁.

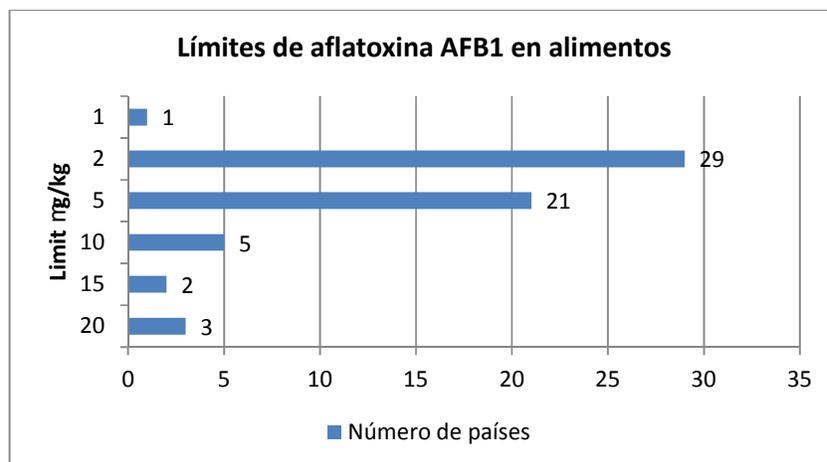


Figura 10: Límites establecidos para el contenido de AFB1 (FAO, 2003)

1.5.3 Codex Alimentarius

Establece en la “Norma General del Codex para los contaminantes y las toxinas presentes en los alimentos y piensos”, CODEX STAN 193-1995, los criterios de muestreo y el límite máximo de aflatoxinas en maní en 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (AFB1+AFB2+AFG1+AFG2) totales.

1.5.4 Argentina

Establece los límites de aflatoxinas totales en el Reglamento Técnico Mercosur sobre Límites Máximos de Aflatoxinas admisibles en Leche, Maní y Maiz (ANEXO I - MERCOSUR/GMC/RES. N° 25/02).

Para el maní sin descascarar, descascarado, crudo o tostado, pasta de maní y manteca de maní el límite de aflatoxinas totales (AFB1+AFB2+AFG1+AFG2) es de 20 µg/kg.

1.5.5 Europa

El reglamento 165/2010 de la Comisión Europea, establece el contenido máximo de aflatoxina AFB1 y el contenido máximo total de aflatoxinas (AFB1, AFB2, AFG1 y AFG2) en una serie de productos alimenticios incluido maní. El contenido máximo establecido de aflatoxina AFB1 es de 2 µg/kg y el contenido máximo total de aflatoxinas es de 4 µg/kg en todos los cereales y todos los productos derivados de los cereales. El maní y otras semillas oleaginosas, podrán comercializarse a condición de que los citados productos alimenticios no se destinen al consumo humano directo ni se utilicen como ingredientes de productos alimenticios y en tanto no superen los contenidos máximos de AFB1 de 8 µg/kg y un máximo total de aflatoxinas es de 15 µg/kg. Además deben someterse a un tratamiento que incluya un proceso de selección u otro tipo de tratamiento físico, y después de dicho tratamiento no superen los contenidos máximos establecidos y el tratamiento en cuestión no provoque la presencia de otros residuos nocivos. Sumado a esto, deben tener una etiqueta en la que figure

Introducción

claramente su uso y la indicación «*este producto será sometido a un proceso de selección u otro tratamiento físico para reducir la contaminación por aflatoxinas antes del consumo humano directo o de su utilización como ingrediente de productos alimenticios*». Esta indicación figurará en la etiqueta de cada bolsa, caja, etc. y en los certificados de calidad originales. El código de identificación de la partida o del lote deberá estar marcado de forma indeleble en cada bolsa, caja, etc. de dicha partida o de dicho lote y en el documento de acompañamiento original.

Para la alimentación animal en general, el límite para la AFB1 fue establecido entre 5 y 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ directiva 2003/100/CE. Dentro de esta reglamentación, si los piensos estuviesen destinados a alimentación del ganado lechero, el límite máximo es de 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y si fuese para terneras y corderos el límite máximo es de 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de AFB1.

1.5.6 Estados Unidos

La Food and Drug Administration (FDA) ha establecido un límite de 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para el comercio de piensos y alimentos entre estados.

En Estados Unidos la industria del maní es operada por el gobierno a través de un acuerdo comercial para el control de las aflatoxinas. Los productores de maní en caja entregan su stock en los “*buying points*” o puntos de compra en donde además de determinar el

grado, y se inspecciona visualmente (Lamb y Sternitzke, 2001) la presencia de hongos productores de aflatoxinas tales como el *A. flavus*. Estos resultados son factores determinantes de la calidad y el precio. Si uno o más granos en una muestra de 1800 gramos son encontrados con hongo, entonces el lote es clasificado como segregación 3, y el mismo es destinado a un proceso posterior o industria aceitera.

Los lotes que no tienen *A. flavus*, pero poseen más de 2% de granos dañados o más de 1% de granos con hongo, ardidados o descompuestos (RDM) son clasificados como segregación 2. La segregación 1 puede ser empleada como granos comestibles.

1.6 Datos estadísticos de ocurrencia de micotoxinas

En la Comunidad Europea existe un sistema de alerta rápida para piensos y alimentos (RASFF) a través del cual, la autoridad sanitaria informa inmediatamente de los riesgos para el consumidor que acaban de detectarse una vez arribados los contenedores con productos de diversos orígenes.

En el caso del maní de diferentes orígenes, un porcentaje determinado de contenedores que ingresan a Europa son muestreados y analizados de acuerdo al nivel de riesgos según el origen, tal cual lo establece en la regulación 323/2014. Para Argentina, el nivel de control

Introducción

según el reglamento 669/2009 era del 10%, en cambio de acuerdo con el reglamento 323/2014 que modifica los anexos I y II del reglamento 669/2009, por el que se aplica el reglamento 882/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo que respecta a la intensificación de los controles oficiales de las importaciones de determinados piensos y alimentos de origen no animal, en virtud de los resultados históricos, este nivel ha sido disminuido aún más según se puede observar en la tabla 4.

Tabla 4: Frecuencia de los controles físicos de maní de acuerdo al origen para ingresar a Unión Europea.

Origen	Frecuencia de los controles físicos
Argentina	10%
Brasil	50%
Ghana	50%
India	10%
Vietnam	10%

Para Argentina, esta información es canalizada a través del Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA). Este organismo, contacta al exportador para que justifique el desvío, si bien dispone, antes de la exportación de los resultados analíticos en cuanto al contenido de aflatoxinas, según lo establece en el art 1º de la resolución 436/2002, *Certificación de las exportaciones de maní con destino a la Unión Europea, en relación con su contenido de aflatoxinas.*

Introducción

En muchas ocasiones, el producto cumple con los límites establecidos, pero carece de la rotulación y/o documentación apropiada de acuerdo a la intención de uso, tal cual se establece en la resolución UE 1881/2006, en donde en el etiquetado y en los certificados analíticos emitidos debe leerse la leyenda antes mencionada.

La omisión de estos mismos, en casos en que el límite para consumo humano sea superado y estando los lotes cuestionados dentro de los límites establecidos para el ingreso a la UE, también da lugar a la emisión de un alerta.

También existe una guía, "*Guidance Document for Competent Authorities for the Control of Compliance with EU Legislation on Aflatoxins*" en la cual se especifican los métodos de muestreo, los requisitos de los métodos de análisis y los procedimientos para refutar los resultados obtenidos o solicitar un tercer análisis.

Este sistema de alertas rápidos informó de 26 notificaciones en el año 2014 en donde se excedió el límite legal, 12 de estos de maíz proveniente de Sudán y 10 notificaciones de maíz de diversos orígenes, entre los cuales India tuvo el 50% con un caso de un nivel de 881 $\mu\text{g} / \text{kg}$, el cual excede 40 veces el límite legal.

Introducción

Existen dos principales tipos de notificaciones de mercado: las notificaciones de “*alerta*” que requieren de una acción inmediata debido a que hay un serio riesgo para la salud en el mercado y las “*border rejections*” cuando han sido analizados y rechazados en las fronteras y no ha ingresado a la UE.

El principal país que emitió las notificaciones a la Argentina es Holanda (78%), seguido por el Reino Unido (7%) y Grecia con el 4%; luego con valores entre el 3% y el 1% siguen Italia, Portugal, Finlandia, Francia, Alemania, Polonia y España. Esto se puede observar en la figura siguiente.

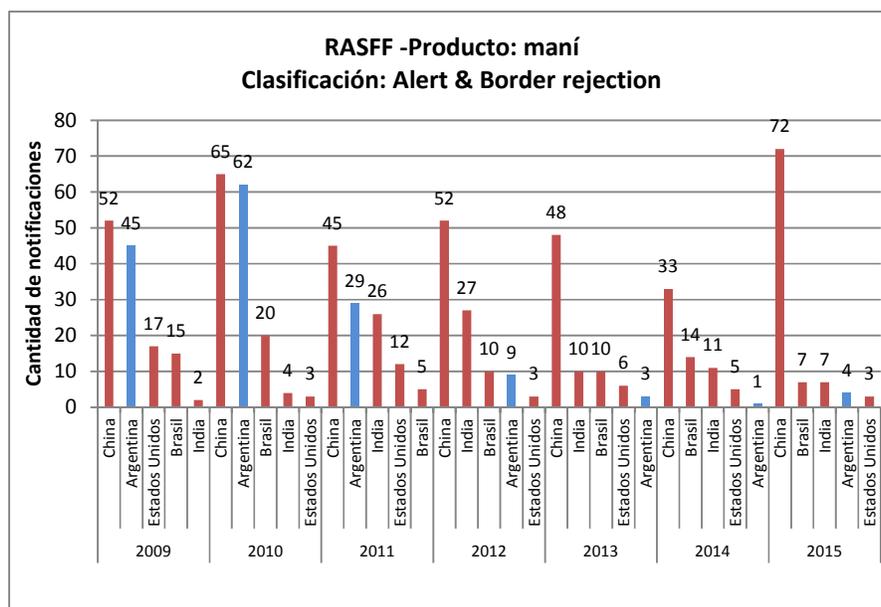


Figura 11: Cantidad de notificaciones RASFF para maní de los principales países productores y exportadores emitidos por la Unión Europea.

Introducción

Si comparamos los principales países productores de maní, China ocupa el primer lugar en recibir notificaciones en maní desde el año 2012 seguido por India y Brasil. Argentina, desde entonces, ha pasado a recibir un nivel de notificaciones similares a los Estados Unidos.

Desde el año 2007 EU concede a EEUU la aprobación del control previo a la exportación a través de la decisión 2008/47 de acuerdo lo establece el art. 23 del reglamento 882/2004 dado que considera que las curvas características de operación de los planes de muestreo y los requerimientos analíticos son equivalentes con los requeridos por la UE.

Además de estos datos, de acuerdo a los resultados de BIOMIN, una compañía que toma muestras y analiza anualmente diferentes *comodities* para determinar los potenciales riesgos de micotoxinas en el mundo, halló que, analizadas 6844 muestras de 64 países, entre el período enero 2014 y diciembre 2014, desde aflatoxinas (Afla), zearalenona (ZEN), deoxinivalenol (DON), fumonisinas (FUM) y ocratoxina A (OTA), al igual que en año 2013, el desonivalenol (DON) y las fumosinas (FUM) son las principales amenazas encontradas en más de la mitad de todas las muestras analizadas.

Detalladamente de esta fuente se puede obtener una información dividida por continentes.

1.6.1 Europa

Las muestras procedentes de Europa mostraron la mayor incidencia de toxina T-2 con un valor promedio de 91 $\mu\text{g} / \text{kg}$. Se detectó el nivel más alto de toxina T-2 en una muestra de trigo de Rusia con 1300 $\mu\text{g} / \text{kg}$.

Casi tres de cada cuatro muestras europeas contenían deoxinivalenol a la mayor concentración (1.864 $\mu\text{g} / \text{kg}$). El nivel más alto de deoxinivalenol se observó en una muestra de maíz de Austria a 29.600 $\mu\text{g} / \text{kg}$ y el nivel más alto de ZEN se observó en una muestra de maíz de Austria a 16.495 $\mu\text{g} / \text{kg}$.

1.6.2 Asia

Este continente presentó un alto riesgo relacionado con las micotoxinas, hay cuatro micotoxinas presentes en promedio en concentraciones por encima de los niveles de umbral de riesgo, mientras que Oceanía registró riesgo moderado con tres micotoxinas.. El nivel más alto de aflatoxinas se observó en una muestra China de semillas de algodón en 5155 $\mu\text{g} / \text{kg}$ y la más alta de ocratoxina A fue detectada en una muestra de alimento terminado chino en 854 $\mu\text{g} / \text{kg}$.

1.6.3 Norteamérica

Introducción

América del Norte se enfrenta a una amenaza grave para micotoxinas relacionados con riesgos para la ganadería. Se detectaron los más altos valores medios de ZEN y FUM en muestras norteamericanas a 282 $\mu\text{g} / \text{kg}$ y 3352 $\mu\text{g} / \text{kg}$, respectivamente. El nivel medio de deoxinivalenol fue el segundo más alto en muestras norteamericanas con 1231 $\mu\text{g} / \text{kg}$ y el nivel más alto de fumonisinas se observó en una muestra de maíz de con 154000 $\mu\text{g} / \text{kg}$.

1.6.4 Sudamérica

América del Sur clasificó como de alto riesgo para micotoxinas relacionadas con riesgos para el ganado. Las fumonisinas estuvieron presentes en casi dos tercios de todas las muestras de América del Sur en 1932 $\mu\text{g} / \text{kg}$, el segundo nivel más alto promedio en todo el mundo. A pesar de la baja prevalencia de la T-2, la concentración media en muestras de América del Sur fue la más alta de todo el mundo a 125 $\mu\text{g} / \text{kg}$. Aunque sólo el 10% de las muestras sudamericanas estaban contaminados con aflatoxinas, la concentración promedio fue el segundo más alto de todo el mundo con 40 $\mu\text{g} / \text{kg}$.

1.6.5 Medio Este

Las muestras procedentes de Oriente Medio mostraron el mayor promedio ocratoxina A la concentración a nivel mundial. Deoxinivalenol y fumonisinas estuvieron presentes en el 72% y el 84% de las muestras analizadas.

1.6.6 África

Introducción

África registró dos micotoxinas presentes en concentraciones superiores a la media de los niveles de umbral de riesgo (aflatoxinas, deoxinivalenol). Deoxinivalenol y fumonisinas estaban presentes en más de las dos terceras partes de todas las muestras africanas.

De acuerdo a las evidencias, si bien la ocurrencia de las aflatoxinas en los alimentos y piensos, pareciera ser propio de ciertas regiones donde las condiciones ambientales y el manejo inadecuado de los alimentos facilitan la contaminación de los mismos; se ha demostrado que se trata de un problema global que afecta a la población mundial en mayor o menor medida.

Los países han adoptado medidas para controlar o prevenir que este problema afecte a sus poblaciones, sin embargo, no todas las regiones poseen los mismos recursos para realizar el seguimiento y control.

En Argentina, más específicamente en maní, la ocurrencia de aflatoxinas genera pérdidas económicas, aunque la ocurrencia no es elevada como en otras regiones y no posee el conocimiento total de cómo mitigar este problema a nivel industrial más allá de enviar el producto contaminado a la industria aceitera o intentar un blanqueado sin tener

predicciones ciertas que este proceso dejará los lotes afectados libres de contaminación.

Es por ello que es importante llevar a cabo investigaciones que permitan conocer el impacto de este factor y desarrollar medidas preventivas y correctivas, para que un producto de alta calidad, que goza de un buen prestigio mundial, continúe siendo uno de los pilares de la economía regional.

1.7 Planes de muestreo de aflatoxinas y toma de decisiones

Se han desarrollado numerosos métodos analíticos desde el descubrimiento de las propiedades tóxicas para la salud de las aflatoxinas (Shephard, 2009).

La *Association of Analytical Communities Internacional* (AOAC) y el *Comité Europeo de Normalización* (CEN) y la *Food and Drug Administration* (FDA), cuentan con varios métodos normalizados de análisis para las micotoxinas validados internacionalmente a través de ensayos colaborativos (FAO, 2004).

Todos los métodos de análisis de micotoxinas incluyen el muestreo como paso inicial, ya que tiene un papel principal en la determinación de su contenido y suele ser fuente de un alto porcentaje de error. Éste es llevado a cabo mediante planes concretos, ya que la

gran heterogeneidad en la distribución de estas toxinas exige planes de muestreo concretos con el fin de obtener muestras representativas (Whitaker, 2003).

Esta heterogeneidad en la distribución de las micotoxinas, puede variar notablemente con el tipo de materia prima, por lo que evaluar el nivel real de contaminación en lotes es un gran problema, si bien en los alimentos líquidos como la leche el problema se reduce, ya que la distribución es homogénea, pero en los alimentos sólidos tales como los granos es el problema mayor.

Por estos motivos, la comunidad internacional ha puesto de manifiesto la necesidad de armonizar o estandarizar los planes de muestreo para estas toxinas, con el objeto de facilitar el comercio internacional y mejorar la protección del consumidor (Whitaker, 2003). Así, todos los estados miembros de la UE deben cumplir el Reglamento 178/2010 en el que se fijan métodos de toma de muestras y de análisis para el control oficial del contenido máximo de micotoxinas en los productos alimenticios, donde se incluyen las aflatoxinas.

1.7.1 Codex Alimentarius

1.7.1.1 Plan de muestreo para maní

La muestra total debe tener al 20 kg y estar constituida por 100 muestras elementales para lotes comprendidos entre 15 y 25 toneladas. Los procedimientos utilizados para tomar muestras elementales de un lote de maní tienen una importancia trascendental. Todo grano de maní del lote deberá tener las mismas posibilidades de resultar elegido. La toma de una muestra total de un lote estático suele requerir el uso de sondas para seleccionar el producto del lote o de métodos que empleen sistemas mecánicos validados. Las sondas utilizadas deberán estar especialmente diseñadas para el tipo de contenedor. La sonda deberá llegar a todo el producto, no impedir la selección de ningún elemento del lote y no modificar los elementos del lote. Como se ha señalado anteriormente, la muestra total deberá estar compuesta por muchas pequeñas muestras incrementales de granos tomados de muchos lugares diferentes del lote.

Un auténtico muestreo aleatorio se puede lograr más fácilmente si se selecciona una muestra total de un flujo de maní en movimiento cuando se traslada el lote, por ejemplo por medio de una cinta transportadora, de un lugar a otro. Al hacer el muestreo tomándolo de un flujo en movimiento, es necesario recoger pequeños incrementos del

Introducción

producto en toda la longitud del flujo de maní en movimiento, reunir el maní para lograr una muestra total y, si la muestra total es mayor que la muestra de laboratorio necesaria, mezclar y dividir la muestra total para lograr el tamaño de muestra de laboratorio deseado.

1.7.1.2 Preparación de la muestra

Deberá evitarse en la medida de lo posible la exposición a la luz solar de las muestras durante el procedimiento, puesto que las aflatoxinas se descomponen de forma gradual bajo la influencia de la luz ultravioleta.

1.7.1.3 Homogeneización - trituración

Como la distribución de las aflatoxinas es sumamente heterogénea, las muestras deberán homogeneizarse con extrema precaución. Todas las muestras de laboratorio obtenidas de una muestra global deberán utilizarse para la homogeneización/trituración de la muestra. La muestra deberá triturarse en gránulos finos y mezclarse completamente utilizando un procedimiento con el que se logre una homogeneización lo más completa posible.

1.7.1.4 Porción de ensayo

Se recomienda un tamaño mínimo de muestra de 100 g tomado de la muestra de laboratorio.

1.8 Planes de muestreos utilizados en Argentina

Los planes de muestreo de maní se basan en las recomendaciones de "*Sampling plans for aflatoxin analysis in peanuts and corn*", FAO Food and Nutrition Paper 55, 1993 y se utiliza la norma de muestreo ISO 950: 1979 "Cereal - Sampling (as grain)".

La muestra de maní para laboratorio de 5 kg será transformada en una pasta homogénea o molida a malla 14, en su totalidad, homogeneizada y posteriormente dividida en un mínimo de tres partes. Podrá tomarse una cuarta submuestra para análisis de rutina. Las muestras y submuestras de maní y maíz recogidas serán almacenadas en envases de papel, algodón u otro material a humedad relativa máxima de 60% y temperatura máxima de 25° C.

Para la determinación de aflatoxinas totales (AFB1+AFB2+AFG1+AFG2) en maní y pasta de maní, se utiliza el procedimiento AOAC 970.45 publicado en la referencia (2.2) y/o sus respectivas actualizaciones. El control de las soluciones estándares se hace según el procedimiento AOAC 970.44 y 971.22, de la misma publicación.

El principal destino del maní argentino es la Unión Europea, es por ello que el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria

Introducción

(SENASA), establece que todas las exportaciones deberán ser certificadas, previo a su embarque, en cuanto a su contenido de aflatoxinas (Resolución 436/2002).

El muestreo y análisis se debe realizar solamente a través de laboratorios inscriptos (res. 272/1993 Instituto Argentino de Sanidad y Calidad Vegetal) y habilitados (res. 142/1995 IASCAV), además deben cumplir con la ISO 65 y estar certificado con la ISO 17025.

Además de cumplir obligatoriamente con los niveles de aflatoxinas, los exportadores de maní deberán presentar la mercadería para la exportación dentro de las condiciones previstas en los estándares argentinos (Norma de Calidad para ser Aplicada en la Comercialización del Maní Mercado Interno, Exportación e Importación - resolución 1075/ ANEXO XIII - Modificada por res.SAGPyA 814/00 - SENASA - res. 1075 / 9), con excepción de los rubros que correspondan a mayores exigencias de aflatoxinas.

Los exportadores deben presentar una copia del certificado y/o protocolo de análisis emitido por la empresa de certificación que intervino en el control de la mercadería ante el funcionario del SENASA actuante antes o en el momento de la exportación, quien verificará el mismo, previo a su autorización de despacho.

Sumado a esto el exportador debe cumplir con el memorando DICA N° 172/05, la ley 18284/69 Artículo 156bis - (res 612, 10.05.88) y resolución GMC N° 025/02 incorporada por resolución conjunta 66 y 344/02 Inc. 3. Pto 3.1.

1.8.1 Criterios de Aceptación y Rechazo del lote

Si en el análisis de la primera sub-muestra de maní, el resultado es igual o menor que 20 µg/kg de aflatoxinas totales, se aceptará el lote. Si el resultado del análisis es superior a 20 µg/kg de aflatoxinas totales, se rechazará el lote.

En el caso de que el lote fuera rechazado en el primer análisis, a requerimiento de la parte interesada, el laboratorio que realizó el primer análisis, efectuará el análisis a la segunda sub-muestra, en presencia de los peritos técnicos indicados por las partes interesadas.

En caso de haber discordancia entre los resultados analíticos de la primera y de la segunda sub-muestra, podrá ser realizado por el mismo laboratorio, el análisis de la tercer sub-muestra, siendo su resultado inapelable.

En el análisis de la segunda y tercera sub-muestra se adoptarán los mismos criterios de aceptación o rechazo de lote establecidos previamente.

1.9 Planes de muestreo en la Comunidad Europa

Como se mencionó anteriormente, el muestreo tiene un papel fundamental en la precisión de la determinación del contenido de micotoxinas, dado que las mismas están distribuidas muy heterogéneamente en los lotes. Es por tanto necesario establecer los criterios generales que debe cumplir el método de muestreo.

1.9.1 Aceptación de un lote o sublote

Introducción

La aceptación del lote está sujeto a si la muestra de laboratorio se ajusta al límite máximo, teniendo en cuenta la incertidumbre de medición y la corrección en función de la recuperación, en cambio se rechaza si la muestra de laboratorio supera, fuera de toda duda razonable, el límite máximo, teniendo en cuenta la incertidumbre de medición y la corrección en función de la recuperación.

El muestreo de los lotes de exportación debe ser realizado de acuerdo con el reglamento EU 178/2010. En dicho reglamento para maní con lotes de más de 15 toneladas, será necesario extraer 100 muestras elementales. La muestra global tendrá un peso de 20 kg y, antes de la molienda, se mezclará y dividirá en dos muestras de laboratorio iguales de 10 kg y cada muestra de laboratorio de 10 kg se someterá a un molido fino por separado y se mezclará adecuadamente para homogeneizarla totalmente.

Además el reglamento EU 401/2006 establece los métodos de muestreo y de análisis para el control oficial del contenido de micotoxinas en los productos alimenticios y la metodología para el análisis.

1.10 Planes de inspección en los Estados Unidos

1.10.1 Plan de inspección

En las plantas de procesamiento el *Food Safety and Inspection Service* (FSIS) emplea equipos de muestreo automáticos para obtener una muestra de 70 kg la cual luego es dividida en una muestra de 4 kg para el

Introducción

análisis de la determinación del grado y tres muestras de 22 kg para el análisis de aflatoxinas.

Cada 22 kg son molidos en un molino de martillos que remueve 1100 gramos de cada submuestra para ser enviada a un laboratorio aprobado por el U.S. Department of Agriculture (USDA).

Los laboratorios aprobados emplean métodos de la Association of Analytical Communities (AOAC) para extraer las aflatoxinas de las submuestras. Estas son cuantificadas empleando diferentes métodos de análisis cromatográficos o de inmunoafinidad. El USDA conduce ocho veces al año controles entre los laboratorios aprobados.

1.10.2 Criterio de aceptación y rechazo

El plan de muestreo tiene un diseño secuencial, en donde una, dos o las tres muestras de 22 kg pueden ser usadas para aceptar o rechazar el lote.

Si la primera muestra arrojó resultados de 8 ng/g o menos el lote es aceptado sin necesidad de realizar más ensayos.

Si la primera muestra arrojó 45 ng/g o más el lote es rechazado sin necesidad de realizar más ensayos.

Si la primera muestra arrojó valores comprendidos entre 8 ng/g y 45 ng/g, entonces la segunda muestra es analizada y los resultados promediados con el resultado de la primera muestra.

Introducción

Si el promedio de las dos submuestras es menor o igual a 12 ng/g el lote es aceptado.

Si el promedio de las dos submuestras es igual o mayor a 23 ng/g el lote es rechazado.

Si el promedio de las dos submuestras está comprendido entre 12 y 23 ng/g entonces la tercer submuestra es analizada y su resultado promediado.

Si el promedio de las tres submuestras es menor a 15 ng/g el lote es aceptado, caso contrario es rechazado.

El USDA ha empleado este criterio de aceptación o rechazo desde 1975 pero ha disminuido los límites de aceptación (Whitaker y Dickens, 1989).

1.11 Métodos de análisis de aflatoxinas

Un método de análisis para micotoxinas en alimentos y piensos debe ser simple, rápido, robusto, preciso y selectivo. Además, los bajos niveles de tolerancia en los piensos y los alimentos requieren métodos sensibles (Rubio Martínez, 2011).

Como ya se ha señalado, las aflatoxinas son compuestos polares de bajo peso molecular que poseen significantes propiedades de absorción de la luz ultravioleta y presentan fluorescencia. Por esta razón, la cromatografía en capa delgada (TLC), y luego la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) son los métodos más difundidos (Shephard, 2009).

Introducción

En la actualidad hay disponibles técnicas inmunoenzimáticas y fluorimétricas (Stroka y Anklam, 2002). Además, en los últimos años se ha incrementado la necesidad de encontrar métodos capaces de determinar simultáneamente diferentes clases de micotoxinas, para lo cual se ha utilizado la cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas (LC-MS) (Driehuis et al., 2010).

Los métodos tipo ELISA son una técnica simple y rápida que no requieren de un equipo costoso, sin embargo los límites de detección y cuantificación son más altos que los que poseen las técnicas cromatográficas (Nilüfer y Boyacioglu, 2002).

La combinación de la alta especificidad de la interacción anticuerpo-antígeno y la sensibilidad de la detección de una enzima marcadora, permiten la determinación de analitos en mezclas complejas de varios componentes sin la previa eliminación de impurezas (Rubio-Martinez, 2011, Goryacheva et al., 2009; Abbas, 2005).

La extracción de las aflatoxinas se realiza con acetonitrilo, agua y metanol, seguido de la limpieza (clean-up) o SPE o columnas de inmunoafinidad, proporciona resultados sensibles y selectivos para una amplia gama de alimentos. Los métodos actuales se centran en la identificación y cuantificación por LC-MS.

La detección por TLC o HPLC se basa en su fluorescencia bajo radiación UV, aunque la aflatoxina AFB1 y la aflatoxina AFG1 necesitan derivatización para mejorar la fluorescencia a un nivel similar a la de la aflatoxina AFB2 y AFG2.

Introducción

La fase estacionaria para la separación de aflatoxinas por cromatografía líquida son principalmente columnas en base a C18.

La derivatización de las aflatoxinas se realiza con ácidos fuertes o agentes oxidantes (por ejemplo, Br₂, I₂, ácido trifluoroacético), resultando este tratamiento en un aumento significativo de la fluorescencia, lo que posibilita la detección de concentraciones en el rango de µg/kg a 435 nm con una longitud de onda de excitación de 365 nm. En Argentina los métodos emplean la derivatización pre-columna con estos agentes químicos y post-columna el sistema Kobra Cell y la derivatización UV.

Los límites de detección son bajos, del orden de 1 a 5 µg/kg con precisión analítica de ± 30% para los alimentos y por debajo 0.05 µg/kg para la aflatoxina AFM1 en la leche (Rubio-Martinez, 2011).

La combinación de los métodos inmunológico y cromatográfico lo constituyen los ensayos inmuno-cromatográficos. Estos métodos son rápidos y fáciles de usar, ya que la interpretación de su resultado se realiza de forma visual (Zheng et al., 2006).

Tanto las técnicas cromatográficas como los inmunoensayos, presentan una elevada sensibilidad y exactitud en los resultados, ofreciendo unos buenos límites de detección. Sin embargo, recientemente han sido publicados estudios en los que se utilizan métodos más rápidos, de bajo coste e igualmente precisos, como son los procedimientos basados en la espectroscopía vibracional. Este es el caso del infrarrojo cercano (NIR), que es posible aplicar sin la preparación previa de la

muestra y no precisa de reactivos químicos (Tripathi y Mishra, 2009; Rubio-Martinez, 2011), aunque presenta unos límites de detección mayores (15-20 $\mu\text{g kg}^{-1}$) que por el momento lo dejan fuera del espectro aceptable.

Según se comparó durante el desarrollo de la presente trsis, la principal desventaja de los métodos de inmunoafinidad son los elevados costos de las columnas, que son de simple uso, y lo convierten en una desventaja significativa frente a los análisis por HPLC.

En la industria manisera, el TOXIMET® y el VICAM® son ampliamente usados, pero aquí los costos de las columnas descartables son restrictivos, si bien la simplicidad de operación de los equipos y los bajos costos de inversión inicial parecieran ser una solución a métodos más complejos, los costos de análisis por muestras son 100% mayores comparados con los métodos cromtaográficos.

1.11.1 Validación de los métodos de análisis

Para que un método sea aceptado con fines legales, debe cumplir unos criterios de funcionamiento generales (reglamento EU 882/2004) que son la exactitud, la aplicabilidad, el límite de detección y de determinación, la linealidad, la recuperación, la precisión (repetibilidad y reproducibilidad), la selectividad, la sensibilidad, la linealidad, la incertidumbre de medida y otros criterios que puedan adoptarse según las necesidades.

Introducción

Además, los métodos deben estar validados y cumplir con ciertos requisitos específicos según el destino, que establece por ejemplo el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos o la UE en el reglamento 401/2006 que se detallan en la tabla siguiente.

Tabla 5: Criterios de funcionamiento de un método para el análisis de aflatoxinas. reglamento Unión Europea 401/2006.

Criterio	Intervalo de concentración	Valor recomendado
Blancos	Todos	Despreciable
Recuperación AFM1	0,01-0,05 µg kg ⁻¹	de 60 a 120%
	> 0,05 µg kg ⁻¹	de 70 a 110%
Recuperación Aflatoxinas B1, B2, G1, G2	< 1,0 µg kg ⁻¹	de 50 a 120%
	1-10 µg kg ⁻¹	de 70 a 110%
	> 10 µg kg ⁻¹	de 80 a 110%
Precisión RSD_R	Todos	Derivada de la ecuación de Horwitz

*RSD_R = Desviación estándar relativa calculada a partir de los resultados obtenidos en condiciones de reproducibilidad $[(s_R/x) \cdot 100]$. s_R = Desviación estándar, calculada a partir de los resultados obtenidos en condiciones de reproducibilidad.

Nota:

-Valores aplicables tanto a AFB1 como a la suma de B1 + B2 + G1 + G2.

-Si debe notificarse la suma de cada aflatoxina B1 + B2 + G1 + G2, la respuesta de cada una al sistema analítico tiene que ser conocida o equivalente.

En Estados Unidos los laboratorios deben seguir el método oficial de la AOAC 977.16 para el muestreo para aflatoxinas y preparación de muestras. Los métodos aceptados para realizar los análisis de aflatoxinas son una purificación o clean-up con columnas de inmovofinidad seguido del análisis por cromatografía HPLC según AOAC Official Method 991.31, A-F, H Otros métodos aceptados para el

Introducción

análisis consisten en cromatografía de capa delgada TLC según AOAC Official Method 998.03 y métodos fluorimétricos directos según AOAC Official Method 991.31, A-G.

En la tabla siguiente se resumen los porcentajes de recuperación recomendados para validar una técnica analítica en los Estados Unidos.

Tabla 6: Requerimientos de validación analítica en Estados Unidos

Criterio	Rango de concentración	Valor recomendado
Blanco	Todos	Despreciable
Recuperación	< 1 µg / kg	50 – 120%
	1-10 µg / kg	70 – 110%
	>10 µg / kg	80 – 110%

La repetibilidad se determina calculando la Desviación Estándar Relativa para cada muestra. La adecuación de los resultados se determina comparando los resultados esperados de la ecuación de Horwitz.

1.12 Tratamientos para eliminar aflatoxinas

De acuerdo con los hechos, el maní que posee aflatoxinas pierde su valor comercial, siendo por lo tanto, no solo un problema de los consumidores sino también del productor y el industrial.

El crecimiento de hongos causa cambios químicos en los granos, que pueden resultar en algunas modificaciones en el color o la forma. Las modificaciones no siempre son visibles a simple vista, algunos de ellos pueden ser visibles solo con la ayuda de técnicas o equipos específicos. Los cambios de color aparecen como consecuencia de reacciones

Introducción

bioquímicas o debido a la acción fúngica o a la coloración del micelio. La hidrólisis de las macromoléculas como proteínas, lípidos y polisacáridos, se produce durante la infección y resulta en la liberación de aminoácidos libres, ácidos grasos libres, y azúcares simples. Estos productos de degradación contribuyen al desarrollo de color, durante el proceso de fritura o tostado que finaliza en la formación lo que se denomina manchas marrones después de frito/tostado (Robin et al., 1995).

Como la presencia hongos no asegura la presencia de micotoxinas (Gloria et al., 2010), algunos investigadores han tratado de mostrar correlaciones entre los cambios físicos y la concentración de micotoxinas. Los correlación entre los granos dañados y la concentración de aflatoxinas se ha demostrado para el maní, maíz y almendras (Whitaker et al., 1998, Johansson et al, 2006, Whitaker et al., 2010).

Los tratamientos con peróxido de hidrógeno han demostrado ser efectivos para disminuir el contenido de aflatoxinas en granos blanqueados si afectar adversamente la facilidad de remoción del tegumento (Paulsen et. al., 1976), sin bien la exposición en una solución de 0,075% de H_2O_2 durante un minuto redujo en un 90% el nivel de aflatoxinas también incrementó el nivel del aldehído hexanal aunque en los análisis de muestras pareadas de los test de sabor no se encontraron diferencias significativas. Además de estos, también el spray con agua y con HCl fueron efectivos en la disminución de los niveles de contaminación (Clavero et al., 1994).

El amonio es usado comercialmente para destruir las aflatoxinas presentes en maní, maíz y algodón. El amonio reacciona con la AFB1

Introducción

formando una sal la cual puede ser descarboxilada por calor para formar numerosos productos incluyendo AFD1. Los compuestos formados, si bien tóxicos, tienen varios órdenes menor toxicidad que la AFB1 (Bryden, 1980).

Otra estrategia que se emplea, en la alimentación animal, es la incorporación de compuestos adsorbentes no nutritivos, como por ejemplo el silicato hidratado de sodio.

Otros avances consisten en la destrucción de las aflatoxinas a través de utilización de microorganismos y enzimas. Comercialmente existe hoy fumzyme® que es una enzima purificada, producida por un cepa de *Komagataella pastori*, autorizada por la UE para biotransformar irreversiblemente fumonisinas en metabolitos no tóxicos. También *Trichosporon mycotoxinivorans* es una cepa única de levadura que se emplea desintoxicar específicamente zearalenona y ocratoxina A en el tracto digestivo de los animales que llevan a sustancias no tóxicas (Vekiru et al, 2010).

Uno de los métodos con mayores perspectivas de futuro es el biocontrol por exclusión competitiva. (Pitt, 2003) Para esto, *A. flavus* que no producen aflatoxinas son aplicados durante el desarrollo de las cosechas junto con una fuente de alimentos fúngicos que son el paso inicial en el control biológico. Cepas atoxicogénicas de *A. flavus* pueden ser aisladas del ecosistema maní y ser utilizadas a nivel de campo como agentes de biocontrol mediante el desarrollo de un bioformulado para ser empleado en base al control por exclusión competitiva, método que se

Introducción

comenzó a investigar en campo en la Argentina con resultados prominentes (Alaniz et al, 2014).

Es imprescindible considerar que diferentes estrategias, pre y post cosecha deben aplicarse para reducir el ingreso de aflatoxinas a la cadena alimentaria, dado que ninguna simple estrategia es suficiente para resolver este problema. Un método integrado desde el campo hasta el procesamiento es necesario para reducir el impacto de las aflatoxinas (Torres et al, 2014).

Sin embargo, los resultados no son inmediatos, puesto que conviven ambas especies en el mismo campo, si bien permite reducir el nivel de ocurrencia, es una estrategia a largo plazo.

La selección electrónica por color de granos dañados y defectuosos, como así también de cuerpos extraños o contaminantes físicos inherentes y extraños al maní, ha desplazado a la selección manual, sin embargo, en la actualidad, el maní todavía se denomina calidad HPS (Hand-picked and selected), aunque no haya sido empleado el ojo humano en el proceso de selección industrial (Bee y Honeywood, 2002).

La selección manual, no es un proceso eficiente en cuanto a rendimientos y costos, y solo se emplea en casos en los cuales se requiere garantizar un maní calidad ready-to-eat o libre de impurezas inherentes al producto (Kabak et al., 2006).

Un dispositivo capaz de medir la intensidad de fluorescencia de las superficies de granos de maní buenos y dañados fue desarrollado hace

Introducción

unos años (Pelletier et al., 1991), sin embargo, una comparación de la eficacia entre este proceso y el proceso de clasificación de color en lotes de maní mostró que no era efectiva como una técnica de descontaminación de aflatoxinas (Pelletier et al., 1991)

Ha sido demostrado que el proceso de blanqueado disminuye el contenido de aflatoxinas por la remoción del tegumento y la eliminación de granos dañados o con hongo. Existe una fuerte relación entre los granos rechazados (descoloridos y con contaminación fúngica) y el nivel de aflatoxinas en los mismos (Whitaker, 1997).

Cuando mayor es el nivel de aflatoxinas, más intensivo debe ser el tratamiento de remoción, por lo cual mayores son los costos y pérdidas económicas debido a que se requiere rechazar un mayor porcentaje de granos dañados o defectuosos.

La remoción a través de la selección electrónica de granos descoloridos o manchados, luego del proceso de tostado a 160°C durante 15 minutos ha demostrado ser eficiente desde el punto de disminuir significativamente el nivel de contaminación (Robin et al, 1995).

También ha sido demostrado que el proceso de blanqueado en sí mismo, a través de la remoción del tegumento seguido de la selección electrónica reduce eficientemente en un 89,9% el nivel de aflatoxinas de un lote reportándose hasta un 22% de pérdidas por mermas en el proceso (Whitaker, 1997).

El proceso tostado a 140°C durante 25 minutos, seguido de la selección manual, previa remoción del tegumento ha demostrado reducir

Introducción

el contenido de aflatoxinas desde 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ hasta valores del orden de 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Galvez et al, 2003). Este proceso tiene como desventaja que es muy lento y de alto costo por la mano de obra necesaria, dado que generalmente, no se puede superar los 500 kg/h involucrando entre dos y cuatro personas para lograr una eficiencia satisfactoria, motivo por el cual puede usarse en la industria como una opción complementaria sin ser este un método de aplicación general por sus elevadas mermas y costos.

El proceso de descascarado, tamaño y selección, selección mecánica y electrónica, tostado y blanqueado posterior seguido de selección electrónica y selección manual ha demostrado ser efectivo para separar los granos de maní contaminados con aflatoxinas, reduciendo el contenido desde 200 mg/kg hasta menos de 30 mg/kg, esto corresponde a un 85% de eficiencia (Kumar et al, 2010). Este proceso requiere el tostado previo de los granos, que convierten los daños y defectos en manchas o puntos de coloración más oscura, teniendo una merma en el proceso del 25% perdiendo su valor comercial.

También se ha investigado el empleo de separadores gravimétricos, para eliminar los granos afectados por diferencia de densidad y la dilución o mezcla con lotes que no poseen aflatoxinas. (Bryden, 1999).

La práctica de dilución por mezcla no es empleada industrialmente, puesto que se puede perjudicar la calidad de un lote completo intentando lograr una dilución apropiada, y peor aún, en muchas ocasiones se trata de unos pocos granos que poseen aflatoxinas y

no la totalidad de ellos, con lo cual en un lote, solo una porción de este puede contener aflatoxinas.

1.13 Procesamiento de maní blanqueado

Cuando al maní descascarado se le elimina el tegumento seminal, recibe el nombre de maní blanqueado, blanqueado, sin tegumento, maní blanco o sin piel.

El blanqueado del maní se logra a través de diferentes métodos tales como el blanqueado en seco, spin blanching, el empleo de álcalis, por impacto del aire, por el agua y otros métodos que emplean peróxido de hidrógeno (Woodroof, 1983).

Utiliza como materia prima al maní sin cáscara seleccionado, acondicionado y con tamaño uniforme, que es sometido a un proceso de calentamiento y enfriamiento súbito que disminuye la humedad del grano y facilita la remoción del tegumento. El maní blanqueado es demandado por la industria de snacks, confituras, ingredientes de gastronomía en general y segmentos gourmet para usos posteriores como frito, salado, con cobertura, etc.

El proceso más ampliamente difundido y empleado para la obtención del mismo es el blanqueado en seco, y es este el empleado para los diferentes ensayos.

Durante este proceso se logra:

- Reducir la humedad de grano hasta valores comerciales para prolongar vida útil del producto

Introducción

- Eliminar el tegumento
- Eliminar el germen, por cuestiones de sabor
- Eliminar granos con daños y defectos
- Inactivar enzimas, peroxidases, catalasas
- Disminuir el contenido de cuerpos extraños
- Eliminar metales del producto
- Disminuir el % de granos con daños y defectuosos
- Reducir el contenido de aflatoxinas

En este proceso se obtienen, además de granos enteros sin piel, otros subproductos como se observa en la figura 11:

- Mitades
- Harina de maní
- Tegumento
- Descarte del proceso de selección
- Germen



Maní confitería Maní blanqueado Maní partido Tegumento Industria Germen Harina de maní

Figura 12: Materia prima, producto final y subproductos obtenidos en el proceso de blanqueado

En este proceso de selección e intervenciones tecnológicas se distinguen las siguientes etapas:

1. Selección de lotes de maní confitería con determinados niveles de calidad

2. Tratamiento térmico en hornos continuos de secados con zonas de calor (a 70-95°C)
3. y de zonas de frío (20°C a 10°C).
4. Estabilización
5. Eliminación mecánica del tegumento o piel
6. Clasificación electrónica
7. Control manual
8. Detección de metales
10. Empaque final

1.13.1 Selección de lotes de maní confitería

Los lotes de maní confitería con uniformidad de tamaño y previamente seleccionados, con un nivel de daños en Grado 1 según SENASA, con una humedad entre 7 y 8% son la materia prima que alimenta un horno.

1.13.2 Tratamiento térmico

El objetivo principal del tratamiento térmico es disminuir la fuerza adhesiva del tegumento del grano y la humedad del maní hasta alcanzar valores comerciales del orden del 5 al 6%.

Introducción

El la figura siguiente se esquematiza el diagrama de flujo del proceso de maní blanqueado en seco.

El calentamiento del maní se efectúa en forma progresiva en un horno de secado continuo por etapas a través de un complejo proceso en donde inciden muchas variables dependientes del aire, del producto y del horno.

- Aire: Dirección (flujo paralelo o en contracorriente); velocidad, presión; temperatura y humedad.
- Producto: Humedad inicial, variedad, tamaño y forma de los granos, espesor de la cama
- Horno: Diseño y dimensiones, velocidad de la cinta transportadora, tiempo de residencia del producto en cada zona, recirculación y ventilación, etc.

Introducción

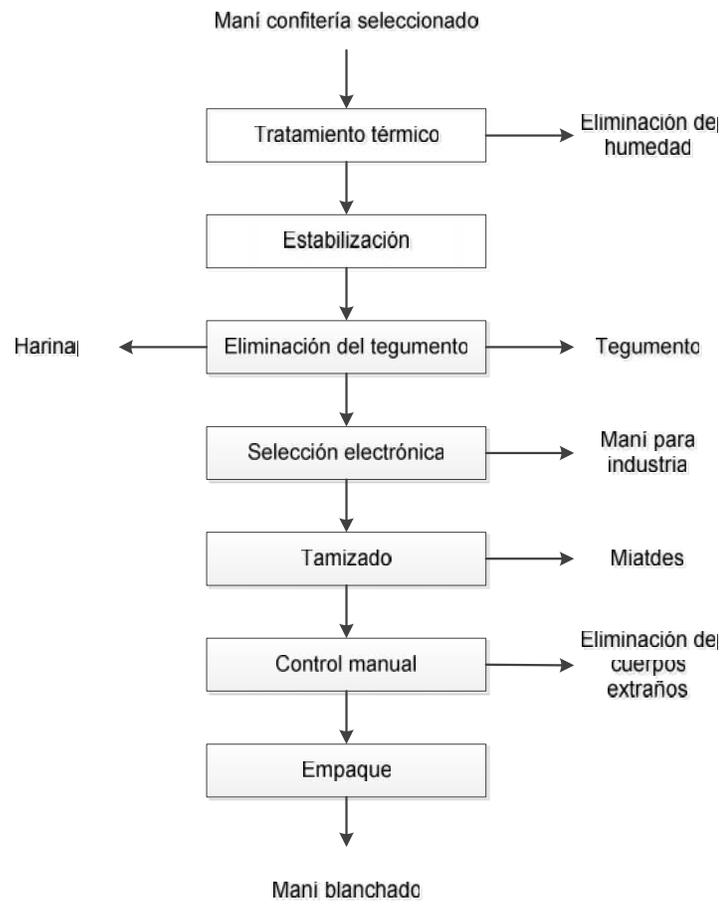


Figura 13: Diagrama de flujo del proceso de blanqueado en seco

Introducción

Cuando el grano húmedo se pone en contacto con la corriente de aire acondicionado, suficientemente caliente y seco, se establece espontáneamente entre ellos una diferencia de temperatura y una diferencia de presión parcial de agua. Como resultado se tiene una transferencia simultánea de calor y masa entre el aire y el grano.

- Transferencia de calor, desde el aire al maní
- Transferencia de materia, desde el maní al aire

La transferencia de calor ocurre desde el aire hacia el grano ya que la temperatura del alimento es inferior a la del aire. De esta manera, la energía necesaria para la evaporación del agua es proporcionada por el aire caliente.

En segundo lugar, existen dos mecanismos de transferencia de masa:

- Convección: Entre la superficie del grano y la corriente de aire.
- Difusión: Desde el interior del alimento hacia su superficie.

Convección: el mayor contenido de humedad en el maní hace que la presión parcial de agua en él sea mayor que en el aire y como consecuencia de esto, se desarrolla una transferencia de masa desde el grano hacia el aire. El aire es a la vez fluido de calentamiento y medio de arrastre del agua evaporada del alimento.

Introducción

Difusión: A medida que el grano pierde humedad se establecen en su interior diferencias de concentración de sólidos, que como resultado origina una transferencia de humedad hacia su superficie.

Aunque las condiciones pueden variar de acuerdo a muchos factores intrínsecos, el calentamiento se produce con una cama de 7 a 12 cm de maní que se mueve sobre una cinta transportadora a través de un horno de varias zonas (4 zonas de calentamiento) en las que se alterna el flujo de aire, en zonas de calentamiento consecutivos.

La temperatura en cada zona aumenta de forma gradual, desde los alrededores 30°C en la primera zona hasta alrededor de 70-90°C en la zona final.

Las temperaturas máximas del aire no superan los 95°C, dado que sobre este límite, comienzan a manifestarse reacciones de oxidación lipídica con incidencia diferente en el índice de peróxidos, que otro de los factores comerciales. Esta incidencia se pudo verificar, no inmediatamente después del blanqueado de maní, si no luego de transcurrir más de 3 semanas de procesos, en donde los valores del índice de peróxido oscilaban en el rango de 2 a 10 mEq O₂/kg aceite.

El tiempo total de este tratamiento térmico oscila entre 20 y 45 minutos, durante el cual la humedad disminuye, y el tegumento se libera debido a la expansión contracción del grano.

Durante el calentamiento se desarrolla un gradiente de temperatura dentro de cada semilla. Como el maní contiene

Introducción

aproximadamente un 50% de aceite, tiene baja conductividad térmica, por tal motivo la transferencia de calor se produce lentamente.

La variación de esta temperatura interna con respecto a la profundidad afecta la eliminación del agua además de la actividad enzimática.

La facilidad de remoción del tegumento o facilidad de eliminación del tegumento depende, además de otros factores tales como la variedad del grano, el tamaño entre otros, del contenido de humedad final, y este a su vez del tiempo de residencia del producto dentro de las zonas de calentamiento y la temperatura del aire en estas zonas.

La facilidad de remoción del tegumento se incrementa a medida que disminuye la humedad hasta valores del 4%, en donde luego, la remoción ya no del agua libre si no del agua ligada dentro del grano no tiene efecto alguno sobre la facilidad de remoción del tegumento.

La reducción de la humedad del grano hasta valores próximos al 4% también incrementa el nivel de granos partidos o potencialidad del grano de maní para generar mitades, que tienen menor valor comercial.

Este incremento del tiempo de tiempo de calentamiento, a favor de reducir la humedad e incrementar la facilidad de remoción del tegumento también tiene un efecto sobre la actividad enzimática. Al aumentar la temperatura y el tiempo de residencia dentro del horno, disminuye la actividad de la lipoxigenasa y la peroxidasa (Sanders et al, 1999).

Además este calentamiento, según los resultados obtenidos durante el desarrollo de la presente tesis, aceleran la velocidad de las reacciones químicas dentro del grano, tales como la hidrólisis de los lípidos, produciendo la hidrólisis de los ácidos grasos un ligero incremento de la acidez del producto y de los valores de peróxidos.

1.13.3 Estabilización

A la salida del horno a través de transportadores horizontales y elevadores de cangilones se descarga el maní en un tolva de estabilización. Dentro de la tolva el maní permanecerá desde 4 a 6 horas con el objetivo de estabilizar la estructura interna de los granos que han sufrido la disminución de la a_w y han pasado por un ciclo de calentamiento y enfriamiento, para luego pasar por el proceso mecánico de eliminación del tegumento. Esta estabilización de la estructura de los granos, permite disminuir el daño físico durante el mencionado proceso y la generación de granos partidos.

1.13.4 Blanqueado

El proceso de eliminación del tegumento consiste en pasar los granos a través de un sistema de rodillos que están recubiertos por una superficie abrasiva. Los granos ingresan y rotan sobre su eje y contra la superficie abrasiva liberando el tegumento. Un sistema de extracción permite eliminar fácilmente el tegumento.

Durante este proceso, dependiendo del tiempo de residencia dentro de la unidad, el flujo másico de producto, la velocidad rotacional de los cilindros, la selección de superficie abrasiva, se puede intensificar

la eliminación de la piel generando mayor o menor daños sobre los mismos.

En condiciones intensivas de abrasión, con el fin de retirar la totalidad de la piel, se produce harina de maní, que es extraída de los rodillos abrasivos (blanchers) a través de un sistema de extracción por aire. También durante el pasaje de los granos por los rodillos, debido al impacto y fricción de los mismos, se produce un importante incremento del contenido de mitades o granos partidos.

La superficie abrasiva de los cilindros está compuesta por óxido de aluminio gris (Al_2O_3) que se obtiene de la electro fusión a 2100°C de la bauxita, dando un producto de elevada dureza (escala Mohs=9). Su capacidad de corte, friabilidad y tenacidad varían en función de su pureza. El tamaño del grano se identifica con número, que indica la cantidad de divisiones por pulgada lineal que tiene el tamiz más fino utilizado para clasificar los granos. Cuando se requiere una gran remoción se selecciona un grano grueso; por otro lado, una superficie menos abrasiva requiere grano fino según la propia experiencia.

1.13.5 Selección electrónica

Posteriormente el maní pasa por una clasificación electrónica a fin de eliminar todos aquellos granos que presentan defectos físicos en su apariencia. Para ello se emplea una clasificadora óptica a través de la cual cada grano en forma individual es capturado por cámaras con la más alta resolución y la más baja relación señal a ruido para detectar y rechazar los diminutos defectos de los granos a través de las

Introducción

imperfecciones más sutiles utilizando sensores de cámara visible con 2048 pixeles y de cámaras infrarrojas de alta resolución.

Una combinación de las más avanzadas cámaras y reconocimiento de formas identifica la más amplia gama de cuerpos extraños, defectos de manchas más pequeños, daños más finos del producto y colores más sutiles. Cuando un grano no conforme con las especificaciones fijadas en el equipo es detectado, un conjunto de eyectores de alta velocidad lo expulsan a través de la inyección de aire como se observa en la figura siguiente.

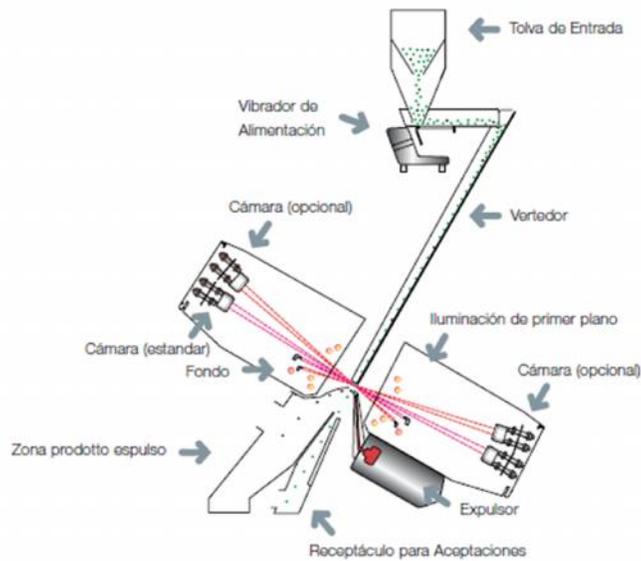


Figura 14: Esquema del funcionamiento de la clasificación electrónica

1.13.6 Tamizado

Luego de la clasificación electrónica, los granos conformes pasan a través de un transporte vibratorio, en el cual se eliminan las mitades generadas en el proceso hasta lograr valores acordes a las especificaciones comerciales.

1.13.7 Selección manual

La selección manual es realizada por personal calificado, de forma tal de eliminar los cuerpos extraños y material no conforme que pudiesen haber pasado a través de la selección electrónica. Al final de esta etapa, y en otras se encuentran imanes que permiten eliminar los materiales ferrosos que pueden estar presentes en el producto. Estos imanes reciben el nombre de trampas magnéticas, puesto que a través de un utiliza un campo magnético permanente permiten retener, por ejemplo virutas de metal que son invisibles al ojo humano

Luego de la selección manual el producto es transportado a una tolva en donde se almacena para ser envasado. Debajo de la tolva se encuentra una balanza electrónica programable que permite establecer los kilogramos a cargar en cada empaque.

Con el *set point* establecido, un controlador lógico programable acciona una electroválvula, permitiendo el paso del producto al empaque.

Durante este recorrido, el material es muestreado para la detección de cuerpos extraños y además pasa por un detector de metales de elevada sensibilidad que permite cambiar el flujo de producto rechazándolo y evitando su ingreso al empaque cuando pequeñas

partículas de acero inoxidable; material ferroso y material no ferroso son detectadas.

El envasado del producto se realiza en empaques aptos para el contacto directo con alimentos en bolsas de polipropileno de 1.250 KG para lograr un lote de 25 toneladas compuesto por 20 bolsas.

1.13.8 Rendimientos del proceso de blanqueado

Generalmente, dependiente de la humedad inicial y final, existe entre un 1,5% y un 2,0% de merma por pérdida de agua durante el proceso en el horno de acuerdo con los resultados obtenidos.

Además de esto existe normalmente, en un lote libre de aflatoxinas, dependiendo de la calidad física del mismo entre un 3% y un 5% de granos rechazados durante el proceso de selección electrónica y control manual.

Los subproductos como el germen y la harina, representan en total entre un 0,3% y un 0,6% y el tegumento entre un 2% y un 3% dependiendo del tamaño del grano. También en función de la humedad inicial, el tamaño de los granos, la variedad del maní, y las características de la línea de proceso, se generan entre un 12% y un 16% de granos partidos. Se observa esta distribución en la ilustración siguiente.

Introducción

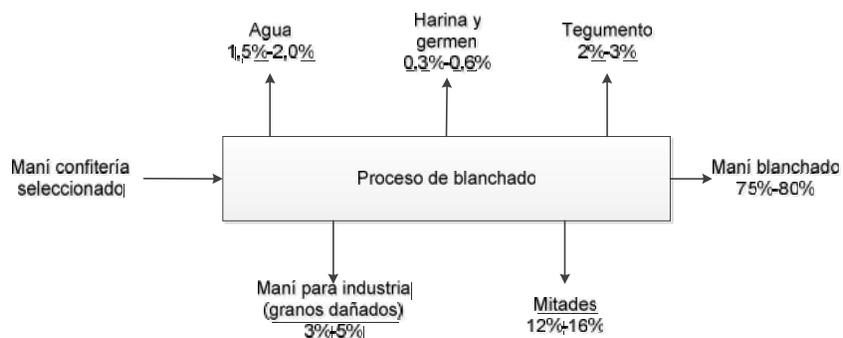


Figura 15: Diagrama del balance de masas para el blanqueado en seco de maní

Uno de los puntos importantes para disminuir las mermas de lotes conteniendo aflatoxinas es determinar qué tipo de granos dañados son los que se encuentran en los lotes de maní y cuál es su relación con el contenido de aflatoxinas.

Considerando la Norma de Calidad para ser aplicada en la Comercialización del Maní Mercado Interno, Exportación e Importación (resolución 1075/ ANEXO XIII) Modificada por res. SAGPyA 814/00 – res. 1075 / 94, NORMA XIII SENASA, pero ampliando algunas definiciones, se consideran las siguientes definiciones de granos dañados o defectuosos según:

- Granos violáceos: Son los granos que presentan un tinte azul, púrpura o violeta.
- Granos helados: Son aquellos que habiendo sido afectados por heladas tienen un aspecto anormal de tegumento, algo descolorido y por lo general de color apagado. Las venas se

Introducción

muestran a menudo de color marrón y evidente. Una vez partidos y pelados, la pulpa tiene un aspecto brillante-traslúcido, descolorido y de aspecto gomoso, puede exhibir una alteración notable del color, hasta amarillo, pardusco o grisáceo, y tienen un sabor desagradable.

- Granos dañados por insectos: Son aquellos que presentan perforaciones producidas por carcomas, gorgojos, etc.
- Granos con hongo interno: Son aquellos que presentan adherencias de masas fúngicas visibles en su interior.
- Granos ardidos: Son aquellos que presentan un oscurecimiento en su coloración interna y externa como consecuencia de fermentaciones.
- Granos podridos: Son aquellos que presentan una coloración marrón oscura y alteraciones en su estructura, producto del proceso de descomposición.
- Granos con hongo externo: Son aquellos que presentan adherencias de masas fúngicas en su superficie.
- Granos manchados: Son aquellos granos que presentan en más de una cuarta parte de su superficie zonas oscuras o diferentes a su

Introducción

coloración natural. No se considerarán manchados a los granos con tinte violáceo.

- Granos sucios: Se considera como tales a los granos que presentan adherencias de tierra u otra suciedad.
- Granos chuzos y/o arrugados: Son aquellos que presentan profundos surcos y depresiones como consecuencia de maduración incompleta o factores climáticos adversos.
- Granos descoloridos: Son aquellos que presentan una coloración notoriamente más pálida o tenue que la normal, en parte o en la totalidad de su tegumento.
- Granos con carbón: Son aquellos que se encuentran parcial o totalmente convertidos a carbón del maní, los granos presentan deformaciones e hipertrofia. Las semillas se observan como una masa carbonosa pulverulenta con esporas de color marrón rojizo de *Thecaphora frezii*.

Introducción



Granos de maní confitería



Granos blanqueados



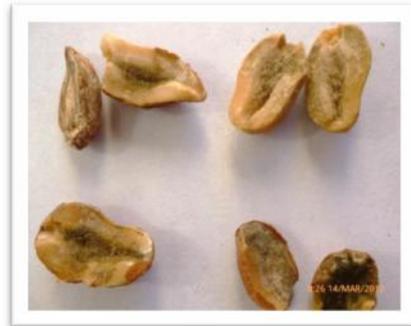
Granos violáceos



Granos helados



Granos dañados por insectos



Granos con hongo interno

Introducción



Granos ardidos



Granos podridos



Granos con hongo externo



Granos manchados



Granos sucios



Granos chuzos o arrugados

Introducción



Granos descoloridos



Granos con carbón

Figura 16: Daños hallados en los granos de maní (Fuente propia)

OBJETIVOS

2 Objetivos

Desarrollar un método analítico, basado en la cromatografía líquida de alta performance, para la detección y cuantificación de aflatoxinas AFB1, AFB2, AFG1 y AFG2.

Validar estadísticamente dicho método determinando la linealidad, los límites de detección, los límites de cuantificación, la exactitud y recuperación, la repetibilidad y la incertidumbre.

Analizar durante los ciclos agrícolas 2010/2011; 2011/2012; 2012/2013 el maní tipo runner alto oleico proveniente de más de 10.000 hectáreas de la región centro-sur de la provincia de Córdoba de la República Argentina para determinar la ocurrencia de aflatoxinas proveniente del cultivo como resultado de factores climáticos.

Muestrear cada camión siguiendo procedimientos afines la industria, de forma tal de obtener una muestra representativa, en la cual se observarán y clasificarán los granos.

Determinar el contenido de ácido oleico en cada muestra, para confirmar que se trata de la variedad alto oleico.

Analizar por la metodología desarrollada el contenido de aflatoxinas en cada una de las muestras de camiones.

Objetivos

Evaluar los tratamientos postcosecha de acondicionamiento y secado para determinar las variables que tienen incidencia en el desarrollo e incremento de aflatoxinas durante su posterior almacenamiento.

El crecimiento de hongos en los frutos secos está normalmente relacionado con algunos cambios en su bioquímica y, a veces en las características visuales (Pomeranz, 1992; Wacowicz., 1991). La decoloración o manchas en la piel o del núcleo de material, la aparición de material fluorescente, los cambios en la superficie, el nivel de cambios por espectroscopía de reflectancia y transmitancia, la densidad y tamaño en relación con los granos buenos son algunas de las características que se han observado como consecuencia del crecimiento de hongos (Kumar et al., 1997; Pomeranz, 1992).

Algunas tecnologías son capaces de detectar y eliminar los granos dañados o afectados en sus características, como una forma de llegar a una reducción de los niveles de aflatoxinas.

Evaluar, optimizar y determinar la incidencia del proceso de blanqueado en seco sobre los niveles de aflatoxinas a través del procesamiento de lotes de maní tipo runner alto oleico en líneas de procesamiento industriales de la región, para reducir el contenido de

Objetivos

aflatoxinas de lotes contaminados a valores comercialmente aceptables y no nocivos para la salud, logrando a su vez minimizar las mermas de procesamiento sin afectar la calidad física, química ni sensorial del producto.

Desarrollar un modelo estadístico matemático para predecir la concentración final de aflatoxinas en lotes de exportación aptos para los mercados internacionales.

Establecer criterios que permitan desarrollar un sistema integrado de calidad para prevenir la ocurrencia de aflatoxinas en maní blanqueado.

MATERIALES Y MÉTODOS

3 Materiales y métodos

Para el desarrollo y ejecución de la tesis se emplearon los laboratorios de la Universidad Nacional de Entre Ríos, los laboratorios privados de JLA Argentina S.A. habilitados y certificados por el SENASA, y las muestras fueron obtenidas por muestreador neumático de cinco Plantas medianas productoras-exportadoras de maní de primer nivel, con certificaciones de Buenas Prácticas de Manufactura, de la región centro-sur de la provincia de Córdoba, localizadas en las localidades de Las Acequias, en el Parque Industrial de General Deheza, en la localidad de Ticino, en la localidad de Dalmacio Velez y la localidad de Pasco. Se emplearon 3 líneas de blanqueado industrial de las Plantas mencionadas.

Cabe destacar que el sector en Córdoba está compuesto por 24 empresas entre las cuales hay 2 empresas de capitales extranjeros radicadas en nuestro país desde hace muchos años. El 50% de las exportaciones son realizadas por 4 empresas nacionales, el 39% por 9 empresas medianas y el 11% restante son realizadas por 11 compañías pequeñas.

El muestreo de los camiones de maní en caja proveniente de cada campo se efectuó de acuerdo a la Resolución 1075/94- Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca - Sanidad Vegetal -Normas de Calidad, Muestreo y Metodología para los granos y subproductos. - Norma XXII Muestreo en Granos – Mercadería a granel - Punto 3.1.1.1. Chasis y 3.1.1.2. Acoplados.

Materiales y métodos



Figura 17: Muestreador neumático empleado en el muestreo de maní en caja

Este equipo operó a 6 metros de altura y poseía desplazamiento longitudinal y transversal, lo que permitió localizar la sonda en diferentes puntos del chasis y acoplado según el esquema de muestreo siguiente.

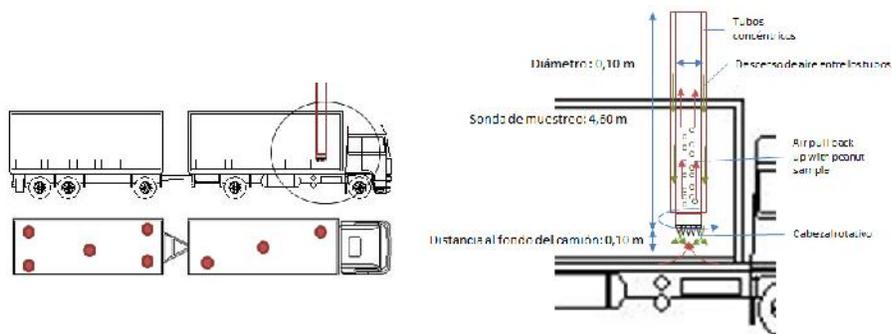


Figura 18: Esquema de muestreo y principio de funcionamiento del muestreador neumático

La sonda constó de dos tubos concéntricos de aluminio de 4 pulgadas de diámetro interno y otro interno de 2,5 pulgadas; el tubo externo fijo y el interior móvil acoplado a un cabezal de aluminio tipo

corona que permitió introducirse dentro de la masa de maní en caja sin romper las mismas.

Entre ambos caños hubo un flujo descendente de aire que permitió abrir paso a la sonda para que se introdujese hasta el fondo del punto de muestreo.

El caño interior de menor diámetro tenía un flujo ascendente de aire, y es este flujo el que levantó las cajas de maní, grano suelto y cuerpos extraños.

Esta muestra se almacenó en un reservorio colocado dentro del mismo carro de desplazamiento y desde allí, una vez finalizado el muestreo en los ocho puntos se dividió en dos partes iguales.

La presión diferencial entre los dos flujos de aire fue de 10 pulgadas de agua.

De este modo se obtuvo una muestra representativa de 20 kg, que fue limpiada para eliminar cuerpos extraños y granos sueltos (sin vaina) procedentes del campo (tierra, tallos, piedras, etc), tamañada y descascarada a máquina.

3.1 Análisis de humedad

Para la determinación de humedad en granos de maní se empleó una estufa eléctrica de circulación forzada de aire marca ORL equipada con controlador digital PID Novus 1200 y cápsulas de aluminio de 5 cm de alto y 2,5cm de diámetro y una balanza analítica de precisión marca Sartorius modelo M-Power AZ-214.

Materiales y métodos

Para el análisis de humedad se trituraron en un molinillo $10 \pm 0,1$ gramos aproximadamente de maní y se colocaron en la cápsula de aluminio previamente tarada. Luego se colocó en estufa a 130 ± 3 °C durante 165 minutos.

Posteriormente se colocaron las cápsulas en un desecador a temperatura ambiente y se pesaron. Se calculó el porcentaje de humedad por diferencia de peso. El porcentaje de humedad se consideró al décimo y las lecturas se realizaron por duplicado, no difiriendo el promedio de las lecturas en más del 2% con respecto a los valores parciales obtenidos.

3.2 Muestreo de producto blanqueado

El producto final, ya blanqueado se muestreó de acuerdo con la el reglamento UE 178/2010 método de muestreo en donde el 100% o la totalidad de los bolsones son muestreados tomando 100 muestras elementales del lote que tiene como máximo 25.000 kg con un calador cilíndrico.

El calador cilíndrico o calador sonda constaba de dos tubos metálicos, uno dentro de otro con un espacio mínimo entre ambos. Cada uno de los tubos poseía una serie de perforaciones, equidistantes entre sí, cada una de las cuales corresponde a un compartimiento en el tubo interior. Cada compartimiento o celdilla tenía una capacidad aproximada de 50 cm³. Las perforaciones de los tubos se superponían al girar, desde

Materiales y métodos

la parte superior, un tubo con relación al otro, por lo que el calador pudo penetrar en la masa del grano y salir de ella con los compartimientos cerrados o abrirse para tomar la muestra en el instante adecuado (Bolsa de Cereales de Córdoba, 2015).



Tubo de muestreo



Altura del tubo de muestreo



Apertura del saco



Introducción del saco



Apertura del muestreador



Retiro y colección de muestra

Figura 19: Muestreo de lotes de maní blanqueado

3.3 Análisis de aflatoxinas

Si bien en la actualidad existen diversos métodos para el análisis de aflatoxinas, en la industria argentina predominan dos de ellos, uno que emplea columnas de inmunoafinidad y los métodos por HPLC o combinación de columnas de inmunoafinidad con HPLC.

Por cuestiones de costos, más allá de los métodos más difundidos entre los laboratorios que certifican el contenido de aflatoxinas predominan aquellos que emplean HPLC.

Para la cuantificación de aflatoxinas, basado en las técnicas mencionadas se desarrolló un método con las siguientes etapas:

1. Reducción de la muestra
2. Homogeneización de la muestra
3. Extracción sólido-líquido
4. Limpieza (clean-up)
5. Separación
6. Cuantificación por HPLC (derivatización post-columna y detección fluorimétrica)

Materiales y métodos

Los laboratorios que certifican aflatoxinas presentan metodologías de preparación de muestras que tienden a minimizar los residuos generados, principalmente por los altos costos de deposición, y generan pastas de maní sólidas, no siempre homogéneas que pueden alterar los resultados obtenidos, dado la naturaleza de la distribución de aflatoxinas.

La molienda húmeda con producción de una suspensión de finas partículas ha sido el mejor método de extracción (Menguy, 2003)

El método desarrollado, es un método simple, de bajo costo, basado en los métodos europeos, con mejoras respecto a los de uso habitual, pero con la desventaja de la mayor generación de efluentes que deberán segregarse para tratarse adecuadamente.

En las Plantas en la que se desarrollaron los ensayos, se encontró que anualmente existen lotes, en los cuales los laboratorios han reportado valores “ND” en lotes o debajo de los límites aceptables para la UE, sin embargo, estos lotes sin ser detectados por la Autoridad Sanitaria han sido rechazados en destino por los clientes, como se indican en la tabla 7 con cuatro lotes cuestionados.

Materiales y métodos

Esto puede deberse a un error en el muestreo, analítico y/o generación de aflatoxinas durante el transporte marítimo.

La etapa de preparación con una molienda en húmedo seguida por una extracción sólido-líquido es una diferencia importante respecto a los métodos empleados actualmente por los laboratorios certificadores, en donde, se realiza como primera etapa una homogeneización de la muestra de maní convirtiéndolo en pasta de maní, en donde la granometría obtenida de dicha pasta no es homogéneamente uniforme en toda su masa.

Tabla 7: Resultados de aflatoxinas de lotes en origen y en destino

Concentración de aflatoxinas ($\mu\text{g}/\text{kg}$)							
Análisis en destino				Análisis en origen			
A.AFB1	A.AFTTotal	B.AFB1	B.AFTtotal	A.AFB1	A.AFTTotal	B.AFB1	B.AFTtotal
17,00	19,00	< 0,5	< 2,0	ND	ND	ND	ND
7,10	8,00	< 0,5	< 2,0	ND	ND	ND	ND
15,00	16,00	0,79	< 2,0	ND	ND	ND	ND
< 0,5	< 2,0	16,00	18,00	1,40	1,40	0,90	0,90

3.3.1 Reducción de la muestra

El divisor de muestras fue del tipo *Boerner* y constaba de tolva receptora de grano con forma de cono invertido de una capacidad variable, comunicada por su base al cono por medio de una válvula que permitió cortar o continuar el flujo de granos. El cono, recinto donde se produjo la expansión del grano, continúa su base con la corona divisoria, y constaba de 40 celdillas que dividieron la muestra en partes iguales, derivándolas a las bandejas ubicadas debajo. Estas se encontraban de a dos, una debajo de la otra y recibieron el grano separado desviándolo a dos salidas o recipientes, donde se descargó finalmente el grano.

El procedimiento se repitió, con uno de los cajones hasta reducir la muestra a valores aceptables para el análisis.

3.3.2 Homogeneización de la muestra

Las muestras de granos de maní fueron homogeneizadas para obtener una muestra de 800 gramos y colocadas en una licuadora Metvisa® Modelo LRA.4 de 4 litros de capacidad y 1200W de potencia. A la misma se le adicionó 2 litros de agua destilada y se procesó durante 5 minutos a la máxima potencia.

3.3.3 Extracción de aflatoxinas

Se tomaron 70 gramos de esta mezcla acosa o slurry y se homogeneizó nuevamente en una licuadora Metvisa® Modelo LRA.1.5 de 1.5 litros de capacidad y 800W con 75 ml de metanol marca Cicarelli (alcohol metílico anhidro Pro-análisis (ACS) CAS 67-56-1).

3.3.4 Purificación

La muestra de 75 ml se filtró por papel de filtro whatman N° 4 para separar el sólido y luego se purificó a través de una columna de limpieza de R-Biopharm (P25) que contiene alúmina y que permite retener las impurezas de la muestra. Se colectaron aproximadamente 1 ml de filtrado en un tubo vial de 2 ml.

3.3.5 Análisis cromatográfico de aflatoxinas

Se empleó un sistema cromatografico Agilent, compuesto por una Bomba isocrática, Modelo: G1310 A, N° de serie: DE 14904652, un Inyector automático, Modelo: G1313 A, N° de serie: DE 91609929; un Detector de fluorescencia, Modelo: G1321 A, N° de serie: DE 90900930, un compartimiento de Columna (termostatizado), Modelo: G1316 A N° de serie: DE 03016124, un derivatizador post-columna Kobra Cell,

Materiales y métodos

Software Chemstation, N° de producto: G21185AA Código de revisión: A.10.02 Numero de registro. CN1A12D647. Columna HPLC- Agilent Cartridge 250-4 – LiChrospher® 100 RP-18 (5µm)-Part No. 79925OD-58K. Fase Movil: 0.12g BrK - 0,2ml HNO - 225 ml Acetonitrilo marca Sintorgam grado HPLC – 225 ml Metanol HPLC (Merk) y 250 ml de agua grado HPLC. Flujo: 1 ml/min. Volumen de inyección: 30 µl. Temperatura del horno de columna: 40°C

3.3.6 Estandares cromatográficos

Se emplearon estándares cromatográficos Aflatoxin B1, 1x1ml, MeOH, 20ug/ml Supelco ® y Aflatoxin Mix Supelco ®, ambos en metanol. A partir de estos estándares por dilución en MeOH grado HPLC se prepararon las distintas concentraciones.

3.4 Análisis de ácido oleico

Se realizó por extracción del aceite y derivatización de los ácidos grasos por conversión en esteres metílicos de las muestras de maní en caja.

3.4.1 Extracción del aceite en frío.

El aceite fue obtenido por prensado en frío de 10 gramos de semillas de maní empleando una prensa neumática a 100 Bar de presión.

3.4.2 Derivatización de ácidos grasos.

Para preparar la solución de álcali se disolvieron 56g de KOH en 1000 ml de metanol pro-análisis Sintorgam y se dejó reposar durante 24 hs en frasco color caramelo.

Se homogenizó el aceite y trasvasaron 10 gotas (aproximadamente 250 mg) a un tubo de ensayo de un volumen mínimo de 10 ml con tapa a rosca. Se adicionaron 2 ml de solución KOH marca Anedra en metanol y se agitó durante 1 minuto en agitador de tubos vortex modelo Instrulab Mod AV1.

Posteriormente se colocó en baño de inmersión a 70-80°C durante 5 minutos hasta que la solución se tornó transparente, y se agitó esporádicamente para favorecer la saponificación. Se retiró el tubo, y se dejó enfriar unos minutos a temperatura ambiente. Se adicionaron 5 ml. de hexano y se agitó de 1 a 2 minutos en vortex para acelerar la separación de fases.

Se tomó del sobrenadante aproximadamente 0.4 µl.

3.4.3 Análisis cromatográficos

Los ésteres metílicos de ácidos grasos fueron analizados en un cromatógrafo de gases Marca Perkin Elmer modelo Clarus 500, acoplado a un detector de ionización de llama (FID) y equipado con una columna SPTM Fused Silica Capillary Column 2380 (60 m x 0,25 mm x 0,2 µm film thickness, Supelco).

Se trabajó en modo split con una relación 50:1. La temperatura del inyector se estableció en 250°C y la del tector FID a 280°C, el flujo del gas portador se estableció en 1ml/min.

Para la detección de los ácidos grasos se diseñó un programa de temperaturas de 100°C y luego un aumento de temperatura a razón de 15°C/min hasta llegar a los 260 manteniendo durante 5 minutos.

Se utilizó la mezcla estándar de ácidos grasos F.A.M.E Mix (C4-C24, Sigma Aldrich) para la identificación de los ácidos grasos. Se inyectó 0,5 µl del estándar. Los resultados de ácido oleico se obtuvieron directamente según la proporción de este ácido graso sobre el total de ácidos grasos presentes en la muestra.

3.5 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se empleó el software Minitab® y el Statgraphics Centurion™, empleando el Análisis de Varianza, test de comparación de medias, y regresión lineal.

Para la validación del método de análisis de aflatoxinas se determinó la linealidad, los límites de detección, los límites de cuantificación, la exactitud y recuperación, y la incertidumbre.

3.5.1 Linealidad

Para la determinación de la linealidad se prepararon 5 niveles de estándares de concentraciones crecientes. Se utilizó el estándar concentrado Supelco (catálogo 46304-U) lote: LC-07224V. Cada nivel se inyectó por triplicado.

En la siguiente tabla se muestran las concentraciones de cada toxina y totales de cada nivel.

Tabla 8: Concentración de las soluciones de estándares preparadas (ng/ml)

Aflatoxina	Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3	Nivel 4	Nivel 5
G2	0,27	1,70	3,40	8,84	17,00
G1	0,84	5,27	10,53	27,38	52,65
B2	0,24	1,47	2,94	7,64	14,70
B1	0,88	5,49	10,98	28,55	54,90
Totales	2,23	13,93	27,85	72,41	139,25

3.5.2 Límite de detección

El límite de detección se realizó siguiendo las indicaciones del punto 4.2 del documento del Organismo Argentino de Acreditación GUI-LE-03, Versión 1.

Se realizan agregados por septuplicado de estándar concentrado a una muestra de maní negativo para obtener concentraciones bajas de aflatoxinas. Esperando que estas concentraciones se encuentren entre tres y cinco veces los límites a estudiar.

Se toma la desviación estándar (SD) a ese nivel como si fuera la señal que presentaría una muestra blanco y se utiliza la siguiente aproximación:

$$\text{LDM} = t_{(0,02)} \times \text{SD} \quad \text{Ecuación N}^{\circ}1$$

Los siete ensayos se realizaron de la siguiente manera, a tres muestras de 80g de pasta de maní blanco (libre de aflatoxinas) y se les agregó 180 µl de estándar concentrado (Supelco 46304-U lote LC-07224V de 2,79 µg/ml de aflatoxinas totales) y se licuaron con 200ml de agua (se redujo la parte inicial de la técnica en un factor de 10). De dos de estas mezclas acuosas (slurry) se tomaron dos porciones de 70g y de

Materiales y métodos

la tercera tres porciones de 70g, continuando luego con la técnica descripta al comienzo del informe, para obtener los siete resultados necesarios para realizar el cálculo de límite de detección. La concentración teórica de aflatoxinas se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 9: Concentraciones teóricas agregadas sobre una muestra de maní negativa

Nivel	AFG2	AFG1	AFB2	AFB1	Totales
6,27 µg/kg	0,77 µg/g	2,37 µg/g	0,66 µg/g	2,47 µg/g	6,27 µg/g

El procesamiento de las muestras e inyección en el HPLC se realizó todo el mismo día.

3.5.3 Límite de cuantificación

El límite de Cuantificación del método se calculó siguiendo las indicaciones del punto 4.2 del documento del GUI-LE-03, Versión 1. Se considera 10 veces el desvío estándar (SD) utilizado para el cálculo del LDM.

3.5.4 Exactitud

Se realizó el estudio de los porcentajes de recuperación agregando a una pasta de maní con 0 µg/kg de aflatoxinas totales o

Materiales y métodos

blanco, cantidades conocidas de aflatoxina y se comparan los valores experimentales encontrados al analizar estas muestras, con los valores teóricos de dichos agregados.

En este punto se incluyen los valores de recuperación obtenidos para el cálculo de Límite de detección y posteriormente por triplicado se analiza una muestra blanco a la que se le agregan 12,18 µg/kg de aflatoxinas totales.

Se utilizó el estándar concentrado Supelco 46304-U lote LC-07224V de 2,79 µg/ml de aflatoxinas totales y una pasta blanco con 0 µg/Kg de aflatoxinas totales. En la siguiente tabla se muestran los valores de concentración teóricos para cada aflatoxina.

Tabla 10: Concentraciones teóricas agregadas sobre una muestra de maní negativa

Nivel	Volumen (µl) de estándar conc. agregado sobre 80g de muestra blanco	Aflatoxina (µg/kg)				
		AFG2	AFG1	AFB2	AFB1	Totales
1	180	0,77	2,37	0,66	2,47	6,27
2	350	1,49	4,61	1,29	4,80	12,18

3.5.5 Repetibilidad

La repetibilidad es la precisión obtenida bajo las mismas condiciones de operación en un intervalo corto de tiempo (mismo día), por un mismo analista, en la misma muestra homogénea y en el mismo equipo.

Para este cálculo se utilizan los valores de las recuperaciones a 6,27 µg/kg utilizadas en el punto del límite de detección porque fueron realizadas en condiciones de repetibilidad.

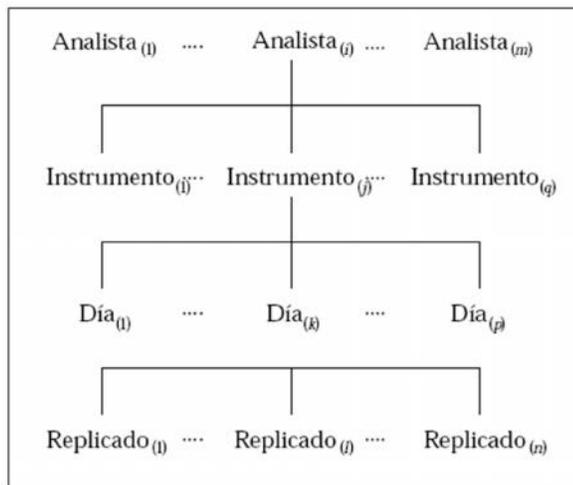
3.5.6 Reproducibilidad (precisión Intermedia)

Se realizó un estudio de precisión intermedia a través de un diseño experimental *anidado completo*. Los factores de variabilidad estudiados en un diseño anidado deben colocarse de forma que los factores que estén más afectados por errores sistemáticos estén más arriba en el diseño y los menos afectados por errores sistemáticos más abajo.

Normalmente, los factores que suelen variarse para obtener la precisión intermedia de series diferentes son el analista, el instrumento,

el día y el replicado. La figura siguiente muestra cómo se ordenarían estos factores en el diseño anidado.

Tabla 11: Esquema ilustrativo de precisión intermedia



Siguiendo este diseño, una muestra homogénea y estable debería ser analizada por m analistas. A su vez, cada analista debería analizar dicha muestra en q instrumentos diferentes. En cada uno de esos instrumentos, se debería analizar la muestra en p días diferentes y, en cada uno de esos días, deberían hacerse n replicados de la muestra.

Materiales y métodos

Se realizó un plan de ensayos según este esquema. Se utilizó una Pasta Control de maní contaminada naturalmente, provista por los laboratorios de JLA Argentina (pasta control lote 74/2014).

Tabla 12: Resumen de ensayos

Día	Analistas	Muestra	Equipo	Cantidad de ensayos
Día 1	ANALISTA 1 ANALISTA 2 ANALISTA 3 ANALISTA 4	Pasta control por duplicado	HPLC 2	16
Día 2	ANALISTA 1 ANALISTA 2 ANALISTA 3 ANALISTA 3	Pasta control por duplicado	HPLC 2	

3.5.7 Evaluación de la incertidumbre

Las etapas involucradas en la determinación de aflatoxinas AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂ en maní son las siguientes:



Materiales y métodos

La concentración de aflatoxina (CAfla) queda expresada como:

$$C_{\text{Afla (ppb o ng/g o } \mu\text{g/kg)}} = \frac{A_m * C_{\text{st(ng/g)}}}{A_{\text{st}}} * \frac{M_{\text{extr.(g)}}}{M_{\text{m(g)}}} * \frac{M_{\text{sol.final.(g)}}}{M_{\text{slurry(g)}}} * F_{\text{rec}}$$

Ecuación N°2

Dónde:

A_m = Área de la muestra.

A_{st} = Área del Estándar.

C_{st} = Concentración del Estándar.

M_{extr} = Peso de la mezcla extractiva (muestra + agua).

M_m = Peso de la muestra.

$M_{\text{sol.final}}$ = Peso de la solución final filtrada (50g de agua + 59.2g de metanol).

M_{slurry} = peso de la alícuota de mezcla agua+muestra (70g de slurry)

F_{Rec} = Factor de recuperación, cuando corresponda.

En este caso la ecuación se resume a:

$$C_{\text{Afla (ppb o ng/g o } \mu\text{g/kg)}} = \frac{A_m * C_{\text{st(ng/g)}}}{A_{\text{st}}} * \frac{2800\text{g}}{800\text{g}} * \frac{109,2\text{g}}{70\text{g}} * F_{\text{rec}} = \frac{A_m * C_{\text{st(ng/g)}}}{A_{\text{st}}} * 5,46 * F_{\text{rec}}$$

Ecuación N°3

Suposiciones respecto de la validación del método y la estimación de la incertidumbre:

- Los estudios son representativos de la operación normal del método.
- Los valores de incertidumbre estimados son aplicables desde concentraciones en el límite de cuantificación del

Materiales y métodos

método hasta concentraciones no mayores a 500 µg/Kg como aflatoxinas totales.

Las etapas en la cuantificación de la incertidumbre son:

Estudio de la precisión intermedia. Este estudio engloba varias fuentes de incertidumbre de la preparación de la muestra y la inyección en el HPLC (ver diagramas causa efecto).

Estudio de la exactitud desde el proceso de validación y datos “in house” (ensayos de recuperación).

Estudio de la Incertidumbre en la calibración del equipo para análisis de aflatoxinas. Incluye la incertidumbre de la concentración certificada de los materiales de referencia (estándares), y la preparación de los tres niveles de concentración a partir del estándar concentrado.

La aproximación para el cálculo de la incertidumbre combinada relativa emplea estudios “in house” y de validación del método, su expresión es:

$$ru_combinada = \sqrt{ru_precisión^2 + ru_recup.^2 + ru_conc.std.calib^2}$$

Ecuación N°4

La incertidumbre expandida relativa al 95 % de confianza es:

$$rU = 2 * ru_combinada$$

Ecuación N°5

Dónde:

$$ru \text{ (incert. relativa)} = \frac{\text{Incert. (u)}}{\text{Valor medio}}$$

Ecuación N°6

ru_precisión: incertidumbre relativa estándar de la precisión.

ru_recup: incertidumbre relativa estándar de la veracidad.

ru_calibración: incertidumbre relativa estándar de la calibración del HPLC para aflatoxinas.

ru_combinada: incertidumbre relativa estándar combinada.

rU: incertidumbre relativa expandida.

3.5.8 Estudio de la exactitud (recuperaciones)

Se muestran como factores de recuperación. Calculados como:

$$F = \frac{\text{concentración_obtenida}}{\text{concentración_esperada}}$$

La incertidumbre se calcula como:

Ecuación N°7

$$ru_{\text{bias}} = \frac{SD}{\text{valor medio}}$$

Ecuación N°8

3.5.9 Estudio de la incertidumbre de la concentración de los estándares para la calibración

Calculado como:

$$ru_conc.std.calib = \sqrt{ru_conc.std.^2 + ru_Vol.std.conc.^2 + ru_dilución.std.^2}$$

Ecuación N°9

Incertidumbre de la concentración certificada de los estándares:

Este dato fue suministrado por el fabricante: N° Cat 46304-U
Lote: LC-07224V

$$ru_conc.std = \frac{u}{\text{valor concentración}}$$

Ecuación N°10

3.5.10 Cálculo de la incertidumbre expandida

Utilizando las ecuaciones 4 y 5 se calculó la incertidumbre combinada y expandida.

Para la estimación de la incertidumbre de las aflatoxinas totales se utilizó la propagación de errores para una suma.

La incertidumbre asociada a cada valor de concentración de aflatoxina obtenido hasta no más de 500 µg/kg de aflatoxinas totales es:

$$U_G2 = [G2] * 0,52$$

$$U_G1 = [G1] * 0,16$$

$$U_B2 = [B2] * 0,32$$

$$U_B1 = [B1] * 0,14$$

$$U_TOTALES = [TOTALES] * 0,66$$

Dónde:

U_G2 = Incertidumbre expandida correspondiente a la determinación de aflatoxina G2

U_G1 = Incertidumbre expandida correspondiente a la determinación de aflatoxina G1

U_B2 = Incertidumbre expandida correspondiente a la determinación de aflatoxina B2

U_B1 = Incertidumbre expandida correspondiente a la determinación de aflatoxina B1

U_TOTALES = Incertidumbre expandida correspondiente a la determinación de aflatoxinas totales.

[G2], [G1], [B2], [B1], [TOTALES]: Concentración de la correspondiente aflatoxina.

3.6 Líneas de proceso industrial

Los lotes de maní confitería de cada uno de los 3 ciclos agrícolas con presencia de aflatoxina fueron procesados en la línea de blanqueado en seco que se detalla a continuación, con las consideraciones que se detallarán en Resultados y discusión.

Las líneas de proceso de maní blanqueado (Figura 20) eran semejantes, en cuanto a equipos y funcionamiento, pero a continuación se describe aquella donde se procesó la mayor proporción de lotes. La misma poseía varios elevadores y transportes vibratorios que desplazaban el producto desde una destoner LMC MARC 481 equipado con un ventilador de 10HP y un motor de 2HP para eliminar impurezas,

Materiales y métodos

un destoner magnético marca Insel para eliminar materiales con propiedades metálicas, un horno de cuatro zonas de calentamiento y dos zonas de enfriamiento marca Proctor Modelo 5000 roaster, dos selectoras electrónicas Sortex Z+ en serie y 8 blanchers Tecnoline ®, tolva de envasado y detectores de metal marca Penta ®, siendo esta una línea estándar de las empleadas en la región para obtener maní blanqueado.



Tolva de alimentación y blanchers



Horno de blanqueado



Egreso de los blanchers



Rechazo de la selectora electrónica

Materiales y métodos



Salida de selectora electrónica



Transporte y eleavor al egreso de selectora



Elevador a tolva de envasado



Envasado

Figura 20: Línea de producción de maní blanqueado empleada

3.7 Análisis microbiológicos: recuento de hongos y levaduras en muestras de maní

Para analizar la calidad microbiológica de la semilla se realizaron análisis para determinar el contenido inicial de hongos y levaduras de acuerdo a ISO 7954:1987.

Además se determinó la carga fúngica para determinar cuál es la composición de *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* y *Fusarium* en la semilla

Materiales y métodos

inicial que se utilizó para los cultivos de acuerdo la técnica de blotter test según normas ISTA (2006) en 4 repeticiones de 100 semillas cada una.

Se resumen a continuación, en 3 diagramas, la metodología de trabajo empleada en el desarrollo de esta tesis.

Materiales y métodos

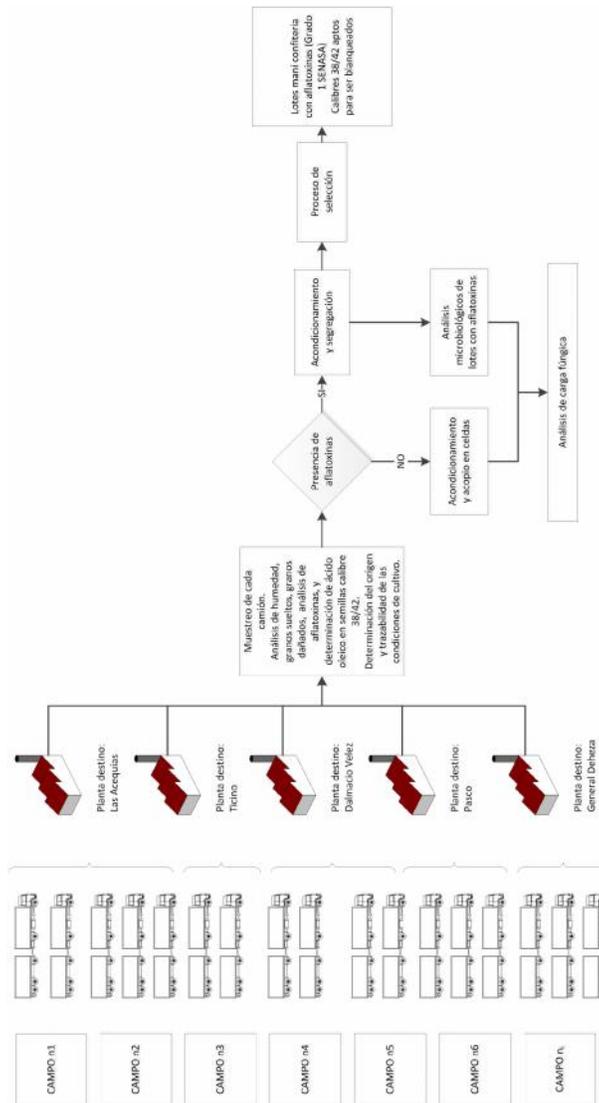


Ilustración 21: Esquema de la metodología empleada para el análisis de maní en caja en cada uno de los tres ciclos productivos

Materiales y métodos

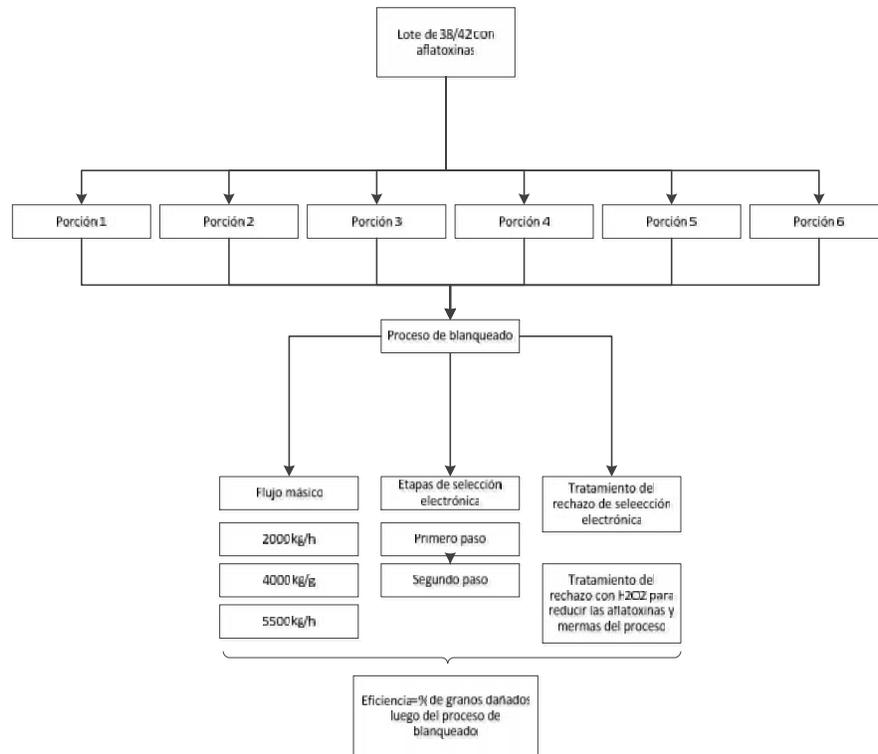


Ilustración 22: Análisis y selección de variables del proceso de blanqueado de maní con aflatoxinas

Materiales y métodos

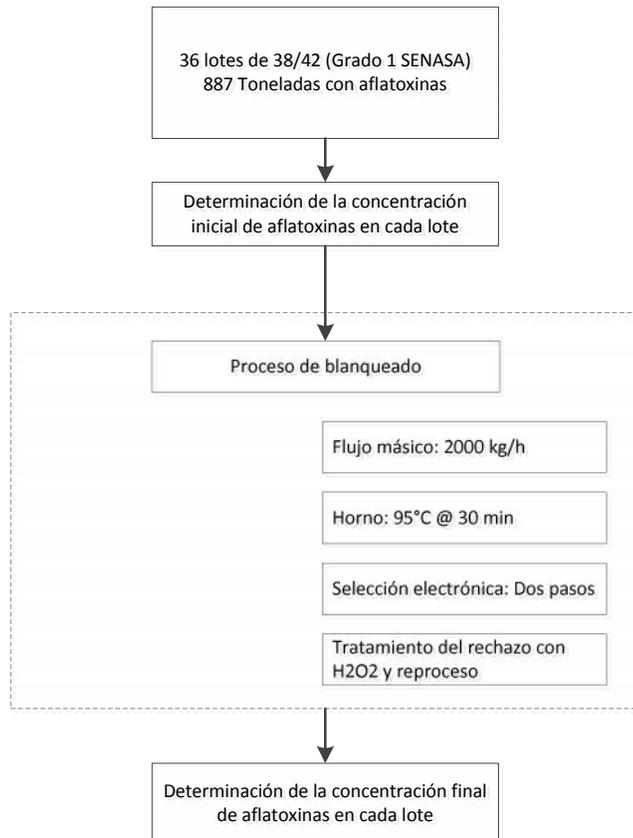


Ilustración 23: Proceso de blanqueado de maní de lotes con aflatoxinas para la determinación de la reducción de la contaminación

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Resultados y discusión

4 Resultados y discusión

4.1 Validación del método de análisis de aflatoxinas

4.1.1 Linealidad

Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 13: Resultados de inyecciones de linealidad

Aflatoxina		Concentración teórica (ng/ml)	área 1	área 2	área 3	Promedio	SD	CV%
G2	Nivel 1	0,27	2,5143	2,5711	2,5739	2,5531	0,0336	1,32%
	Nivel 2	1,70	13,5663	13,2365	13,2383	13,3470	0,1899	1,42%
	Nivel 3	3,40	25,8746	26,0004	25,7499	25,8750	0,1253	0,48%
	Nivel 4	8,84	66,5396	66,6285	66,5003	66,5561	0,0657	0,10%
	Nivel 5	17,00	129,7652	129,6941	129,4038	129,6210	0,1914	0,15%
G1	Nivel 1	0,84	7,4232	7,6290	7,3636	7,4719	0,1393	1,86%
	Nivel 2	5,27	41,5549	41,5281	41,2942	41,4591	0,1434	0,35%
	Nivel 3	10,53	81,5555	81,5849	81,2924	81,4776	0,1610	0,20%
	Nivel 4	27,38	208,6610	208,7906	208,6415	208,6977	0,0811	0,04%
	Nivel 5	52,65	406,0601	407,1332	406,4048	406,5327	0,5478	0,13%
B2	Nivel 1	0,24	4,6801	4,6481	4,5085	4,6122	0,0912	1,98%
	Nivel 2	1,47	25,7202	25,3916	25,5256	25,5458	0,1652	0,65%
	Nivel 3	2,94	50,1907	49,9565	49,9003	50,0158	0,1540	0,31%
	Nivel 4	7,64	128,5207	128,5848	128,1332	128,4129	0,2443	0,19%
	Nivel 5	14,70	249,9399	250,4517	250,5216	250,3044	0,3176	0,13%
B1	Nivel 1	0,88	9,2940	9,2550	9,1355	9,2282	0,0826	0,89%
	Nivel 2	5,49	51,8066	51,4919	51,5430	51,6138	0,1689	0,33%
	Nivel 3	10,98	101,5176	101,3603	101,7467	101,5415	0,1943	0,19%
	Nivel 4	28,55	260,3382	259,7554	259,0239	259,7058	0,6586	0,25%
	Nivel 5	54,90	506,1815	507,2433	508,0619	507,1622	0,9428	0,19%

Resultados y discusión

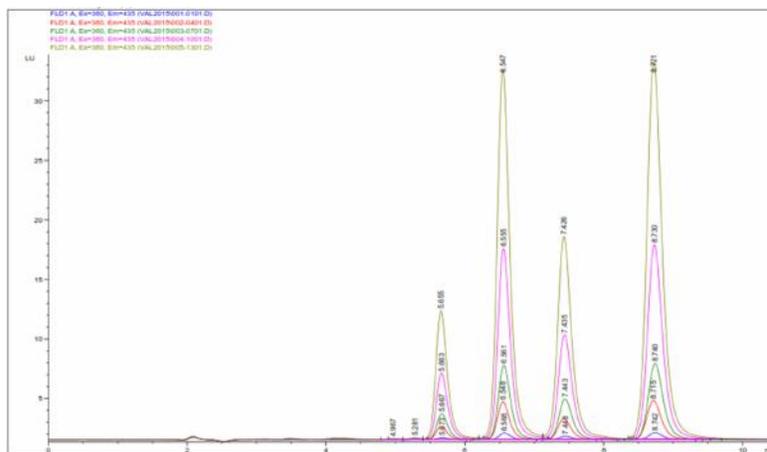


Figura 24: Cromatograma de diferentes niveles de concentración de aflatoxinas

Los cromatogramas obtenidos muestran un orden de elución de las aflatoxinas AFG2; AFG1; AFB2 y finalmente la AFB1.

Con estos datos se calculó la recta de regresión lineal y los residuales para cada toxina, lo cual se muestra en los gráficos que siguen.

Resultados y discusión

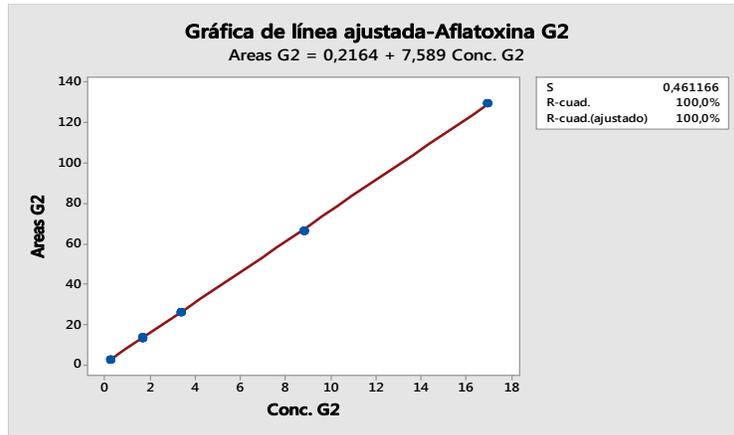


Figura 25: Regresión lineal para AFG2

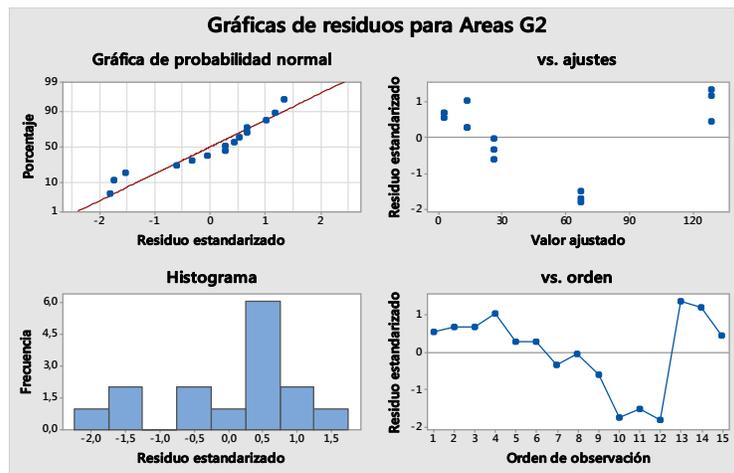


Figura 26: Residuos y valores ajustados para AFG2

Resultados y discusión

Tabla 14: Datos del cálculo de residuales para AFG2

Observación	Áreas G2	Ajuste	Residuo	Residuo estándar
1	2,514	2,281	0,234	0,54
2	2,571	2,281	0,290	0,68
3	2,574	2,281	0,293	0,68
4	13,566	13,118	0,448	1,03
5	13,236	13,118	0,119	0,27
6	13,238	13,118	0,120	0,28
7	25,875	26,019	-0,145	-0,33
8	26,000	26,019	-0,019	-0,04
9	25,750	26,019	-0,269	-0,61
10	66,540	67,304	-0,764	-1,73
11	66,628	67,304	-0,675	-1,53
12	66,500	67,304	-0,804	-1,82
13	129,765	129,231	0,535	1,36
14	129,694	129,231	0,463	1,18
15	129,404	129,231	0,173	0,44

Resultados y discusión

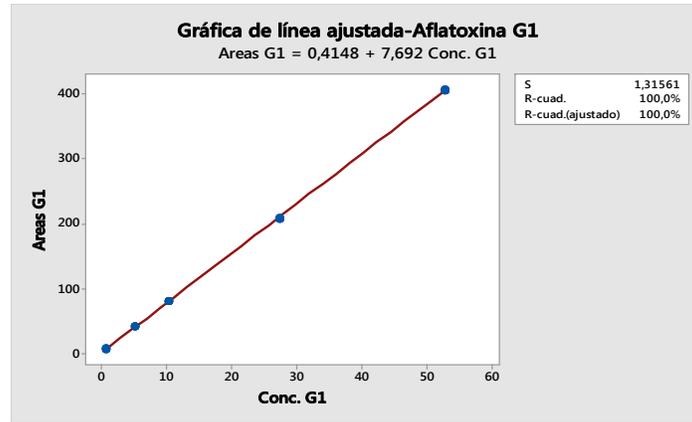


Figura 27: Regresión lineal para AFG1

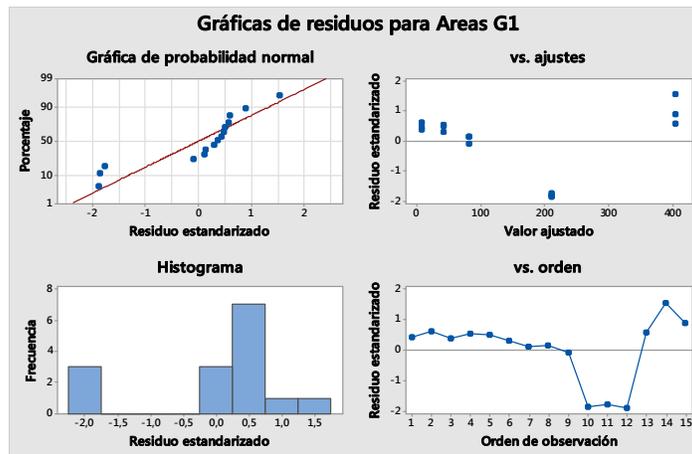


Figura 28: Residuos y valores ajustados para AFG1

Resultados y discusión

Tabla 15: Datos del cálculo de residuales para AFG1

Observación	Áreas G1	Ajuste	Residuo	Residuo estándar
1	7,423	6,895	0,529	0,43
2	7,629	6,895	0,734	0,60
3	7,364	6,895	0,469	0,38
4	41,555	40,914	0,641	0,51
5	41,528	40,914	0,614	0,49
6	41,294	40,914	0,380	0,31
7	81,555	81,413	0,142	0,11
8	81,585	81,413	0,172	0,14
9	81,292	81,413	-0,121	-0,10
10	208,661	211,011	-2,350	-1,86
11	208,791	211,011	-2,220	-1,76
12	208,641	211,011	-2,369	-1,88
13	406,060	405,407	0,653	0,58
14	407,133	405,407	1,727	1,54
15	406,405	405,407	0,998	0,89

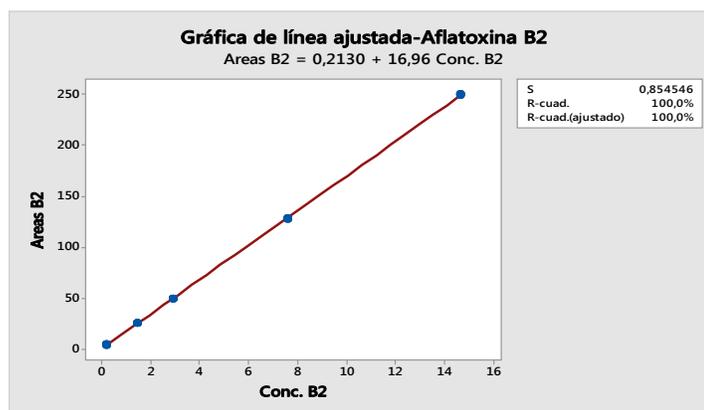


Figura 29: Regresión lineal para AFB2

Resultados y discusión

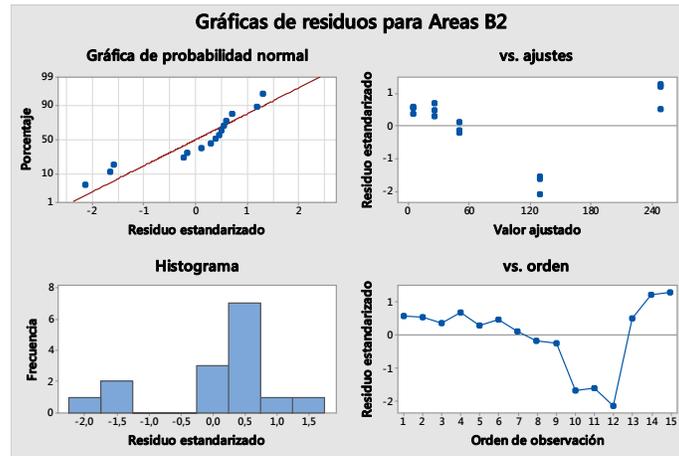


Figura 30: Residuos y valores ajustados para AFB2

Tabla 16: Datos del cálculo de residuales para AFB2

Observación	Áreas B2	Ajuste	Residuo	Residuo estándar
1	4,680	4,203	0,477	0,60
2	4,648	4,203	0,445	0,56
3	4,509	4,203	0,306	0,38
4	25,720	25,149	0,571	0,71
5	25,392	25,149	0,243	0,30
6	25,526	25,149	0,377	0,47
7	50,191	50,085	0,106	0,13
8	49,956	50,085	-0,129	-0,16
9	49,900	50,085	-0,185	-0,23
10	128,521	129,881	-1,360	-1,66
11	128,585	129,881	-1,296	-1,58
12	128,133	129,881	-1,747	-2,13 (*)
13	249,940	249,574	0,366	0,50
14	250,452	249,574	0,878	1,21
15	250,522	249,574	0,948	1,30

(*) denota una observación con un residuo estandarizado grande.

Resultados y discusión

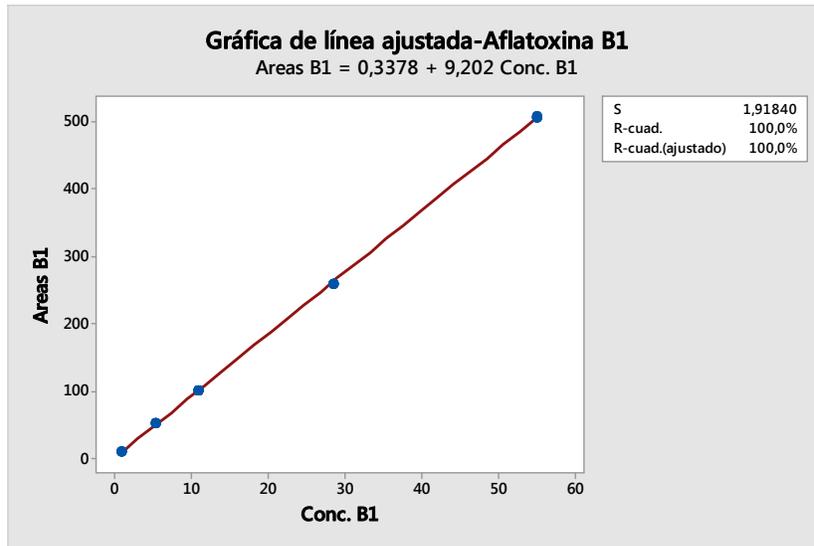


Figura 31: Regresión lineal para AFB1

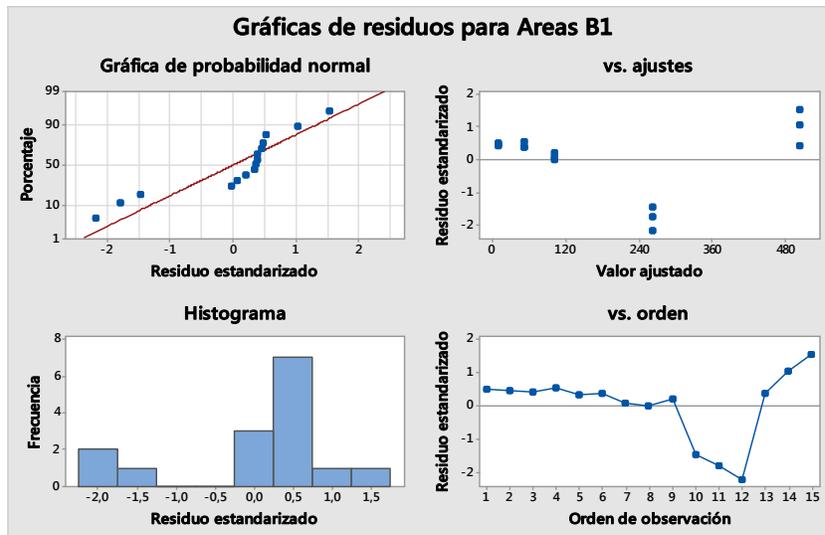


Figura 32: Residuos y valores ajustados para AFB1

Resultados y discusión

Tabla 17: Datos del cálculo de residuales para AFB1

Observación	Áreas B1	Ajuste	Residuo	Residuo estándar	
1	9,294	8,421	0,873	0,49	
2	9,255	8,421	0,834	0,47	
3	9,136	8,421	0,714	0,40	
4	51,807	50,859	0,948	0,52	
5	51,492	50,859	0,633	0,35	
6	51,543	50,859	0,684	0,38	
7	101,518	101,380	0,138	0,08	
8	101,360	101,380	-0,019	-0,01	
9	101,747	101,380	0,367	0,20	
10	260,338	263,046	-2,708	-1,47	
11	259,755	263,046	-3,291	-1,79	
12	259,024	263,046	-4,022	-2,18	*
13	506,182	505,546	0,635	0,39	
14	507,243	505,546	1,697	1,04	
15	508,062	505,546	2,516	1,54	

(*) denota una observación con un residuo estandarizado grande.

4.1.2 Límite de Detección

Se presentan a continuación los resultados obtenidos en la tabla debajo

Resultados y discusión

Tabla 18: Resultados recuperaciones a 6,27 µg/kg

Ensayos	Aflatoxinas (µg/kg)				
	AFG2	AFG1	AFB2	AFB1	Totales
Recup. 6,27 ng/g - 1	0,680	2,275	0,416	1,958	5,330
Recup. 6,27 ng/g - 2	0,658	2,233	0,421	1,868	5,180
Recup. 6,27 ng/g - 3	0,631	2,233	0,379	1,913	5,156
Recup. 6,27 ng/g - 4	0,735	2,099	0,413	1,808	5,054
Recup. 6,27 ng/g - 5	0,520	1,959	0,374	1,878	4,731
Recup. 6,27 ng/g - 6	0,576	2,278	0,485	1,948	5,287
Recup. 6,27 ng/g - 7	0,666	2,125	0,375	1,962	5,123
Promedio	0,638	2,172	0,409	1,905	5,123
Desv. Estd.	0,071	0,117	0,039	0,057	0,197
CV%	11,1%	5,4%	9,6%	3,0%	3,8%

Tabla 19: Límites de detección obtenidos

Parámetro	Aflatoxina G2 µg/kg	Aflatoxina G1 µg/kg	Aflatoxina B2 µg/kg	Aflatoxina B1 µg/kg
LDM:	0,22	0,37	0,12	0,18

4.1.3 Límite de Cuantificación

Los límites de cuantificación hallados para maní según el método descrito se resumen en la tabla debajo.

Resultados y discusión

Tabla 20: Límites de cuantificación de aflatoxinas obtenidos

Parámetro	Aflatoxina G2 µg/kg	Aflatoxina G1 µg/kg	Aflatoxina B2 µg/kg	Aflatoxina B1 µg/kg
LDM:	0,67	1,10	0,37	0,54

4.1.4 Exactitud

La tabla siguiente muestra los resultados de todas las recuperaciones. Las tres recuperaciones a 12,18 µg/kg fueron inyectadas y realizadas el mismo día.

Tabla 21: Concentraciones obtenidas y porcentajes de recuperación

Ensayos	Aflatoxinas														
	G2 teórico	G2 obtenido	G2 % recup	G1 teórico	G1 obtenido	G1 % recup	B2 teórico	B2 obtenido	B2 % recup	B1 teórico	B1 obtenido	B1 % recup	Totales teórico	Totales obtenido	Totales % recup
up. 6,27 ng/g - 1	0,765	0,680	88,9%	2,369	2,275	96,0%	0,662	0,416	63,0%	2,471	1,958	79,3%	6,266	5,330	85,1%
up. 6,27 ng/g - 2	0,765	0,658	86,1%	2,369	2,233	94,2%	0,662	0,421	63,6%	2,471	1,868	75,6%	6,266	5,180	82,7%
up. 6,27 ng/g - 3	0,765	0,631	82,5%	2,369	2,233	94,3%	0,662	0,379	57,3%	2,471	1,913	77,4%	6,266	5,156	82,3%
up. 6,27 ng/g - 4	0,765	0,735	96,1%	2,369	2,099	88,6%	0,662	0,413	62,4%	2,471	1,808	73,2%	6,266	5,054	80,7%
up. 6,27 ng/g - 5	0,765	0,520	68,0%	2,369	1,959	82,7%	0,662	0,374	56,6%	2,471	1,878	76,0%	6,266	4,731	75,5%
up. 6,27 ng/g - 6	0,765	0,576	75,3%	2,369	2,278	96,1%	0,662	0,485	73,4%	2,471	1,948	78,8%	6,266	5,287	84,4%
up. 6,27 ng/g - 7	0,765	0,666	87,0%	2,369	2,125	89,7%	0,662	0,375	56,7%	2,471	1,962	79,4%	6,266	5,123	81,8%
up. 12,19 ng/g - 1	1,488	1,418	95,3%	4,607	4,418	95,9%	1,286	0,998	77,6%	4,804	4,029	83,9%	12,184	10,864	89,2%
up. 12,19 ng/g - 2	1,488	1,381	92,8%	4,607	4,353	94,5%	1,286	0,960	74,7%	4,804	3,999	83,3%	12,184	10,693	87,8%
up. 12,19 ng/g - 3	1,488	1,271	85,4%	4,607	4,335	94,1%	1,286	0,921	71,6%	4,804	3,811	79,3%	12,184	10,338	84,8%
Promedio			85,7%			92,6%			65,7%			78,6%			83,4%
SD			8,8%			4,3%			8,0%			3,3%			3,8%
CV%			10,3%			4,7%			12,2%			4,2%			4,6%

4.1.5 Repetibilidad

En la siguiente tabla 19 se muestran solo los parámetros estadísticos ya que los datos fueron presentados anteriormente.

Resultados y discusión

Tabla 22: Resultados de Repetibilidad para aflatoxinas por HPLC

Parámetro	Aflatoxina G2 µg/kg	Aflatoxina G1 µg/kg	Aflatoxina B2 µg/kg	Aflatoxina B1 µg/kg	Aflatoxinas Totales µg/kg
Promedio	0,638	2,172	0,409	1,905	5,123
Desvío (SD)	0,071	0,117	0,039	0,057	0,197
CV %	11,1%	5,4%	9,6%	3,0%	3,8%

4.1.6 Reproducibilidad (precisión Intermedia)

Los resultados se muestran en la tabla siguiente:

Tabla 23: Resultados precisión intermedia

Muestra	Analista	Día	Aflatoxinas (µg/kg)				Totales
			G2	G1	B2	B1	
R01	1	16/04	0,232	1,828	0,408	3,308	5,776
R02	1	16/04	0,227	1,774	0,358	3,377	5,736
R03	1	24/04	0,326	2,006	0,439	3,624	6,395
R04	1	24/04	0,420	1,929	0,468	3,570	6,387
R05	2	16/04	0,247	2,077	0,399	3,591	6,314
R06	2	16/04	0,287	1,878	0,372	3,563	6,100
R07	2	24/04	0,428	1,715	0,333	3,040	5,515
R08	2	24/04	0,467	1,981	0,412	3,329	6,189
R09	3	16/04	0,320	1,746	0,355	3,336	5,757
R10	3	16/04	0,392	1,644	0,344	3,059	5,440
R11	3	24/04	0,365	1,971	0,405	3,180	5,922
R12	3	24/04	0,448	1,923	0,389	3,144	5,903
R13	4	16/04	0,250	1,884	0,424	3,584	6,142
R14	4	16/04	0,295	1,855	0,390	3,480	6,020
R15	4	24/04	0,430	1,906	0,449	3,235	6,020
R16	4	24/04	0,406	1,933	0,500	3,240	6,079
Promedio:			0,346	1,878	0,403	3,354	5,981
Desvío:			0,083	0,114	0,046	0,196	0,285
CV%:			24,0%	6,1%	11,4%	5,9%	4,8%

Resultados y discusión

4.1.7 Evaluación de la incertidumbre

En los gráficos siguientes se representan las fuentes de incertidumbre del método.

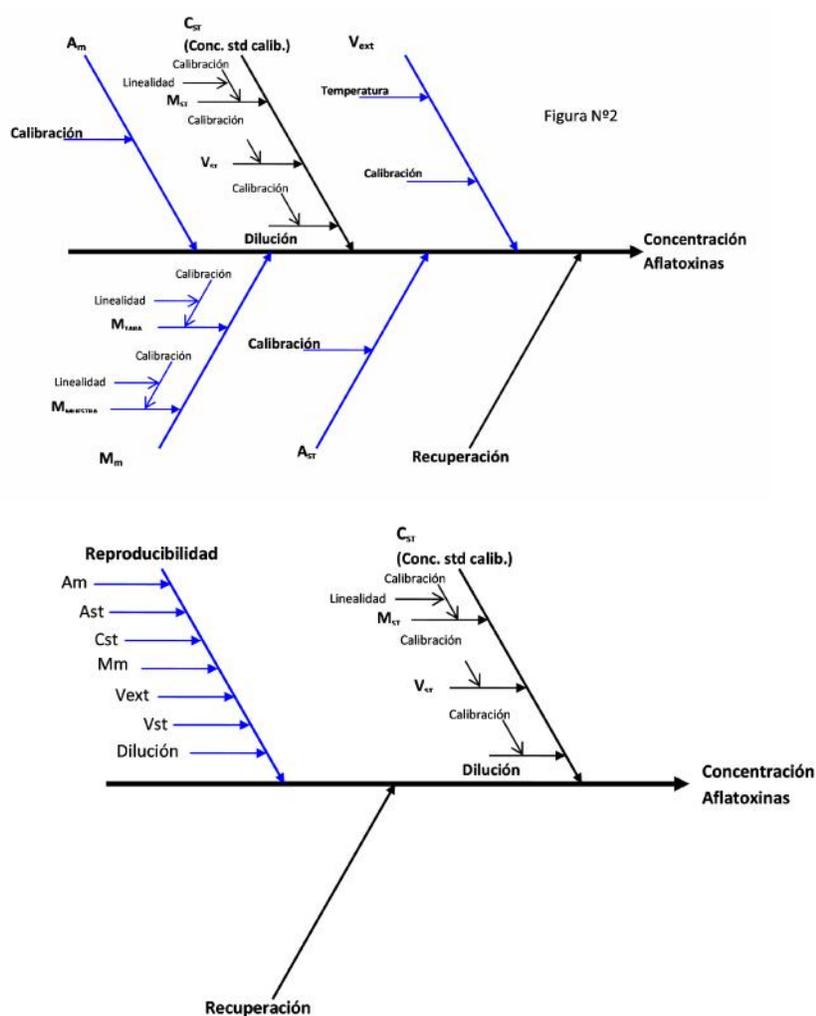


Ilustración 33: Fuentes de incertidumbre

Resultados y discusión

4.1.8 Estudio de la precisión

Para el estudio de la incertidumbre de la precisión se utilizaron los datos de precisión intermedia presentados en el punto “Reproducibilidad (Precisión Intermedia)” en la tabla 23 se representan los resultados obtenidos.

Tabla 24: Valores de ru_precisión

Aflatoxina	Promedio	Desvío SD	CV%	ru_precisión
AFG2	0,35	0,08	24,0%	0,24
AFG1	1,88	0,11	6,1%	0,06
AFB2	0,40	0,05	11,4%	0,11
AFB1	3,35	0,20	5,9%	0,06
TOTALES	5,98	0,28	4,8%	0,28

El valor de ru_precisión de aflatoxinas totales está calculado como la suma cuadrática de las incertidumbres de cada aflatoxina.

4.1.9 Estudio de la exactitud (recuperaciones)

Se muestran como factores de recuperación en la tabla 25.

Tabla 25: Factores de recuperación para aflatoxinas AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 y totales.

	Aflatoxinas				Nivel (µg/Kg)
	F_{G2}	F_{G1}	F_{B2}	F_{B1}	
0,89	0,96	0,63	0,79	0,85	6,27
0,86	0,94	0,64	0,76	0,83	6,27
0,82	0,94	0,57	0,77	0,82	6,27
0,96	0,89	0,62	0,73	0,81	6,27
0,68	0,83	0,57	0,76	0,75	6,27
0,75	0,96	0,73	0,79	0,84	6,27
0,87	0,90	0,57	0,79	0,82	6,27
0,95	0,96	0,78	0,84	0,89	12,18
0,93	0,94	0,75	0,83	0,88	12,18
0,85	0,94	0,72	0,79	0,85	12,18

Resultados y discusión

En la tabla 26 se presentan los resultados de recuperación hallados para cada toxina.

Tabla 26: Valores de recuperación para cada toxina

Aflatoxinas	Parámetros			
	Promedio	SD	CV%	ru_recup.
FG2	0,857	0,088	10,3%	0,10
FG1	0,926	0,043	4,7%	0,05
FB2	0,657	0,080	12,2%	0,12
FB1	0,786	0,033	4,2%	0,04
FTOTALES	0,834	0,038	4,6%	0,17

El valor de ru_recup. de aflatoxinas totales está calculado como la suma cuadrática de las incertidumbres de cada aflatoxina.

4.1.10 Estudio de la incertidumbre de la concentración de los estándares para la calibración

En la tabla 27 se representan los resultados de la incertidumbre para cada estándar empleado en la calibración.

Tabla 27: Valores de ru_conc.std para cada toxina

Aflatoxina	Concentración	<i>u</i>	ru_conc.std
AFG2	0,34	0,006	0,02
AFG1	1,05	0,009	0,01
AFB2	0,29	0,005	0,02
AFB1	1,10	0,013	0,01
Totales	2,79	0,018	0,03

El valor de ru_conc.std. de aflatoxinas totales está calculado como la suma cuadrática de las incertidumbres de cada aflatoxina.

Resultados y discusión

Incertidumbre de la medición de volumen de estándar concentrado (jeringa Hamilton – 50µl)

Tabla 28: valor de ru_vol.std.conc

Certificado de calibración Sartorius N°CV1403046 (14/03/2014) Jeringa C-263		
Incertidumbre expandida "U" (± [mm³]) K=2	Incertidumbre "u"	ru_Vol.std.conc.
0,24	0,12	0,0024

Incertidumbre de la dilución (matraz 25ml).

Tabla 29: Valor de ru_dilución.std

Extraída del certificado de lote del matraz Brand (C-9)	
Desvío estándar	ru_dilución.std
0,0045	0,00018

Con estos datos calculamos **ru_con.std.calib** para cada aflatoxina:

Tabla 30: Datos ru_conc.std.calib

Aflatoxina	ru_conc.std	ru_Vol.std.conc.	ru_dilución.std	ru_con.std.calib.
AFG2	0,02	0,0024	0,00018	0,02
AFG1	0,01	0,0024	0,00018	0,01
AFB2	0,02	0,0024	0,00018	0,02
AFB1	0,01	0,0024	0,00018	0,01
Totales	0,03	0,0024	0,00018	0,03

Resultados y discusión

4.1.11 Cálculo de la incertidumbre expandida

Utilizando las ecuaciones 4 y 5 obtenemos la siguiente tabla 30 donde se representa la incertidumbre combinada y expandida.

Tabla 31: Incertidumbre combinada relativa e incertidumbre expandida relativa de AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 y aflatoxinas totales.

Aflatoxina	ru_precisión	ru_recup	ru_conc.std.calib.	ru_Combinada	rU_Expandida
AFG2	0,24	0,10	0,02	0,26	0,52
AFG1	0,06	0,05	0,01	0,08	0,16
AFB2	0,11	0,12	0,02	0,16	0,32
AFB1	0,06	0,04	0,01	0,07	0,14
Totales	0,28	0,17	0,03	0,33	0,66

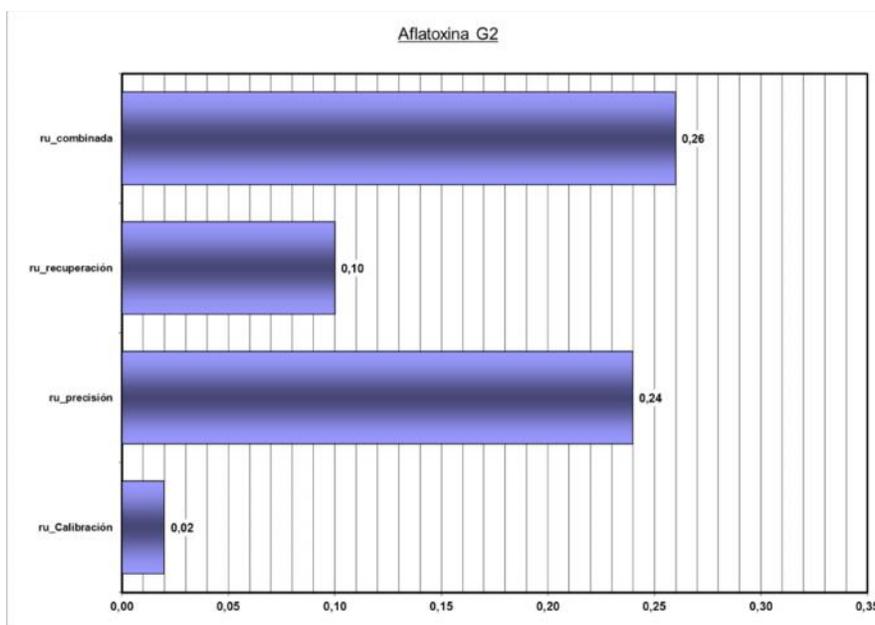


Gráfico 34: Comparaciones gráficas de las incertidumbres relativas para AFG2

Resultados y discusión

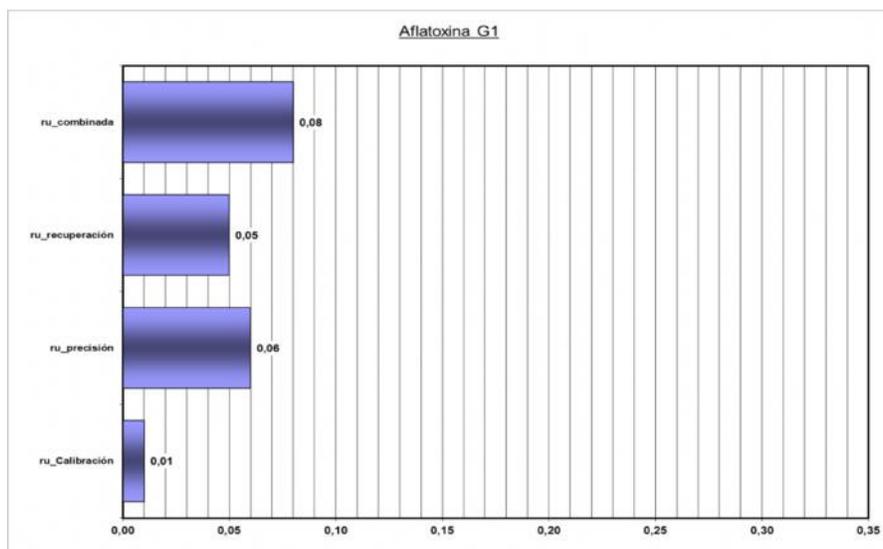


Gráfico 35: Comparaciones gráficas de las incertidumbres relativas para AFG1

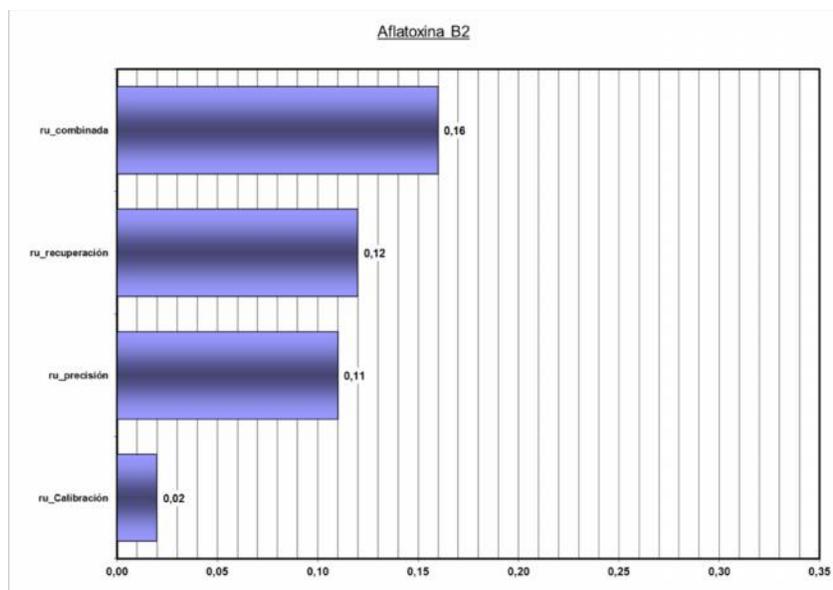


Gráfico 36: Comparaciones gráficas de las incertidumbres relativas para AFB2

Resultados y discusión

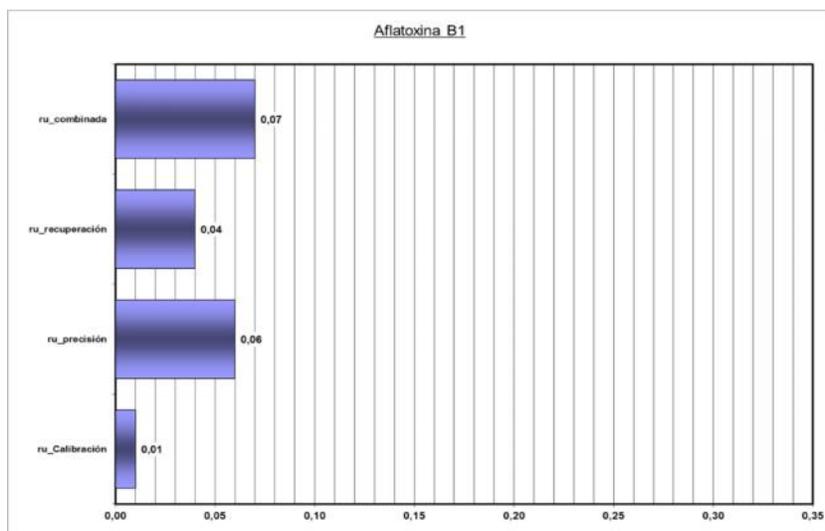


Gráfico 37: Comparaciones gráficas de las incertidumbres relativas para AFG2

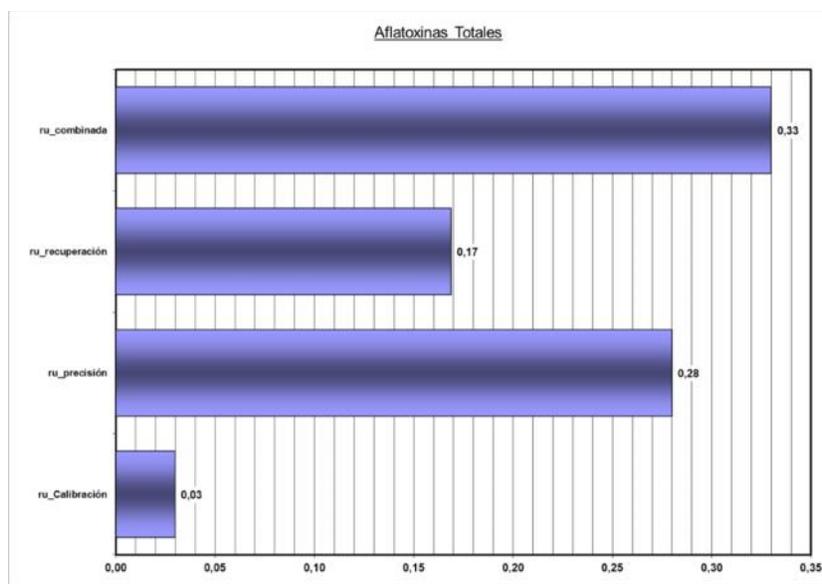


Gráfico 38: Comparaciones gráficas de las incertidumbres relativas para AFG2

Resultados y discusión

4.1.12 Resultados finales

En la tabla 31 se presenta un resumen de los datos obtenidos de la validación del método HPLC:

Tabla 32: Resumen de resultados de la validación del método analítico

	AFG2	AFG1	AFB2	AFB1	AFTotal
Límite Detección ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	0,22	0,37	0,12	0,18	-----
Límite Cuantificación ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	0,67	1,10	0,37	0,54	-----
Recuperación (%)	85,7	92,6	65,7	78,6	83,4
Repetibilidad (CV%)	11,1	5,4	9,6	3,0	3,8
Reproducibilidad (CV%)	24,0	6,1	11,4	5,9	4,8
Incertidumbre expandida	52	16	32	14	66

En las curvas de calibración se puede observar también buena linealidad en los rangos de concentraciones estudiadas.

Del análisis visual de los gráficos de los residuales en función de la concentración (cantidad de toxina inyectada) se puede observar que los mismos representan un muestreo aleatorio alrededor de cero. Los gráficos de probabilidad Normal evidencian que los errores tienen una distribución aproximadamente normal. No se evidencian residuales con valores estandarizados muy elevados.

Resultados y discusión

Por este motivo, el método validado es apto para determinar aflatoxinas en maní dado que cumple con criterios de funcionamiento de un método para el análisis de aflatoxinas.

4.2 Análisis de maní en caja

De acuerdo a los objetivos se realizó el muestreo y análisis de tres ciclos agrícolas 2010/2011; 2011/2012; 2012/2013 consecutivos de maní tipo runner variedad alto oleico sembrados en la región centro-sur de la provincia de Córdoba.

Se evaluaron las condiciones climáticas, según resultados de las estaciones meteorológicas de la Bolsa de Cereales de Córdoba, a lo largo de la evolución del cultivo y la posible incidencia sobre la ocurrencia de aflatoxinas. En cada campaña se analizaron más de 35.000 toneladas de maní, lo que representa el 4% del total sembrado en la provincia.

Esto significó muestrear más de 1.500 camiones de maní en caja por año (2010/2011 1.583 camiones; 2011/2012 2.573 camiones; ciclo 2012/2013 1.695) durante los meses de Abril, Mayo y Junio de cada año.

En cada una de las muestras obtenidas se determinó el porcentaje de ácido oleico lo que permitió confirmar la variedad.

Resultados y discusión

Se analizaron los valores humedad de los granos al momento de la recepción, como así también el porcentaje de granos sueltos, y granos con daños y defectos.

Se determinó en las muestras representativas la concentración de aflatoxinas y los camiones con valores mayores al límite de cuantificación fueron segregados para su procesamiento en forma separada .

4.3 Zonas geográficas de producción consideradas

Las zonas productoras de maní en Córdoba se localizan entre, entre latitud 33° y 35° (figura 4) y se dividieron en ocho zonas según los departamentos geopolíticos para un mejor análisis.

Estos se detallan a continuación y se representan en la figura siguiente:

- a) Tercero Arriba
- b) General San Martín
- c) Unión
- d) Marcos Juárez
- e) Río Cuarto

Resultados y discusión

- f) Juárez Celman
- g) Presidente Roque Sanz Peña
- h) General Roca

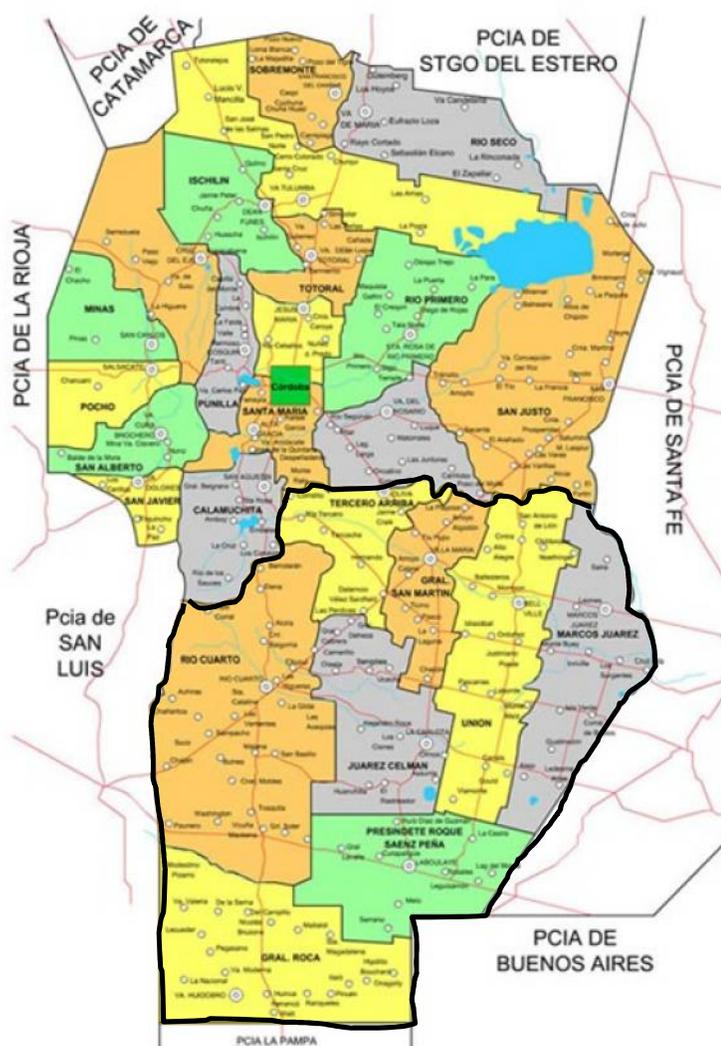


Figura 39: Departamentos de la provincia de Córdoba

4.3.1 Ciclo 2010/2011

La siembra de maní comienza en el mes de septiembre y finaliza en diciembre en función de la temperatura y humedad del suelo, estando principalmente distribuidas entre octubre y noviembre por la ocurrencia de las lluvias.

En este ciclo se sembraron 282.600 hectáreas y se logró un rendimiento de 34 qq/ha siendo este el mayor de los tres ciclos considerados.

En la región norte, incluyendo Tercero Arriba, General San Martín, Unión y Marcos Juárez las lluvias durante el período de siembra, germinación, implantación y crecimiento vegetativo estuvieron comprendidos entre 50mm y 100mm mensuales, siendo la zona de Marcos de Juárez la que presentó mayores registros en septiembre y diciembre.

En Presidente Roque Sanz Peña, la situación fue diferente, altos registros en octubre con más de 191mm promedios y bajos en noviembre y diciembre.

Resultados y discusión

Esto postergó la siembra en esta zona hasta el mes de octubre, sin embargo en los meses posteriores, durante la implantación del cultivo los registros pluviométricos reflejaron menos de 50mm mensuales.

El comportamiento en General Roca, durante la siembra en septiembre y octubre marcó registros de 90mm a 112mm mensuales, sin embargo en los 60 días posteriores estuvo comprendido entre 50mm y 60mm.

En el mes de enero el suelo recuperó humedad con precipitaciones superiores a los 100mm en todos los departamentos a excepción de General Roca y Roque Sáenz Peña en el sur de la provincia en donde la situación del cultivo se tornó comprometida durante la etapa de floración, clavado y formación de vainas. En los meses de febrero y marzo la situación se recuperó con promedios pluviométricos mayores a 90mm en el mes de febrero y a 70 mm en marzo.

En los demás departamentos la situación estuvo menos comprometida durante los meses siguientes, si bien en Marcos Juárez y Río Cuarto se registraron los menores registros.

Resultados y discusión

Las lluvias totales estuvieron comprendidas entre 641mm y 781mm para todos los departamentos, en los meses de noviembre, diciembre y enero, en los departamentos de Saenz Peña y General Roca, se registraron los niveles pluviométricos más bajos comprometiendo al cultivo.

Se observaron variaciones zonales en los aportes de lluvias durante todo el ciclo.

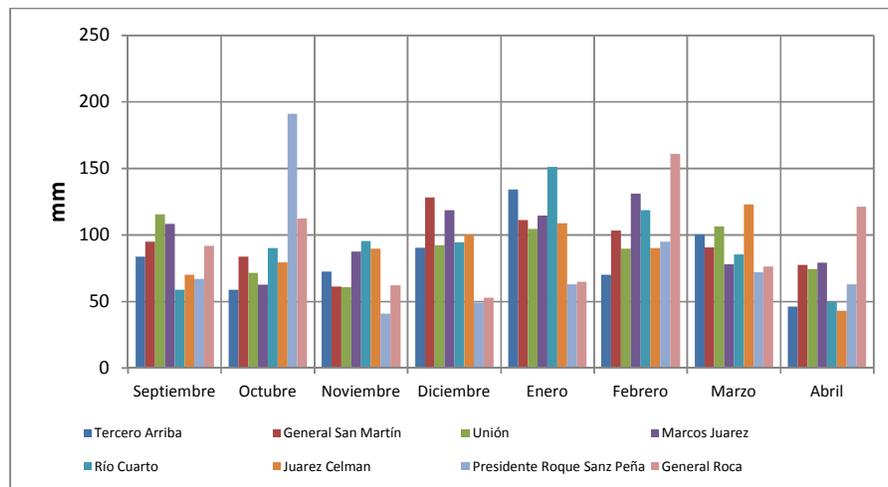


Gráfico 40: Registro pluviométricos promedios por mes y departamento Ciclo 2010/2011

4.3.2 Ciclo 2011/2012

Se sembraron 336.000 hectáreas en la provincia, con un rendimiento de maní en caja de 27 qq/ha.

Resultados y discusión

Este ciclo estuvo marcado principalmente por la falta de precipitaciones en el mes de septiembre lo que provocó una demora en la siembra.

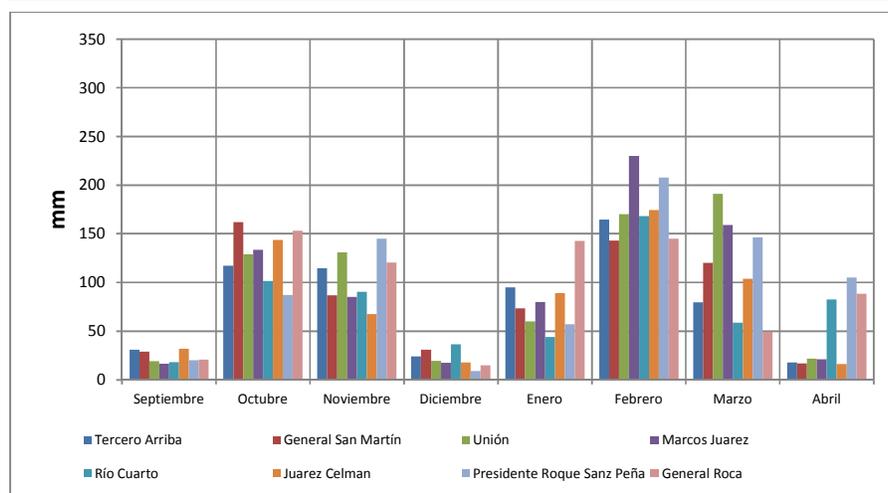
Posteriormente, en octubre y noviembre, en todos los departamentos el promedio mensual de lluvia caída estuvo por sobre los 70mm. Sin embargo, en el mes de diciembre durante la etapa de implantación y crecimiento del cultivo, las lluvias fueron escasas, con registros promedio por debajo de los 50mm mensuales.

Esto agravó la situación del cultivo dada la pérdida de humedad del suelo y las altas temperaturas reinantes.

Posteriormente el cultivo comenzó a recuperarse lentamente en enero y más marcado en febrero y marzo, dando lugar a una segunda floración que permitió incrementar los rendimientos.

Los departamentos de Sáenz Peña y General Roca fueron los más afectados por la falta de agua y evidenciaron signos de estrés hídrico.

Resultados y discusión



**Gráfico 41: Registro pluviométricos promedios por mes y departamento
Ciclo 2010/2011**

4.3.3 Ciclo 2012/2013

En este ciclo se sembraron en la provincia un total de 351.800 hectáreas y se obtuvo un rendimiento promedio de 27 qq/ha.

El período crítico del cultivo, relacionado con su estado fenológico abarca desde la formación hasta el llenado de los granos (etapas fenológicas R2 a R4) desde el mes de febrero hasta fin el mes de marzo.

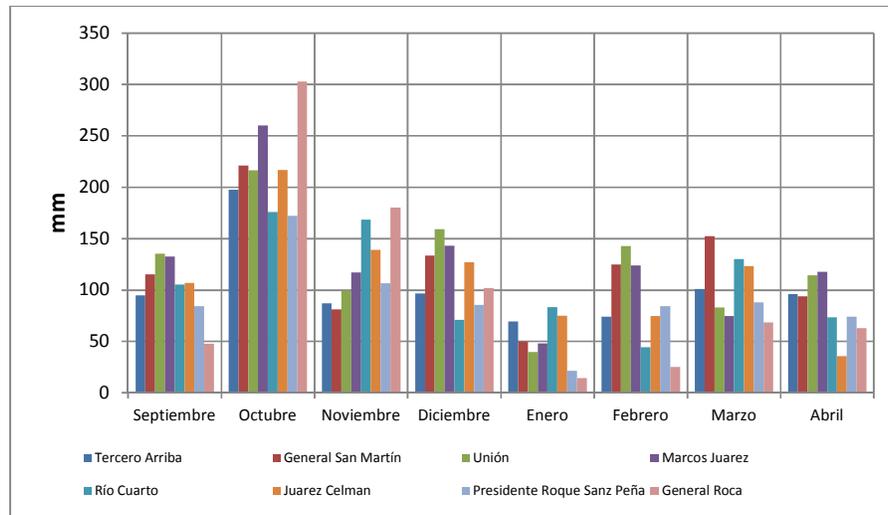
La falta de lluvias en momentos claves del ciclo del maní determinó problemas de falta de llenado del grano.

Resultados y discusión

Los cultivos fenológicamente atrasados por las escasas lluvias de enero, con pérdida de flores se recuperaron hacia mediados de febrero, en una segunda floración. En cuanto a presencia de plagas y enfermedades han estado presentes durante enero y febrero la viruela y la arañuela debido a condiciones de sequía.

Las abundantes lluvias registradas en los meses de febrero a abril favorecieron una alta incidencia de enfermedades edáficas (hongos patógenos). Han reportado presencia de *Sclerotinia*, *Fusarium* y *Thecaphora frezii* (carbón del maní) como principales agentes causales. Las zonas mayoritariamente afectadas corresponden a Tercero Arriba, norte de Juárez Celman, Río Cuarto, centro-sur de Gral. San Martín, norte de Gral. Roca y sur-sureste de Pte. Roque S. Peña; siendo toda esta área la que mayores milimetrajes recibió durante la campaña.

Resultados y discusión



**Gráfico 42: Registro pluviométricos promedios por mes y departamento
Ciclo 2010/2011**

Las condiciones climáticas de inestabilidad, ocurrencias de lluvias y la alta humedad ambiental reinante durante el mes de abril y mayo, no favorecieron al normal secado de las cajas, se profundizó la demora en días entre el arrancado y la cosecha, posibilitando pérdidas en el rendimiento y deterioro en la calidad del maní.

La pérdida de producción por el retraso de las tareas de recolección fue significativa, y se manifestaron complicaciones como desprendimientos de cajas, granos brotados, hongos en los granos y presencia de aflatoxinas en los mismos.

Resultados y discusión

El maní recién arrancado, tiene humedades comprendidas entre el 35% y el 45% dependiendo de la condición hídrica del suelo y debe permanecer en la andana, invertido hasta que la humedad disminuya a valores entre al 14-16%, recién luego se puede proceder con el descapotado para el cual, en la actualidad se emplean máquinas con múltiples cilindros.

La calidad del maní es afectada por las condiciones ambientales durante la permanencia en la hilera antes de ser recolectado. Por ejemplo, elevada humedad o lluvias frecuentes incrementan el tiempo de secado favoreciendo el deterioro y posible contaminación con aflatoxinas (Sanders et al, 1984).

Esto ocurrió en el ciclo 2012/2013, donde en el mes de enero las plantas sufrieron el estrés hídrico y posteriormente durante la recolección reinaron las lluvias.

La humedad durante el ingreso está relacionada directamente con las condiciones climáticas que prevalecieron con posterioridad al arrancado y es un indicativo de los posibles riesgos que se deben afrontar.

En los siguientes histogramas se puede observar cual es el porcentaje de maní en caja recibido con valores superiores al 10% en cada ciclo.

Resultados y discusión

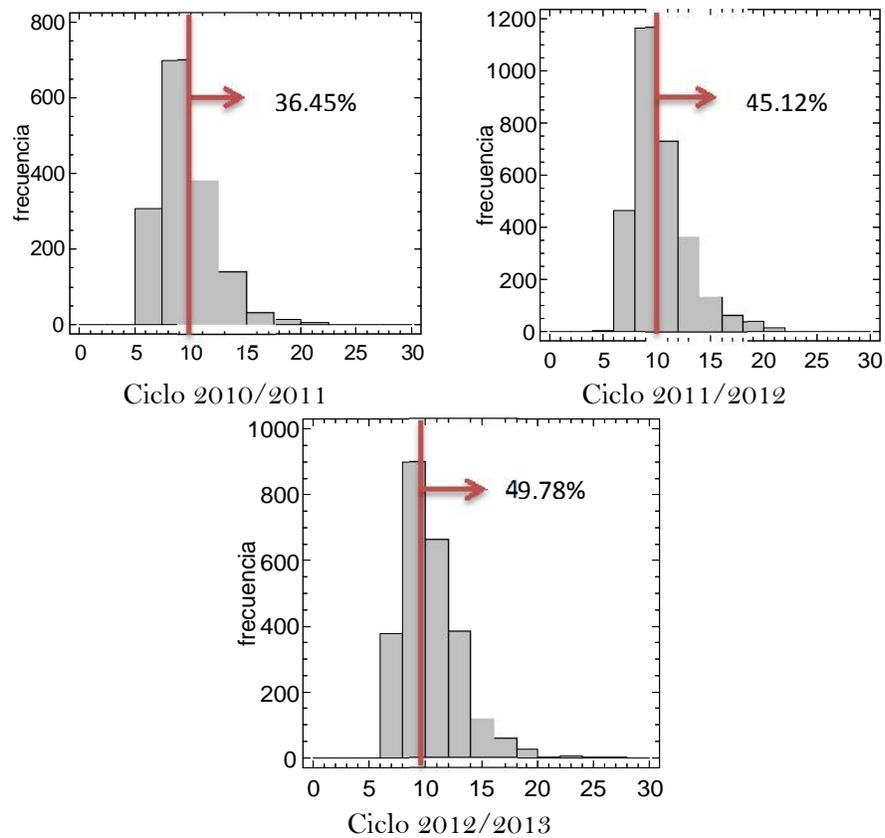


Figura 43: Histogramas del contenido de humedad de las muestras de maní analizadas en cada ciclo

Según estos datos se puede observar que el mayor contenido de humedad durante la recepción aconteció en el año 2012 principalmente por las lluvias tardías ocurridas durante la recolección.

De acuerdo a los resultados obtenidos la incidencia de aflatoxinas en el año 2012 fue del 2,5% del total con 1.600 toneladas afectadas, la mayor de los tres ciclos considerados.

Resultados y discusión

Tabla 33: Niveles porcentuales de aflatoxinas detectados durante el muestreo y análisis de recepción de maní en caja

2010/2011	Total con aflatoxinas	85	Toneladas
	Total muestreado	54.592	Toneladas
	%	0,20%	% del total
	Cantidad de muestras	2.481	-
2011/2012	Total con aflatoxinas	368	Toneladas
	Total muestreado	35.859	Toneladas
	%	1,00%	% del total
	Cantidad de muestras	1.630	-
2012/2013	Total con aflatoxinas	1.660	Toneladas
	Total muestreado	66.443	Toneladas
	%	2,50%	% del total
	Cantidad de muestras	2.953	-

Podemos inferir entonces, que el estrés hídrico, en etapas claves del desarrollo y la elevada humedad durante el proceso de secado en las hileras, con lluvias alternadas, que contribuyeron al desarrollo de hongos, también han afectado la calidad del maní incidiendo sobre el contenido de aflatoxinas.

Esto a pesar que el total de agua registrada en la campaña 2012/2013 fue de 884mm, frente a 693mm en 2011/2012 y 717mm en 2010/2011, por lo cual, la distribución uniforme del agua durante todo el cultivo se convierte en un factor importante.

Resultados y discusión

El ciclo 2011/2012 también manifestó un período de estrés hídrico, pero en el mes de diciembre, y el agua caída recuperó las plantas en los meses claves de llenado de granos por lo cual no incidió el contenido de aflatoxinas.

4.4 Acondicionamiento y almacenamiento de maní en caja

Una vez que el maní fue recolectado, fue enviado a la Plantas procesadoras para su acondicionamiento y acopio.

El acondicionamiento consistió en la eliminación de las impurezas (tierra, tallos, hojas, piedras) entre otros contaminantes y la disminución de la humedad por secado estacionario.

Para preservar el sabor natural del maní, la temperatura de grano no sobrepasó los 30° C y la velocidad de extracción de humedad del maní fue 0,25%/h. La humedad del aire durante el secado fue inferior al 40%HR.

El secado se detuvo cuando la humedad de los granos de maní alcanzó el 10%, y luego de 24 horas los granos evidenciaron humedades con valores próximos al 9% antes del almacenamiento.

Resultados y discusión

El almacenamiento de los granos con humedades elevadas, mayores al 11% afecta la calidad de los mismos y favorece el desarrollo de hongos (Pedellini, 1996)

Los factores más importantes para el crecimiento de *A. flavus* y la producción de aflatoxina son la humedad del sustrato, la humedad relativa del aire y la temperatura (Diener et al, 1987).

En el maní, *Aspergillus spp* puede crecer cuando la semilla tiene entre 11 y 35% de humedad pero la producción de aflatoxinas se realiza con valores entre 14 y 24% (Diener et al., 1987)

Cuando la temperatura del aire es de 30°C y la HR alcanza 86,3% se crean condiciones óptimas de crecimiento de *A. flavus* y producción de aflatoxinas (Elamin et al., 1988)

Toda el maní en caja en el cual se detectó aflatoxinas fue almacenado en forma separada del resto el cual fue segregado según su contenido de granos con daños y defectos.

Durante el acopio y almacenamiento del maní en caja se monitorearon las condiciones de temperatura y humedad relativa ambiente.

Resultados y discusión

No se observó un incremento en la ocurrencia de aflatoxinas durante el almacenamiento en los lotes que carecían del mismo, sin embargo se observó un ligero incremento en los niveles en lotes que sí contenían aflatoxinas durante los tres ciclos, si bien el tiempo de almacenamiento no superó los 6 meses en ninguno de los tres períodos.

Esto puede deberse fundamentalmente a que el nivel de daños y defectos se incrementa durante el almacenamiento, siendo los daños por insectos, el nivel de granos helados y descompuestos los que lideran este aumento.

Durante la infestación, los insectos producen focos de calor y humedad, que permiten el desarrollo de hongos saprófitos, y en determinadas condiciones pueden producir aflatoxinas. Los granos helados, aquellos afectados por las bajas temperaturas en el campo durante su permanencia en las hileras no se incrementan, si no que con el paso del tiempo se detectan más fácilmente dado que cambia la apariencia de los mismos. Esto ocasionó que durante el análisis de daños en los granos pasaran ignorados dada su reciente ocurrencia.

Finalmente los granos dañados por el frío o helados, ver el gráfico siguiente, terminan en granos en descomposición debido a los

Resultados y discusión

procesos de fermentación que sufren internamente, al cambiar el metabolismo.

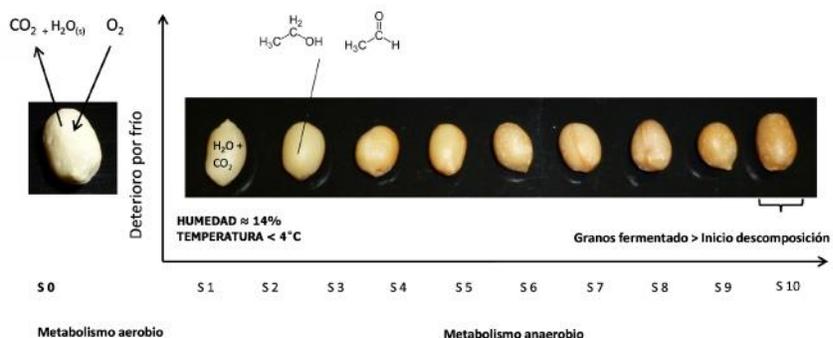


Ilustración 44: Evolución de la apariencia de los granos de maní con daños por frío y heladas – Fuente propia

Los granos ardidos, descompuestos y con hongo, son el principal factor de riesgo en la generación de aflatoxinas en maní, si bien durante el almacenamiento, las condiciones de humedad disminuyeron con el tiempo minimizando el riesgo.

Tabla 34: Granos dañados en muestras de maní en caja durante la recepción en lotes de maní con aflatoxinas

Daños / Campaña	2010/2011	2011/2012	2012/2013
Granos helados, %	0,51±0,11	0,04±0,01	0,28±0,12
Hongo, %	0,12±0,03	0,20±0,12	0,69±0,02
Ardidos y descompuestos, %	0,17±0,05	0,24±0,13	0,30±0,08
Granos dañados por insectos, %	0,06±0,02	0,17±0,09	0,07±0,02
Granos manchados, %	0,41±0,17	0,59±0,21	0,87±0,21
Total de granos dañados, %	1,27±0,45	1,24±0,44	2,23±0,77

Resultados y discusión

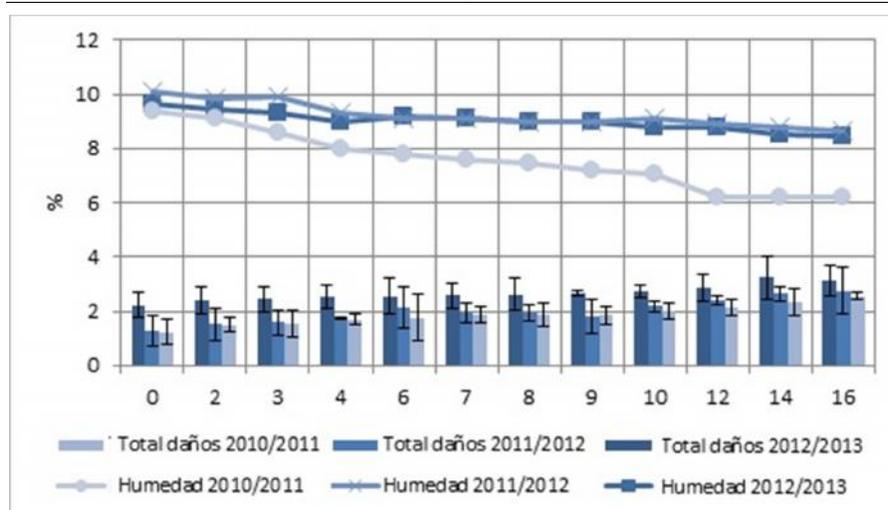


Gráfico 45: Curvas de evolución de humedad y total de granos dañados y defectuosos durante el almacenamiento (en semanas)

4.5 Microbiología

Durante las tres campañas se analizaron microbiológicamente las 35 muestras de lotes de maní que contenían aflatoxinas.

En todas estas muestras el nivel de hongos y levaduras analizados según ISO 7954:1987 estuvo comprendido entre 10 CFU/g y $1,8 \times 10^3$ CFU/g.

Además se determinó la carga fúngica en tres muestras representativas con diferentes niveles de aflatoxinas.

Resultados y discusión

Estas muestras evidenciaron presencia de *Penicillium spp.*, *Aspergillus spp.*, *Rhizopus spp.* y con menor incidencia *Fusarium*.

Prácticamente el nivel de carbón de maní es muy bajo en todas las muestras.

Tabla 35: Carga microbiana de granos de maní contaminado con aflatoxinas

	Muestra A	Muestra B	Muestra C
	% (semillas afectadas / 100 semillas)		
<i>Rhizopus spp.</i>	16	18	19
<i>Bacterias</i>	34	15	20
<i>Penicillium spp.</i>	90	67	88
<i>Aspergillus spp.</i>	73	44	71
<i>Fusarium semitectum</i>	ND	2	ND
<i>Fusarium solani</i>	ND	ND	1
<i>Fusarium oxysporum</i>	ND	ND	1

Además se determinó el nivel de hongos y levaduras empleando la misma metodología en lotes que carecían de aflatoxinas.

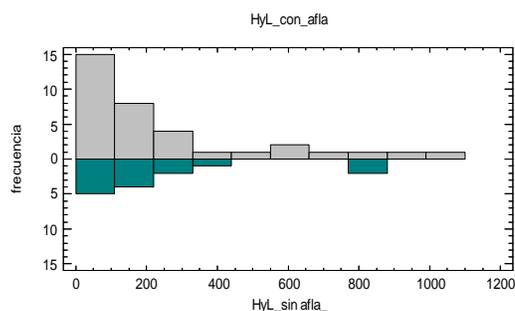


Gráfico 46: Histogramas comparativos del nivel de hongos y levaduras (CFU/g) en lotes con y sin aflatoxinas

Resultados y discusión

Realizando una ANOVA para determinar si, el contener o no aflatoxinas está relacionado directamente con la población de hongos y levaduras expresados como UFC/g , se halló que el valor-P de la razón-F es mayor 0,05 (valor-P = 0,9293), entonces no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de UFC/g entre lotes con y sin aflatoxinas, con un nivel del 95,0% de confianza.

De acuerdo test de hipótesis $H_0 = \mu_{\text{con afla}} = \mu_{\text{sin afla}}$ y $H_1 = \mu_{\text{con afla}} < \mu_{\text{sin afla}}$, suponiendo varianzas iguales, dado que el estadístico $t = -0,0892$ y valor-P= 0,9292 es mayor que 0,05 no se puede rechazar la hipótesis nula.

Esto significa que, aunque los lotes de maní contienen hongos como *Penicillium spp* , *Aspergillus spp.*, estos no significa que el maní tendrá presencia de micotoxinas.

4.6 Análisis del contenido de ácido oleico

En Argentina se emplean diferentes variedades de granos de maní, y se ha mencionado que el pericarpio y el tegumento son una barrera natural contra la invasión de hongos (Pettit et al, 1989).

Resultados y discusión

Además la composición química del tegumento pueden ser una barrera para el crecimiento de *Aspergillus spp* (Sanders y Mixon, 1978), es por ello que es importante determinar la incidencia de las aflatoxinas según la variedad de maní.

Los granos de maní poseen un elevado contenido de lípidos en sus granos, mayor al 45%, y estos tienen una alta proporción de ácidos grasos insaturados tales como el ácido oleico y el ácido linoleico. La estabilidad de los lípidos depende del grado de insaturación de sus aceites. A mayor concentración de ácidos grasos poliinsaturados aumenta notablemente la sensibilidad del aceite al deterioro oxidativo (Taub y Singh, 1997).

La variedad *granoleico* F-4, predominante en la provincia de Córdoba, es cruzamiento realizado en 1996 entre el Tegua y el I-JS-95-1 -Línea Alto Oleico y su posterior selección genealógica. Esta variedad ha predominado dado que presenta ventajas en la vida útil frente a los procesos oxidativos del aceite en el grano. Estos procesos oxidativos conllevan a un deterioro sobre la calidad del producto tanto a nivel químico, nutricional y sensorial. Las grasas oxidadas generan compuestos tóxicos y emiten olores y sabores desagradables

Resultados y discusión

denominados rancios, produciendo rechazo por parte de los consumidores (Frankel, 2014).

Como el contenido de aceite depende además de factores extrínsecos medioambientales, del tamaño y madurez de la semilla, para la determinación del contenido de ácido oleico se emplearon semillas seleccionadas de calibre 38/42 a la cual se le extrajo por prensado en frío el aceite.

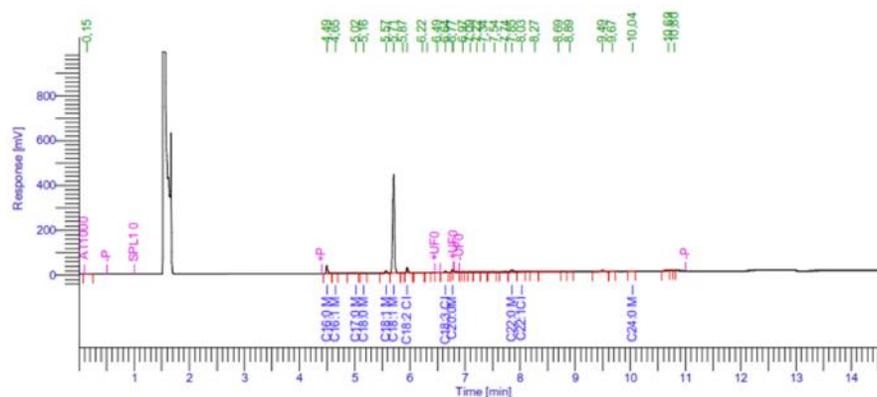


Figura 47: Cromatograma indicando el pico mayor de ácido oleico (C18:1 cis-9)

El maní variedad *granoleico* tiene entre un 75% a un 80% de ácido oleico (C18:1 cis-9) en su aceite, mientras que el “runner” común tiene entre 45% y 50% (Silva, 2010)

Resultados y discusión

Se puede observar que en todos los casos el porcentaje hallado durante el presente estudio fue superior al 75% de ácido oleico, con lo cual se puede confirmar que se ha evaluado la variedad *granoleico*.

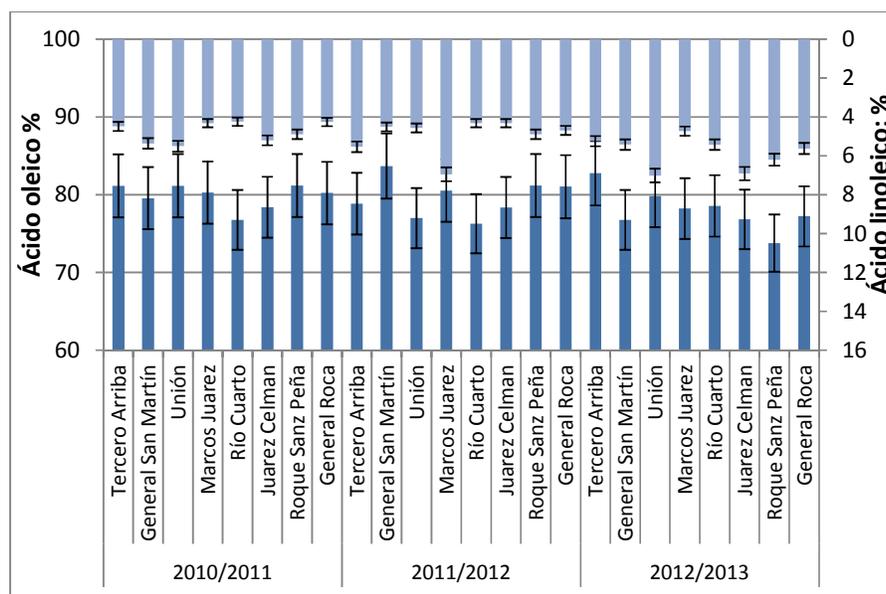


Gráfico 48: Determinación de ácido oleico en aceite de muestras de maní en caja

Realizando una ANOVA de los resultados de ácido oleico de las tres campañas, se obtuvo un valor- $P=0,0392$ menor que 0,05, por ende existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de ácido oleico entre una campaña y otra, con un nivel del 95,0% de confianza. No existen diferencias estadísticamente significativas entre

Resultados y discusión

aquellos niveles que compartan una misma columna letra. El método empleado para discriminar entre las medias es el LSD de Fisher.

Tabla 36: Niveles medio de ácido oleico hallados en las muestras de maní en caja de las diferentes campañas analizadas

Campaña	Media
2012/2013	77,481±2,71a
2011/2012	79,611±2,77b
2010/2011	79,832±2,81b

4.7 Tratamientos de destrucción de aflatoxinas

Se sabe que los tratamientos con peróxido de hidrógeno has sido efectivos para disminuir el nivel de aflatoxinas sin incidir significativamente sobre otras propiedades (Woodroof, 1983).

Además se ha demostrado que la selección electrónica, durante el proceso de blanqueado, a través de la remoción de los granos dañados, se ha convertido en un proceso físico capaz de disminuir significativamente la contaminación por aflatoxinas a expensas de ciertas mermas.

Una muestra de granos de maní conteniendo aflatoxinas fue tratada por inmersión durante un minuto a diversas concentraciones de H₂O₂ en agua destilada, 0,05%; 0,1% , 0,5% y 1,0% v/v y luego secada en una estufa de conversión forzada durante 30 minutos a 95°C. Esto se

Resultados y discusión

repitió en tres oportunidades para cada uno de los niveles, principalmente por la heterogeneidad de la muestra.

Posteriormente se analizó el contenido de aflatoxinas y los resultados se analizaron con una ANOVA. Puesto que el factor concentración de peróxidos arrojó un valor- $P=0,0169$ menor que $0,05$, este factor tiene un efecto estadísticamente significativo sobre $\mu\text{g} / \text{kg}$ con un $95,0\%$ de nivel de confianza.

Sin embargo, las repeticiones arrojaron un valor- $P=0,3785$, no teniendo un efectos significativo sobre el tratamiento.

También se empleó el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher y los resultados se señalan en el gráfico 21, donde se indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma letra.

Resultados y discusión

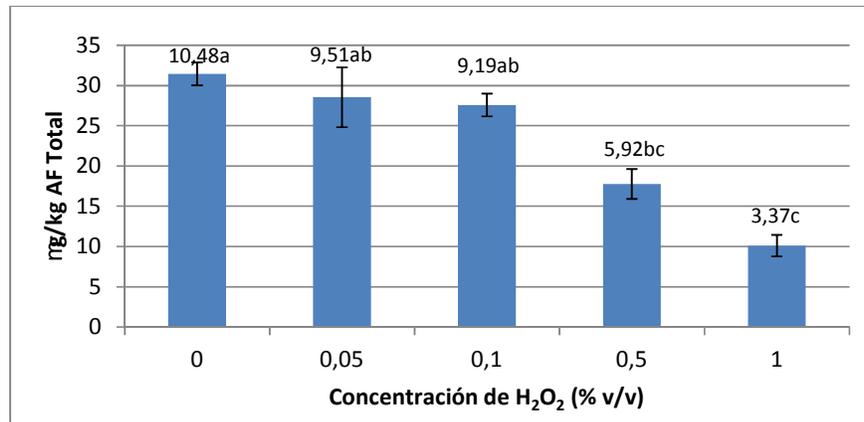


Gráfico 49: Niveles de concentración de H₂O₂ y su incidencia sobre la concentración de alfatoxina

Se puede apreciar que no hay diferencias significativas entre los tres tratamientos a concentraciones de 0,05% y 0,1%, y los de 0,5% y 1,0%, pero se manifiesta una disminución de la concentración con valores de 0,5% y 1,0% frente a las dos concentraciones más bajas.

4.8 Proceso de blanqueado en seco

4.8.1 Selección electrónica

De acuerdo a los estudios realizados, las selectoras electrónicas tienen una eficiencia determinada para cada tipo de daño, dependiendo, además del tipo de grano, la uniformidad de tamaño y del flujo másico de trabajo.

Resultados y discusión

Para los ensayos se empleó maní runner alto oleico de tamaño uniforme y calibre 38/42. Esto significa que en una onza (28,35 gramos) hay entre 38 y 42 granos de maní.

El tamaño uniforme del grano es importante dado que, durante la caída, entre la detección de los defectos por las cámaras y el accionamiento de los inyectores que expulsan los granos existe un tiempo de retardo que es función de la velocidad de caída en las bandejas.

En un lote de maní confitería, conteniendo 47,4 μg / kg totales (AFB1=10,7 μg / kg; AFB2=1,5 μg / kg; AFG1=5,7 μg / kg y AFG2=25,8 μg / kg), se analizó el porcentaje de granos dañados y defectuosos siendo los resultados obtenidos de 3,22 % \pm 0,72 en el ingreso.

El mismo fue procesado en la línea de blanqueado antes descripta, dividiendo el lote en 6 partes iguales. Cada porción del lote se pasó por la línea de proceso (horno, blanchers, selectora electrónica). En la selectora electrónica, una Sortex Buhler Z+ se emplearon tres flujo másicos a diferentes 2000 kg/h; 4000 kg/h y 5500 kg/h siendo los mismos flujo másicos operativos nominales de estos equipos.

Resultados y discusión

La eficiencia se calculó como la diferencia porcentual de daños inicial y final en una muestra representativa de 1000 gramos.

Las pruebas se realizaron por triplicado para cada flujo másico, por ese motivo el lote se dividió previamente en tres partes, y los daños se segregaron de acuerdo a las características descritas para cada defecto.

De la ANOVA realizada, se puede concluir que como dos factores tiene valores-P menores que 0,05, estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre eficiencia de la selección electrónica con un 95,0% de nivel de confianza, estos son el tipo de daños y el flujo másico de trabajo, sin embargo no hubo diferencias significativas entre las repeticiones (valor-P=0,7486)

Tabla 37: % rechazo de granos dañados a diferentes flujos másicos de operación

Flujo	% eficiencia (1° paso)
5500 KG/h	49,2048 ± 12,97a ¹
4000 KG/h	55,0571 ± 10,91b
2000 KG/h	65,4667 ± 12,56c

¹ Letras diferentes denotan diferencias significativas.

De acuerdo con la Pruebas de Múltiple Rangos (LSD) para la variable dependiente Eficiencia por el factor Flujo másico, existe una

Resultados y discusión

diferencia significativa con un 95% de confianza, entre los tres niveles, observándose que, el promedio de remoción total de daños es mayor cuando el flujo másico está en el mínimo valor.

Tabla 38: % medios de eficiencia de remoción de granos dañados en el primer paso

Característica	% eficiencia
Helados	37,57% ± 9,72a ¹
Insectos	45,29% ± 4,86b
Podridos	51,36% ± 7,08c
Sucios	61,17% ± 8,31d
Ardidos	62,31% ± 5,65d
Hongo	67,52% ± 7,95e
Manchados	70,82% ± 11,51e

¹ Letras diferentes denotan diferencias significativas con un 95% de confianza

Cada daño en particular, dependiendo del porcentaje de afectación en la superficie de la semilla es más o menos eficientemente removido siendo los granos dañados por insectos los más difíciles de expulsar y los granos manchados en la piel los de más fácil detección y remoción.

Resultados y discusión

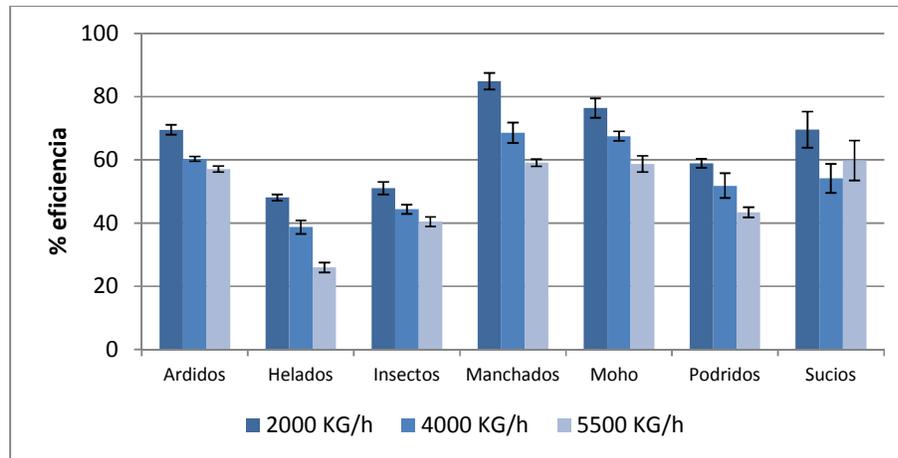


Gráfico 50: Eficiencia del proceso de remoción de daños en selectora electrónica Sortex Buhler Z+ en primer paso para maní blanqueado calibre 38/42

Se puede inferir de los resultados anteriores que existe una relación inversamente proporcional entre el flujo máxico y la eficacia de las selectoras electrónicas para remover un daño determinado.

En los ensayos realizados se obtuvieron flujos en los rechazos de 238 kg/h; 407 kg/h; y 582 kg/h en función de los flujos máxicos. Esto representa el 11,9%; 10,2% y 10,6% respectivamente de la masa total de granos en el ingreso.

Generalmente para un producto de calidad, el nivel de daños aceptables en maní blanqueado entero no debe ser mayor al 1,0%, aceptando el SENASA, como referencia para el maní confitería con piel el

Resultados y discusión

2,0% para el Grado 1, de mayor calidad. Sin embargo el SENASA no establece especificaciones para el maní blanqueado.

El porcentaje de granos dañados y defectuosos al egreso de la selectora electrónica arrojó un valor promedio para los tres flujo másicos y repeticiones un valor porcentual de $1,84 \pm 0,33$.

Debido a la eficiencia de la selección electrónica no se puede disminuir a valores marginales el nivel de granos dañados y defectuosos en un simple paso, motivo por el cual es necesario que los granos aceptados, vuelvan a pasar por un segundo canal en la selectora electrónica para disminuir aún más los granos no conformes en el producto final.

En este segundo paso, el porcentaje de daños hasta $0,74 \pm 0,13$, es decir por debajo del 1% de tolerancia aceptable pero incrementando el nivel de rechazos.

En el segundo paso, de acuerdo al análisis de ANOVA, los factores daños y flujo másico tiene valores-P menores que 0,05; entonces estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre la Eficiencia con un 95,0% de nivel de confianza. Sin embargo, las

Resultados y discusión

repeticiones arrojaron un valor-P de 0,7492 resultando en que las mismas no tienen un efecto significativo sobre la eficiencia con un 95,0% de nivel de confianza.

Nuevamente se observa que, el flujo másico incide en la eficiencia, y realizado una prueba de múltiples rangos para la eficiencia por el flujo másico, se puede observar que a flujo másico menor la eficiencia de remoción es mayor, siendo que hay diferencias significativas entre los tres flujos másicos.

Tabla 39: eficiencia de la selección electrónica a diferentes flujos en el segundo paso

Flujo	% eficiencia (2° paso)
5500 KG/h	51,64% ± 11,62a¹
4000 KG/h	58,00% ± 10,56b
2000 KG/h	68,22% ± 12,19c

¹ Letras diferentes denotan diferencias significativas con un 95% de confianza

En el segundo paso el comportamiento es semejante al obtenido en el primer paso, observándose valores ligeramente superiores para los mismos daños y defectos.

Resultados y discusión

Tabla 40: % medios de eficiencia de remoción de granos dañados en el segundo paso

Característica	% eficiencia 2º paso
Helados	40,02% ± 9,61a
Insectos	49,19% ± 4,94b
Podridos	58,82% ± 6,85c
Ardidos	61,01% ± 6,63cd
Sucios	63,01% ± 7,83d
Hongo	71,31% ± 8,15e
Manchados	71,63% ± 11,6e

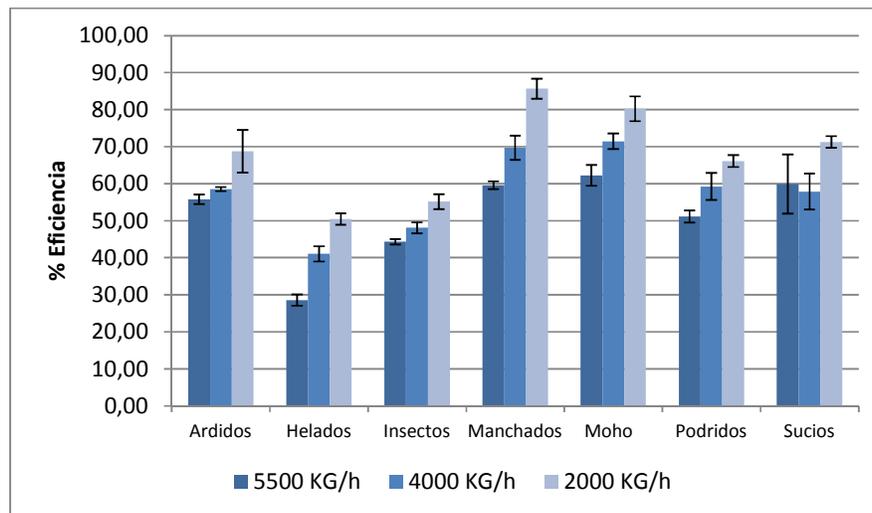


Gráfico 51: Eficiencia de remoción de daños en selectora electrónica Sortex Buhler Z+ en segundo paso para maní blanqueado calibre 38/42

Sin embargo, realizando una ANOVA con los factores primer y segundo paso sobre la eficiencia en la selección, se halla un valor-P de 0,2624, con lo cual el mismo no tiene un efecto significativo sobre la variable.

Resultados y discusión

No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan la misma letra. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Con este método hay un riesgo del 5,0% al decir que cada par de medias es significativamente diferente.

Tabla 41: Eficiencia de la selección electrónica en la remoción de granos dañados (1° y 2° paso)

Paso	Eficiencia
1°	56,58% ± 13,77a
2°	59,28% ± 13,23a

De acuerdo a los resultados obtenidos podemos concluir que la eficiencia de la selección electrónica depende del flujo másico, sin embargo como el comportamiento es similar independientemente del nivel de daños, puesto que en segundo paso la masa de granos de maní se encuentran menos contaminados, será necesario repetir el proceso hasta obtener resultados de calidad satisfactorios.

En los ensayos realizados, en el segundo paso se obtuvieron flujos en los rechazos de 142 kg/h; 183 kg/h; y 287 kg/h en función de los flujos másicos. Esto representa el 7,1%; 4,1% y 5,2% respectivamente de la masa total de granos en el ingreso.

Resultados y discusión

De este modo, pasando dos veces los granos de maní por la selección electrónica se obtiene entre un 14% y un 19% de mermas.

Estos resultados están en concordancia con los obtenidos por Whitaker (1997) donde para 5 cosechas consecutivas, la pérdida de peso fue de 16,8%.

Un tercer paso del producto lo dejará aún más limpio o libre de granos contaminados, sin embargo incrementará aún más las mermas, perdiendo valor comercial.

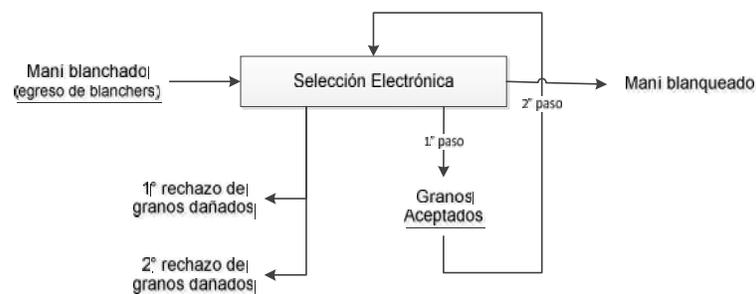


Figura 52: Esquema de selección electrónica de doble paso

Se pudo verificar que la selección electrónica remueve no solamente granos dañados, si no también aquellos granos que, a pesar de estar libre de daños o defectos, tienen adheridos restos de tegumento y que ante visión de las cámaras, poseen otro color.

Resultados y discusión



Granos con tegumento en el germen



Granos con restos de piel
($<25\%$ de la superficie)



Granos on restos de piel
($>25\%$ de la superficie)



Granos sin blanchar

Figura 53: Granos de maní con restos de tegumento al egreso de los blanchers – Fuente propia

El rechazo contiene entre un 15% y un 30% de granos dañados o defectuosos, siendo el porcentaje complementario granos que poseen restos de tegumento.

Como consecuencia resulta imprescindible disminuir el nivel de retención de piel o incrementar la eficiencia de los blanchers para lograr minimizar las mermas del proceso y favorecer el trabajo se la selección electrónica.

Resultados y discusión

Realizando el análisis de una muestra representativa al egreso de los blanchers se observó que hay una porción de granos que presentan restos de tegumento adherido y son rechazados en el proceso de selección electrónica junto con los daños y defectos, porque los restos de piel son reconocidos como manchas en la piel durante la selección electrónica.

Para minimizar las mermas en el proceso de blanqueado se requiere recuperar parte de estos granos, principalmente aquellos libres de aflatoxinas.

Para lograr esto, el proceso propuesto y evaluado, consistió en una doble etapa en la selectora electrónica para remover los daños y defectos, dado que son en estos granos en los que se concentran las aflatoxinas (Goldblatt, 1977; Whitaker, 1997; Robin, 1995).

Una vez separados los granos dañados del lote, disminuyó la concentración de afltoxinas, sin embargo las mermas físicas del proceso son elevadas.

Para resolver este problema, los granos rechazados fueron tratados con aspersión de una solución acuosa conteniendo 0,5% v/v de H₂O₂, procesados nuevamente en el horno y finalmente pasados por los blanchers para remover restos de tegumento.

Resultados y discusión

Al ingreso del horno, a un metro antes del ingreso a la zona de calentamiento, se colocó boquillas de aspersion de cono lleno marca FullJet y una bomba centrífuga con un tanque de 1 m³ conteniendo la solución de H₂O₂.

La velocidad de la cinta del horno fue de 0,48 m/min y el flujo de maní establecido en 2.000 kg/h.

El flujo másico de la bomba regulado por diferencia volumétrica para arrojar 2 kg/h de solución sobre el maní. El aumento de humedad de los granos estuvo comprendido entre 0,1% y 0,15%. La altura de la cama sobre la cinta fue de 0,12 m al egreso del distribuidor. La hidratación del tegumento permitió mejorar la facilidad de remoción del tegumento.

Resultados y discusión

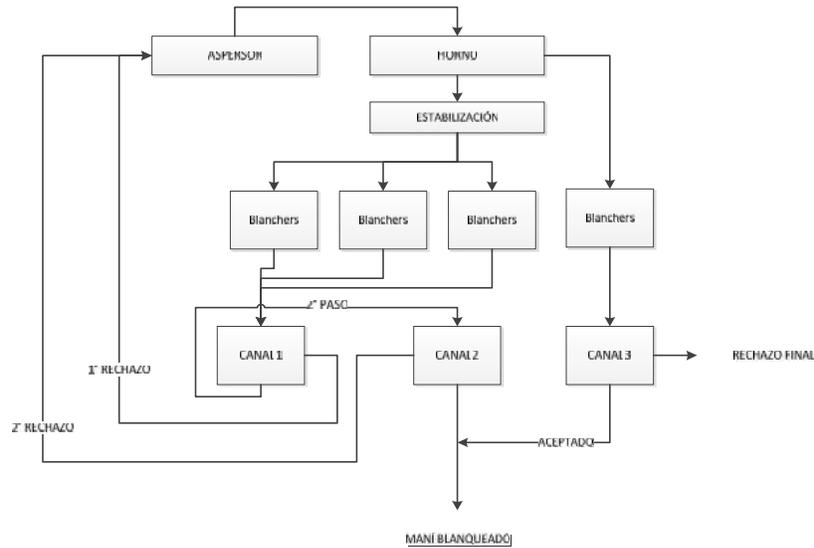


Figura 54: Diagrama del proceso completo de blanqueado en seco realizado

Es sabido que los tratamientos con peróxido de hidrógeno resultan efectivos en la destrucción o eliminación de las aflatoxinas, si bien las aflatoxinas están distribuidas dentro del grano, principalmente en el germen o radícula, y el tegumento pero llegan al interior del grano (Goldblatt, 1970).

La remoción del tegumento y la eliminación del germen, al partirse los granos, contribuyen a esta reducción.

Estos granos provenientes del rechazo de la selección electrónica, al egreso del horno, pasan nuevamente por la acción abrasiva de los blanchers que remueven el tegumento y luego por otro canal de la

Resultados y discusión

misma selectora electrónica, el cual remueve granos dañados y permite el paso de aquellos satisfactorios.

En productos altamente contaminados, la reducción lograda con H_2O_2 fue del 97% sin la generación residual de olores o sabores (Sreenivasamurthy et al, 1967) y en leche se han logrado reducir AFM1

El proceso de aspersión de la solución de H_2O_2 no incrementa significativamente los niveles de humedad del producto, y el agua se elimina rápidamente cuando el producto pasa a través de las cuatro zonas de calentamiento del horno.

El producto recuperado se mezcló con la línea principal, representando menos del 10% de este flujo. De este modo las mermas del proceso se redujeron significativamente a valores inferiores al 6% en peso de la masa total de granos.

4.9 Disminución del contenido de aflatoxinas

Conocer los niveles de aflatoxinas desde el análisis de la materia prima y segregación, permite planificar el proceso de producción de lotes contaminados para disminuir los niveles de contaminación y mitigar las mermas y costos de procesamiento.

Resultados y discusión

Durante las últimas tres campañas se han detectado 2.113 toneladas de maní en caja con aflatoxinas. Las mismas, luego del descascarado arrojaron 1.584 toneladas de granos de maní, de las cuales el 56% comprende calibres que por su tamaño pudieron ser blanqueados. Esto representó 887 toneladas, totalizando 36 lotes de maní confitería de 25 toneladas cada uno. Los mismos se encontraban en grado 1 respecto al total de daños y defectos y fueron muestreados en forma representativa siguiendo con las regulaciones de la UE detalladas anteriormente.

El proceso empleado constaba de la selección electrónica con dos pasos, con un flujo de 2.000 kg/h, dado que se ha demostrado se logra mayor eficiencia en donde los granos rechazados por la selección electrónica son tratados con una solución al 0,5% de peróxido de hidrógeno, pasados por el horno de blanqueado durante 30 minutos a 95°C, nuevamente por los blanchers para remover restos de piel y finalmente el pasaje de los mismos por el tercer canal de la selectora electrónica.

Además durante el proceso de los lotes se analizó la concentración de aflatoxinas en el egreso final de la selección electrónica. Este producto fue sometido luego a una remoción del contenido de

Resultados y discusión

mitades en exceso, para estandarizarlo frente a especificaciones comerciales que requieren para estos calibres tener un máximo de granos partidos comprendidos entre un 20% y un 30%.

Los resultados analíticos de los lotes analizados durante las tres últimas campañas se detallan a continuación y están expresados en $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Los valores informados como ND corresponden a No Detectado, valores por debajo del límite de detección y aquellos señalado como TR corresponden a valores mayores al límite de detección pero inferiores al límite de cuantificación.

En los siguientes histogramas se grafica cual fue la incidencia de cada una de las aflatoxinas en los 36 lotes (900 toneladas aproximadamente) procesadas durante las tres campañas. En el caso de AFG2, 23 lotes de los 36, que representan un 63,89% tuvieron resultados ND y uno TR, lo que representa un total de 66,67% por debajo del límite de cuantificación $\text{LDC}_{\text{AFG2}}=0,67 \mu\text{g}/\text{kg}$. El valor promedio de AFG2 en el 33,33% que mostró valores por sobre el LDC fue de $0,87 \pm 1,51 \mu\text{g}/\text{kg}$.

Resultados y discusión

Para la AFG1 el comportamiento fue similar al de la AFG2. El valor promedio, en las muestras analizadas con valores por sobre el límite de cuantificación fue de $5,45 \pm 8,93 \mu\text{g}/\text{kg}$.

El comportamiento de AFB2 fue diferente, dado que solamente un 25% de los lotes registraron valores por debajo del $\text{LDC}_{\text{AFB}_2}=0,37 \mu\text{g}/\text{kg}$ y el valor medio hallado en las muestras positivas estuvo $3,15 \pm 4,38 \mu\text{g}/\text{kg}$.

Para la AFB1 tiene un comportamiento similar a la AFB2, sin embargo las concentraciones halladas fueron superiores a las tres anteriores $26,18 \pm 34,20 \mu\text{g}/\text{kg}$.

Un dato significativo es que en 21 lotes (58,33%) solamente se hallaron AFB2 y AFB1, en los 15 lotes restantes estuvieron presentes las cuatro aflatoxinas.

Resultados y discusión

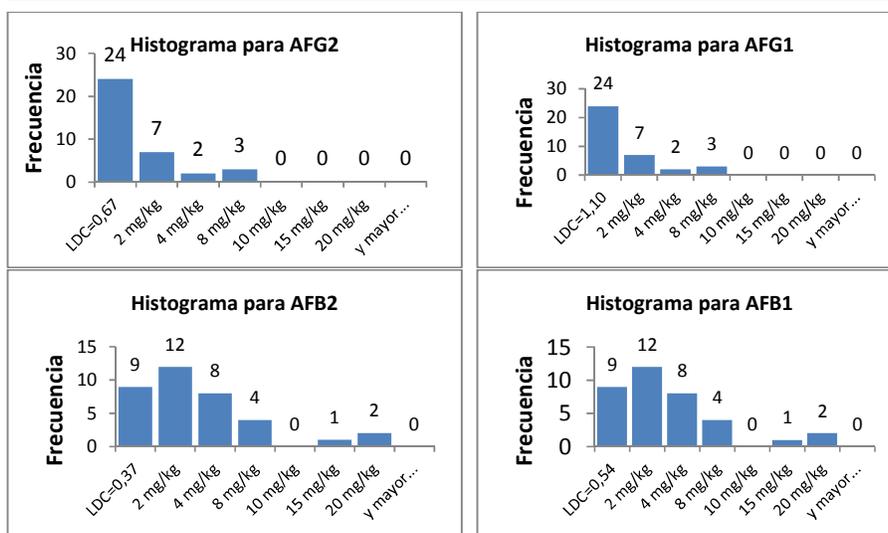


Gráfico 55: Resultados de aflatoxinas en lotes de maní confitería empleados para los ensayos

Esto se puede observar en los siguientes cromatogramas contrastados frente a los estándares de calibración.

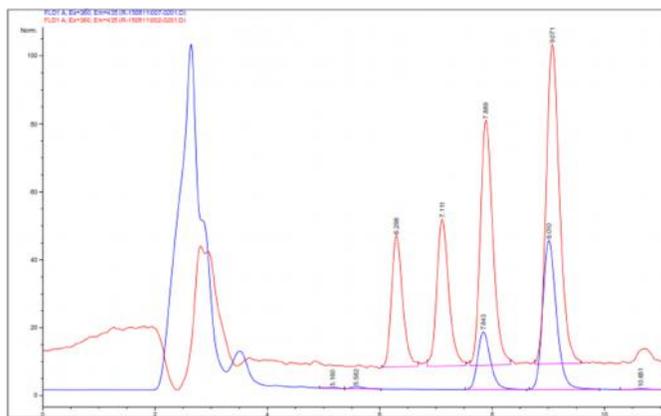


Figura 56: Cromatogramas de aflatoxinas estándar (rojo) y muestra (azul)

Resultados y discusión

No se ha hallado presencia de AFG2 y AFG1 sin haber encontrado AFB2 y AFB1 en ninguna de las muestras.

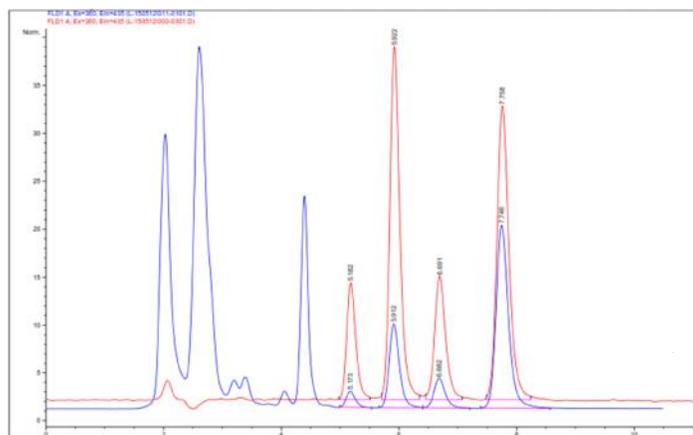


Figura 57: Cromatogramas de aflatoxinas estándar (rojo) y muestra (azul)

Las dos aflatoxinas más importantes desde el punto comercial para las exportaciones a la Unión Europea son la AFB1 que tiene un límite de 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y el contenido total de aflatoxinas con 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Sin embargo, hay muchos otros países que tienen límites superiores a estos y que son posibles destinos en casos en los cuales la reducción no logre resultados debajo de los límites.

En los siguientes histogramas se observan los resultados obtenidos luego del procesamiento de los lotes señalados y el % de disminución del contenido de aflatoxinas totales y de AFB1.

Resultados y discusión

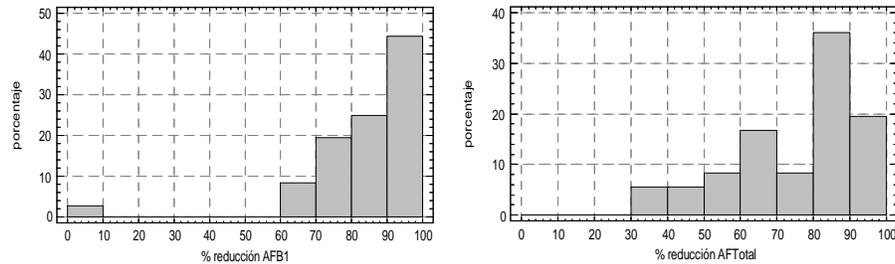


Gráfico 58: Resultados obtenidos de aflatoxinas luego del blanqueado y selección electrónica con dos pasos y doble etapa

Con estos datos se realizaron diferentes análisis de regresión y se determinó el modelo que mejor se ajusta a los resultados obtenidos es la siguiente ecuación logarítmica.

$$AFT_{final} = 0,3371 + 0,9504 \times \ln(AFT_{inicial}) \quad \text{Ecuación N}^\circ 11$$

Puesto que el valor-P en la tabla ANOVA es menor que 0,05, existe una relación estadísticamente significativa entre AFT_{final} y $AFT_{inicial}$ con un nivel de confianza del 95,0%.

El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo ajustado explica 88,1501% de la variabilidad en AFT_{final} después de transformar a una escala $Y/(1-Y)$ para adaptar el modelo. El coeficiente de correlación es igual a 0,9388, indicando una relación relativamente fuerte entre las variables. El error estándar del estimado indica que la desviación estándar de los residuos es 0,3641.

Resultados y discusión

El error absoluto medio es igual 0,3055 y es igual al valor promedio de los residuos. El estadístico de Durbin-Watson examina los residuos para determinar si hay alguna correlación significativa basada en el orden en el que se presentan en el archivo de datos. Puesto que el valor-P es mayor que 0,05, no hay indicación de una auto-correlación serial en los residuos con un nivel de confianza del 95,0%.

Debajo observa el gráfico de regresión logarítmica y los límites de confianza para la línea de regresión. Los valores de aflatoxinas están expresados en $\mu\text{g}/\text{kg}$.

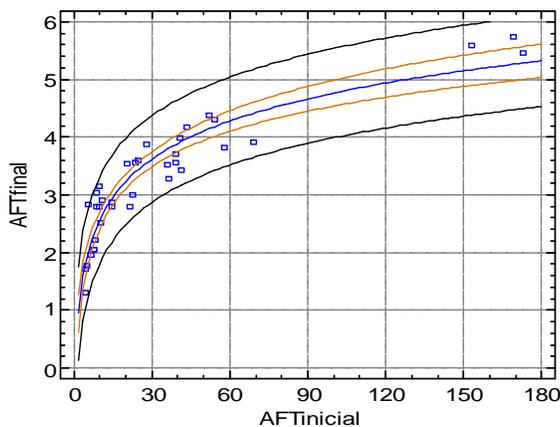


Gráfico 59: Regresión exponencial y los límites de confianza

Se realizó la prueba de Falta de Ajuste para determinar si el modelo seleccionado es adecuado para describir los datos observados, ó si se debería utilizar un modelo más complicado. La prueba se realiza comparando la variabilidad de los residuos del modelo actual con la

Resultados y discusión

variabilidad entre observaciones hechas en valores repetidos de la variable independiente X. Puesto que el valor-P para la carencia de ajuste en la tabla ANOVA es menor que 0,05, el modelo parece ser adecuado para los datos observados con un nivel de confianza del 95,0%.

La tabla de residuos atípicos enlista todas las observaciones que tienen residuos estudentizados mayores a 2 en valor absoluto. Los residuos estudentizados miden cuántas desviaciones estándar se desvía cada valor observado de AFT_{final} del modelo ajustado, utilizando todos los datos excepto esa observación. En este caso, hay un solo residuo estudentizado mayor que 2 (lote C2280 A $AF_{\text{total}}=5,3$) pero ninguno mayor que 3.

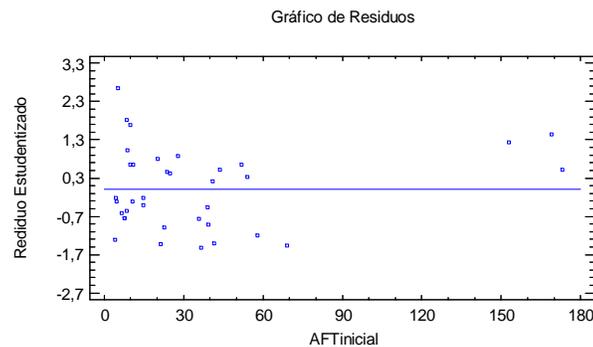


Ilustración 60: Residuos de regresión

Resultados y discusión

El porcentaje de reducción máximo que se obtuvo de AFB1 fue de 98,13% con un valor promedio de $83,31\% \pm 15,98$ y para las aflatoxinas totales el valor máximo obtenido fue de 96,61% con un valor medio de $75,99\% \pm 17,33$.

También se puede observar que cuando el nivel de contaminación es mayor, la reducción porcentual del contenido es mayor, dejando prácticamente el 58,3% de los lotes dentro del límite superior de $4 \mu\text{g}/\text{kg}$ para exportar a la Comunidad Europea, principal destino comercial del maní argentino.

Igualmente la totalidad de los lotes estuvo debajo de los $15 \mu\text{g}/\text{kg}$ de Estados Unidos, Australia, Nueva Zelanda y los $20 \mu\text{g}/\text{kg}$ que establece Argentina, Algeria, China y México siendo estos, destinos alternativos para estos lotes.

Respecto a la disminución de la AFB1, el 72,2% de los lotes estuvo debajo del límite superior de $2 \mu\text{g}/\text{kg}$ aceptado por la Comunidad Europea, sin embargo el contenido de aflatoxinas totales es excluyente, lo que significa que aunque la AFB1 esté por debajo de $2 \mu\text{g}/\text{kg}$ se debe cumplir además el límite de aflatoxinas totales establecido en $4 \mu\text{g}/\text{kg}$.

Resultados y discusión

Otro destino importante para el maní argentina es Rusia, el cual estable un valor máximo solamente de AFB1 en 5 µg/kg, estando en este caso el 100% de los lotes aceptados para la exportación a este mercado.

Aun cuando el nivel inicial de aflatoxinas es elevado, las mermas finales del proceso no se incrementaron significativamente.

4.10 Consideraciones finales

En concordancia con los resultados obtenidos, para lograr un producto de elevada calidad y mitigar el riesgo de ocurrencia de aflatoxinas, se propone implementar un sistema integrado de calidad basado en los principios del Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control que considere a las aflatoxinas como un peligro químico ya que son las únicas micotoxinas que se encuentran en el maní, y por las cuales la comunidad internacional ha establecido límites para su control, considerando al blanqueado en seco con dos etapas de selección electrónica y tratamiento de los granos con defectos físicos con H₂O₂ como una fase esencial para reducir a un nivel aceptable el peligro de contaminación con aflatoxinas.

Además de esto, debemos considerar varios Puntos de Control durante la implementación del sistema.

Resultados y discusión

Comparativamente en los tres ciclos productivos, la ocurrencia de aflatoxinas fue mayor en la campaña 2012/2013 con problemas de déficit hídrico en los meses de verano y elevada humedad durante la cosecha.

Es frecuente la ocurrencia de períodos de estrés hídrico en los meses de enero y febrero, en coincidencia con el desarrollo reproductivo del maní. Esta sequía temporal oscila entre 10 y 20 días, y se caracteriza por una disminución progresiva del contenido de agua útil. Acompañando el proceso de secado del suelo, las plantas manifiestan el efecto de la escasez de agua, aproximadamente a la mitad de cada período de sequía, las hojas y tallos pierden la condición de turgencia durante el día, aunque por la noche esos síntomas desaparecen. Sin embargo hacia final de cada período de estrés, cuando la intensidad del déficit hídrico se hace máxima, las plantas no se recuperan durante la noche (Gastaldi, 2007).

Los insectos, como el *Elasmopalpus lignosus* producen perforaciones en los granos durante el estrés hídrico, lo que favorece la contaminación (Blankenship, 1984). Estos daños permiten la infección, pues el micelio y las esporas se encuentran en la superficie de los mismos

Resultados y discusión

y además, ambos organismos tienen los mismos requerimientos ambientales (Diene et al., 1982)

El déficit hídrico también ocasiona la apertura de las vainas en el suelo, con lo que los granos quedan expuestos a la microflora saprófita.

El seguimiento de las condiciones climáticas y la irrigación son medidas de control necesarias para el cultivo.

Luego, cuando el cultivo ha alcanzado el porcentaje más alto de granos enteros maduros y el mayor rendimiento, durante el arrancado es imprescindible el control de malezas antes de iniciar el proceso, ya que al entremezclarse estas con el cordón de maní, se dificulta la limpieza y secado natural favoreciendo el crecimiento de los hongos sobre las vainas.

La trilla o descapotado es la operación mecánica que consiste en separar las vainas del resto de la planta. Se realiza cuando la humedad del maní en la hilera desciende del 40-45% hasta el 16-20%. Es necesario retirar el maní lo antes posible del campo dado que no solo está expuesto a las condiciones climáticas, que pueden ser desfavorables (lluvias, heladas) sino también a la acción de plagas. El secado inicial del maní en la hilera debe hacerse lo más rápido posible ya que el hongo crece rápidamente y necesita solo unas pocas horas para producir aflatoxinas,

Resultados y discusión

especialmente cuando el grano tiene un alto contenido de humedad y la temperatura es superior a los 25°C.

El tiempo de secado en las hileras es otro punto de control importante a considerar.

El daño mecánico, sobre vainas y granos, es uno de los factores que mayor incidencia tiene en el deterioro del maní y lo predispone al ataque de hongos y formación de aflatoxinas.

En la rizosfera del maní, las especies predominantes son las de los géneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Curvularia*, *Alternaria*, *Rhizopus*, *Streptomice*, *Cephalosporium*, *Mucor*, *Pullularia* y *Scopolariopsis*, los cuales son muy competitivos pero no hay acción antibiótica con el *Aspergillus* (Zambettakis, 1975)

Generalmente durante la la recepción de maní desde el campo se encuentra un cierto porcentaje de granos sin vainas denominados granos sueltos. Estos son granos sucios, dañados físicamente, que han perdido su vaina por la acción de las máquinas empleadas en el proceso de recolección, carga y transporte, y están expuestos al desarrollo de hongos.

Si bien no se puede afirmar que todos los granos sueltos contienen aflatoxinas, estos son los más susceptibles de ser atacados por

Resultados y discusión

insectos y hongos. Analizadas más de cien muestras durante los tres ciclos productivos, de los camiones de maní en caja en los que no se detectó aflatoxinas los resultados arrojaron que 8,7% de los granos sueltos de la campaña 2012/2013, el 2,12% del ciclo 2011/2012 y el 1,21% del 2010/2011 contenían aflatoxinas.

Una buena regulación de las máquinas cosechadoras evita que las vainas se dañen además de recoger una cantidad excesiva de impurezas que favorecen el desarrollo del *Aspergillus spp.* y la producción de aflatoxinas.

Finalmente, es muy importante limpiar bien las descapotadoras y equipos (acoplados, tolvas, cintas, etc.) antes y después de operarlos para eliminar los restos de cosecha, porque constituyen una frecuentemente fuente de contaminación de aflatoxinas (Casini, 2010).

Encontramos aquí un tercer punto de control en el proceso de recolección y transporte.

Es clave muestrear en forma representativa cada camión que proviene de los campos y determinar el contenido de aflatoxinas. Segregar todo aquel camión en el cual se ha detectado aflatoxinas, independientemente de la concentración hallada brinda la posibilidad de evitar contaminar lotes de maní libres de aflatoxinas.

Resultados y discusión

Las impurezas constituyen el mayor riesgo para el desarrollo de aflatoxinas y de producir incendio, ya que en ellas se concentra la mayor humedad. La tierra por ejemplo, obstaculiza los canales naturales que se forman en la pila y por donde el aire ingresa y se elimina la humedad.

El secado hasta valores iguales o inferiores al 9%, previo al almacenamiento es una etapa esencial en el control y crecimiento de los hongos. El almacenamiento del maní requiere sanidad y limpieza de las celdas de almacenamiento y un buen control de la ventilación para proveer un ambiente no saturado (Fernandez y Giayetto, 2006).

El maní, luego de secado comienza un ciclo de estabilización de humedad de la masa de granos, y durante el día se manifiesta una migración de humedad y evaporación superficial, agua que durante la noche puede condensar en las chapas de los techos y humedecer las vainas creando condiciones óptimas para la producción de aflatoxinas.

En las celdas es conveniente tener un sistema de aireación forzada o ventilación en la parte superior y operarlo cada día antes del atardecer para prevenir la condensación (Pattee y Stalker, 1995).

Finalmente el procesamiento diferencial de lotes contaminados y posterior blanqueado culminan con una serie de medidas preventivas y

Resultados y discusión

correctivas, que empleadas en su totalidad minimizarían la ocurrencia de aflatoxinas.

CONCLUSIONES

5 Conclusiones

En los tres períodos se encontró una incidencia máxima en la ocurrencia de aflatoxinas del 2,5% del total de las muestras analizadas con un valor promedio del 1,3%, lo cual indica que esta región Argentina no tiene una alta tasa de incidencia y contaminación, sin embargo cada año existen lotes contaminados que requieren un proceso diferencial.

El estrés hídrico acontecido durante los meses de enero y febrero del ciclo 2012/2013 incidió sobre la ocurrencia de aflatoxinas en maní tipo runner de la variedad *granoleico* producido en la región centro-sur de Córdoba.

La cantidad total de agua caída es importante para el desarrollo del cultivo pero aún más la distribución homogénea durante el ciclo reproductivo. La irrigación durante los meses críticos, desde enero a marzo podría mitigar la incidencia de *Aspergillus spp* a causas del estrés hídrico.

El maní en caja durante el ciclo 2012/2013 permaneció en las hileras mayor tiempo como consecuencia de las lluvias tardías que

Conclusiones

afectaron la humedad de los granos favoreciendo la ocurrencia de plagas y hongos.

La aplicación de medidas de control de plagas, que impidan el daño de los insectos a los granos, y que favorecen la infección por hongos, se transforma en un proceso imprescindible durante los ciclos de carencia de humedad en el suelo desde la formación hasta el llenado de los granos (etapas fenológicas R2 a R4) desde el mes de febrero hasta fin el mes de marzo.

Prácticamente la totalidad del maní sembrado en Córdoba pertenece a la variedad *granoleico*, con valores de ácido oleico de $78,97 \pm 2,29$ y de ácido linoleico de $5,11 \pm 1,15$ arrojando relaciones mayores a 15 para un calibre homogéneo de grano de onza 38/42, si bien existen diferencias significativas entre los ciclos, seguramente dependientes del grado de madurez de los granos dependientes factores ambientales.

El empleo de un sistema de análisis de riesgos y puntos críticos de control desde el campo, que incluya los procesos de acondicionamiento, secado, almacenamiento, selección y blanqueado de

Conclusiones

maní blanqueado permite establecer puntos de control para mitigar los factores de riesgo incluyendo a la humedad de los granos, el porcentaje de granos dañados, el análisis de aflatoxinas y segregación de lotes contaminados, como así también puntos críticos de control en el proceso de blanqueado, único capaz de reducir el riesgo a valores aceptables.

La selección electrónica es un medio eficiente para reducir la contaminación por aflatoxinas removiendo granos físicamente dañados.

La eficiencia de la selección electrónica es dependiente del flujo másico empleado, siendo inversamente proporcional a este. Los valores máximos de remoción de daños se lograron a 2.000 kg/h con un valor del $65,47\% \pm 12,56$ para la primera etapa, siendo imprescindible una segunda etapa en la cual la eficiencia al mismo flujo másico fue de $68,22\% \pm 12,19$.

El tratamiento de granos dañados con agentes oxidantes, como una solución de peróxido de hidrógeno al 0,5% v/v con el posterior secado, blanqueado y selección electrónica disminuyó la concentración de aflatoxinas y el porcentaje de granos rechazados desde un 19% inicial a valores inferiores al 6%.

Conclusiones

El porcentaje de reducción máximo que se obtuvo de AFB1 fue de 98,13% con un valor promedio de $83,31\% \pm 15,98$ y para las aflatoxinas totales el valor máximo obtenido fue de 96,61% con un valor medio de $75,99\% \pm 17,33$.

Se puede predecir el comportamiento del proceso de blanqueado y su incidencia sobre los niveles de aflatoxinas a través de una ecuación logarítmica, la cual indica que los niveles de reducción son mayores cuando mayor es el nivel de contaminación.

El método de análisis de aflatoxinas por HPLC resultó ser preciso, simple, con bajos límites de detección y cuantificación, y muy económico frente a otros métodos alternativos más actuales.

BIBLIOGRAFÍA

6 Bibliografía

- Abbas, H.K. (2005). Recent Developments in Immunochemical Methods. In: Aflatoxin and Food Safety, Hamed K. Abbas (Ed.), Taylor & Francis Group: New York, USA, pp. 269-272.
- Abdel-Wahhab, M.A., Abdel-Galil, M.M., Hassan, A.M., Hassan, N.H., Nada, S.A., Saeed, A., El-Sayed, M.M. (2007). Zizyphus spina-christi extract protects against aflatoxin B1-initiated hepatic carcinogenicity. African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines, 4, 248-256.
- Ackermann, B. (2008). Historia del cluster manisero argentino. [Gacetilla. Diciembre 2008] Cámara Argentina del Maní. Córdoba. Argentina: Cámara Argentina del Maní.
- Alaniz Zanon M.S., Chiotta M.L., Giaj-Merlera G., Barros G., Chulze S. (2014) Evaluation of potential biocontrol agent for aflatoxin in Argentinean peanuts. International Journal of Food Microbiology 162: 220–225.
- Amaya, F., Young, C. T., Norden, A. J., & Mixon, A. C. (1980). Chemical screening for *Aspergillus flavus* resistance in peanuts. *Oleagineux*, 35(5), 255-259.
- Arora, M. K., & Strange, R. N. (1991). Phytoalexin accumulation in groundnuts in response to wounding. *Plant Science*, 78(2), 157-163.

Bibliografía

- Arroyo Manzanares N., Perez Huertas J., Gámiza Gracia L., García Campaña A. M. (2014). Control de Micotoxinas en Alimentos. Boletín Graseqa N°7. Universidad de Granada. España
- Azziz-Baumgartner, E., Lindblade, K., Gieseke, K., Rogers, H.S., Kieszak, S., Njapau, H., Schleicher, R., McCoy, L.F., Misore, A., DeCock, K., Rubin, C., Slutsker, L. (2005). Aflatoxin Investigative Group. Case control study of an acute aflatoxicosis outbreak, Kenya. *Environmental Health Perspectives*, 113, 1779-1783
- Bababunmi, E. A.& Bassir, O. (1969). The effect of aflatoxin on blood clotting in the rat. *Brit. J. Pharmacol*, Vol.37, pp.497-500
- Bahat, R.V., Vasanti, S. (2003). Mycotoxin food safety risk in developing countries, *Focus* 2003, 10, brief 3, International Food Policy Research Institute, Washington, USA.
- Barros, G., Chiotta, M.L., Torres, A., Chulze, S. (2006 b). Genetic diversity in *Aspergillus parasiticus* population from the peanut agroecosystem in Argentina. *Letters in Applied Microbiology* 42:560-566.
- Barros, G., Torres, A., Chulze S. (2005). *Aspergillus flavus* population isolated from soil of Argentina's peanut growing region. *Sclerotia* production and toxigenic profile. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 85: 2349-2353.
- Barros, G., Torres, A., Palacio, G., Chulze, S. (2003). *Aspergillus* species from section Flavi isolated from soil at planting and harvest time

Bibliografía

- in peanut-growing regions in Argentina. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 83:1303-1307. ISSN 0022-5142. Editorial: John Wiley & Sons, Ltd. Indianapolis (USA).
- Barros, G., Torres, A., Rodriguez, M., Chulze S. (2006 a). Genetic diversity in *Aspergillus flavus* population isolated from peanut soil in Argentina. *Soil Biology and Biochemistry* 38: 145-152.
- Beasley, J., Jordan, D. y Lemo, R. (2002). Agricultural Practices for Peanut Growing and Harvesting. Peanut Voluntary Code for Good Management Practices. American Peanut Council Good Management Practices. EEUU.
- Bee, S.C. and Honeywood, M.J. 2002. Color Sorting for the bulk food industry. In: Colour in Food: Improving Quality. MacDougall D.B. (Ed.), Food Science and Tech. 6, 115-142.
- Bell, M. J., Wright, G. C., & Hammer, G. L. (1992). Night temperature affects radiation-use efficiency in peanut. *Crop Science*, 32(6), 1329-1335.
- Benford, D.; Leblanc, J.C. & Setzer, R.W. (2010). Application of the margin of exposure (MoE) approach to substances in food that are genotoxic and carcinogenic. Aflatoxin B1 (AFB1). *Food Chemical Toxicology*, Vol. 48, pp 534-541
- Bennett, J.W., Klich, M. (2003). Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, 16(3), 497- 516.

Bibliografía

- Blankenship, P. D., Cole, R. J., Sanders, T. H., & Hill, R. A. (1984). Effect of geocarposphere temperature on pre-harvest colonization of drought-stressed peanuts by *Aspergillus flavus* and subsequent aflatoxin contamination. *Mycopathologia*, 85(1-2), 69-74.
- Bolsa de Cereales de Córdoba y Cámara de Cereales y Afines de la Provincia de Córdoba, (2015). Informe Especial N°78. Cultivo de Maní.
- Bryden, W. L., Lloyd, A. B., & Cumming, R. B. (1980). Aflatoxin contamination of Australian animal feeds and suspected cases of mycotoxicosis. *Australian Veterinary Journal*, 56(4), 176-180.
- Bryden, W.L. (1999). Aflatoxin toxicity and reduction in contaminated commodities. Australian Centre for International Agricultural Research. Australia.
- Cámara Argentina del Maní, (2015). Cluster Manisero Argentino. www.camaradelmani.com.ar
- Campbell, B.C.; Molyneus, R.J. & Shatzki, T. (2006). Advances in Reducing aflatoxin Contamination of U.S. Tree Nuts, In: Aflatoxin and Food Safety, Abbas, H.K. (Ed.), 483-516, CRC Press, Boca Raton, FL, USA
- Cisneros, J. M., Cantero, A., Marcos, J., Degioanni, A., Bricchi, E., Giayetto, O., Uberto, M. (1998). Comportamiento de un subsolador alado adaptable a implementos de uso común. *Ingeniería rural y*

Bibliografía

mecanización agraria en el ámbito de Latinoamérica. Editorial de la Universidad de La Plata, La Plata, Argentina, 128-134.

- Clavero, M. R., Hung, Y. C., Beuchat, L. R., & Nakayama, T. (1994). Flavor, Color and Texture of Peanuts Treated with Hydrogen Peroxide 1. *Peanut Science*, 21(1), 1-4.
- Cole, R. J., Dorner, J. W., & Holbrook, C. C. (1995). Advances in mycotoxin elimination and resistance. Advances in peanut science. Stillwater, OK: American Peanut Research and Education Society, Inc, 456-74.
- Cole, R. J., Hill, R. A., Blankenship, P. D., Sanders, T. H., & Garren, K. H. (1982). Influence of irrigation and drought stress on invasion by *Aspergillus flavus* of corn kernels and peanut pods. *Developments in Industrial Microbiology*.
- Craufurd, P. Q., Prasad, P. V. V., Waliyar, F., & Taheri, A. (2006). Drought, pod yield, pre-harvest *Aspergillus* infection and aflatoxin contamination on peanut in Niger. *Field crops research*, 98(1), 20-29.
- D' Mello, J.P.F., Macdonald, A.M.C. (1997). Mycotoxins. *Animal Feed Science and Technology*, 69, 155-166.
- Davidson, J. I., Blankenship, P. D., Henning, R. J., Guerke, W. R., Smith, R. D., & Cole, R. J. (1991). Geocarposphere temperature as it relates to Florunner peanut production. *Peanut Science*, 18(2), 79-85.

Bibliografía

- Devero, A. (1999). Aflatoxins: The effects on human and animal health. Biol, 4900; Fall,
- Diener U.L., Davis N.D. (1967) Limiting temperature and relative humidity for growth and production of aflatoxin and free fatty acids by *Aspergillus flavus* in sterile peanuts. J Am Oil Chem Soc. Apr;44(4):259–263.
- Diener, U.L.; Cole, R.J.; Sanders, T.H.; Payne, G.; Lee, L.S. & Klich, M.A. (1987). Epidemiology of Aflatoxin formation by *Aspergillus flavus*. Annual Review of Phytopathology, Vol.25, No. , pp 249-270
- Diener, U.L.; Pettit, R.E.; Cole, R.J. (1982) Aflatoxins, and other mycotoxins in peanuts. Peanut science and technology. American Peanut Research and Education Society. pp. 486-519
- Do, J.H., Choi, D. (2007). Aflatoxins: detection, toxicity, and biosynthesis. Biotechnology and Bioprocesses Eng. 12: 585-593.
- Dorner, J.W. (2008). Management and prevention of mycotoxins in peanuts. Food Additives and Contaminants, Vol. 25, No. 2, pp 203-208.
- Driehuis, F., Te Giffel, M.C., van Egmond, H.P., Fremy, J.M., Blüthgen, A. (2010). Feed-associated mycotoxins in the dairy chain: occurrence and control. In: Bulletin of the International Dairy Federation 444/2010. Bruselas (Bélgica). 25 pp.

Bibliografía

- Eaton, D.L., Gallagher, E.P. (1994). Mechanisms of aflatoxin carcinogenesis. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 34: 135-172.
- Elamin, N. H., Abdel-Rahim, A. M., & Khalid, A. E. (1988). Aflatoxin contamination of groundnuts in Sudan. *Mycopathologia*, 104(1), 25-31.
- Etzel, R.A. (2006). What the primary care pediatrician should know about syndromes associated with exposures to mycotoxins. *Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care*, 36, 282-305.
- FAO, Food and Agriculture Organization. (1993). Sampling plans for aflatoxin analysis in peanuts and corn. FAO, Food and Nutrition. Paper 55. Rome.
- FAO, Food and Agriculture Organization. (2003).. Manual sobre la aplicación del Sistema de Análisis de Peligros y de Puntos Críticos de Control (APPCC) en la prevención y control de las micotoxinas. Estudio FAO Alimentación y Nutrición N° 73, Roma. Italia
- FAO, Food and Agriculture Organization. (2004). Reglamentos a nivel mundial para las micotoxinas en los alimentos y en las raciones en el año 2003. Estudio FAO: Alimentación y Nutrición 81. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Roma (Italia).

Bibliografía

- FAO, Food and Agriculture Organization. (2009). Seminario: Impacto de las micotoxinas en la inocuidad y comercio de los alimentos, Santiago (Chile).
- Ferguson, L.R., Philpott, M. (2008). Nutrition and mutagenesis. Annual Review of Nutrition 28: 313–29.
- Fernandez, E. M. , Rosolem, C. A., Maringoni, A. C., Oliveira, D. M.T (1997). Fungus incidence on peanut grains as affected by drying method and Ca nutrition. Field Crop Res. 52: 9-15
- Fernández, E. M., & Giayetto, O. (2006). El cultivo de maní en Córdoba. Irish Roots Cafe.
- Frankel, E. N. (2014). *Lipid oxidation*. Elsevier.
- Gallagher, E., Kunze, K.L., Stapleton, P.L., Eaton, D.L. (1996). The Kinetics of aflatoxin B1 oxidation by human cDNA-expressed and human liver microsomal cytochromes P450 1A2 and 3A4. Toxicology and Applied Pharmacology 141: 595-606
- Galvez F.C., Francisco M.L., Villarino B.J., Lustre A.O., Resurreccion A.V., (2003). Manual sorting to eliminate aflatoxin from peanuts. J Food Prot.,66(10):1879-84.
- Gastaldi, S., Fernandez, E. M., Giayetto, O., & Cerioni, G. A. (2007). RENDIMIENTO Y GRANOMETRÍA DE CULTIVARES DE MANÍ EN DEL CAMPILLO. In *Jornada Nacional de Maní. 22. Simposio de Maní en el Mercosur. General Cabrera, Córdoba. AR.*

Bibliografia

- Georgianna, D.R., Payne, G.A. (2009). Genetic regulation of aflatoxin biosynthesis: From gene to genome. *Fungal Genetics and Biology*, 46, 113-125.
- Gimeno, A., Martins, M.L. (2006). *Mycotoxins and Mycotoxicosis in Animals and Humans*. Special Nutrients, Inc. USA (Ed.). Victor Mireles Communications, Ciudad de México, México, 127 pp.
- Giorni, P., Battilani, P., Pietri, A., Magan, N. (2008). Effect of a_w and CO₂ level on *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin production in high moisture maize post-harvest. *International Journal of Food Microbiology*, 122(1-2), 109-113.
- Gloria, E.M.; Janeiro, V.; Abdallah, M.F.I.; Borges, F.C.; Bertelli, M.; Gasparotto, B.; Tomazella, T.; Calori-Domingues, M.A. & Zocchi, S.S. (2010). Aflatoxin contamination estimate of corn truck loads based on different quality kernels. Proceedings of 124th AOAC Annual Meeting & Exposition, Orlando, FL, USA
- Goldblatt, I.A. (1977). Mycotoxins. Past, present and future. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. April 1977, Volume 54, Issue 4, pp A302-A309
- Goryacheva, I.Yu., Rusanova, T.Yu., Burmistrova, N.A., De Saeger, S. (2009). Immunochemical methods for the determination of mycotoxins. *Journal of Analytical Chemistry*, 64, 768-785.

Bibliografia

- Graham, J. (1982). Occurrence of aflatoxin in peanuts in relation to soil type and pod splitting. *Food technology in Australia*.
- Grocery Manufacturers Association (1993). Industry Handbook for Safe Processing of Nuts.
- Guengerich, F.P., Johnson, W.W., Shimada, T., Ueng, Y., Yamazaki, H., Langouët, S. (1998). Activation and detoxication of aflatoxin B1. *Mutation Research* 402:121-128.
- Guengerich, F.P., Johnson, W.W., Ueng, Y., Yamazaki, H., Shimada, T. (1996). Involvement of cytochrome P450, glutathione S-transferase and epoxide hydrolase in the metabolism of aflatoxin B1 and relevance to risk of human liver cancer. *Environmental Health Perspectives* 104(3): 557 – 562.
- Hag-Elamin, N.H.; Abdel-Rahim, A.M. and Khalid, A.S. (1988). Aflatoxin contamination of groundnuts in Sudan. *Mycopathologia*, 104:25-32.
- Harold e. Pattee, Clyde T.Y. (1982). *Peanut Science and Technology*. American Peanut Research and Education Society. Cornell University. USA.
- Hartley, R. D.; Nesbitt, B. F. & O'Kelly, J. (1963). Toxic metabolites of *Aspergillus flavus*. *Nature*, Vol.198, pp.1056-1058
- Hayes, A. W. (1980). Mycotoxins: a review of biological effects and their role in human diseases. *Clinical Toxicology*, 17, 45-83.

Bibliografia

- Hendrickse, R. G. (1997). Of sick turkeys, kwashiorkor, malaria, perinatal mortality, heroin addicts and food poisoning: research on the influence of aflatoxins on child health in the tropics. *Annals of tropical medicine and parasitology*, 91(7), 787-794.
- Hill, R. A., Wilson, D. M., McMillian, W. W., Widstrom, N. W., Cole, R. J., Sanders, T. H., & Blankenship, P. D. (1985). Ecology of the *Aspergillus flavus* group and aflatoxin formation in maize and groundnut. *Trichothecenes and other mycotoxins*, 8, 79-95.
- Horn, B. W., Dorner, J. W., Greene, R. L., Blankenship, P. D., & Cole, R. J. (1994). Effect of *Aspergillus parasiticus* soil inoculum on invasion of peanut seeds. *Mycopathologia*, 125(3), 179-191.
- Hsieh, D. P. H. (1989). Potential human health hazards of mycotoxins. *Bioactive molecules*.
- Hussein, H.S., Brasel, J.M. (2001). Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology*, 167, 101-134.
- IARC (2002). Overall evaluation of carcinogenicity to humans. Group 3. Unclassifiable as to carcinogenicity to humans. IARC monographs programme on the evaluation of carcinogenic risks to humans. International Agency for research on Cancer.
- Johansson, A.S.; Whitaker, T.B.; Hagler, W.M.; Jr, Bowman, D.T.; Slate, A.B. & Payne, G. (2006). Predictin Aflatoxin and Fumonisin in Shelled Corn Lots Using Poor-Quality Grade Components. *Journal of AOAC International*, Vol. 89, No.2, pp 433-440

Bibliografia

- Kabak, B.; Dobson, A.D.W. & Var, I. (2006) Strategies to Prevent Mycotoxin Contamination of Food and Animal Feed: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, Vol. 46, pp 593-619
- Kensler, T.W., Qian, G.-S., Chen, J.-G., Groopman, J.D. (2003). Molecular pathway of aflatoxin detoxification. *Nature Reviews Cancer*, 3, 321-329.
- Ketring, D. L., Brown, R. H., Sullivan, G. A., & Johnson, B. B. (1982). Growth physiology. *Peanut Science and Technology*, 411-457.
- Ketring, D. L.; Benedict, C. R.; Yeager, M. (1976). Growing Season and Location Effects on Water Uptake and Drying Rates of Peanut Seeds from Genotypes Resistant and Susceptible to Invasion by *Aspergillus flavus* Lk. ex. Fr.1,2. *Agronomy Journal*. American Society of Agronomy 68: 661-665
- Kiessling, K.-H., Pettersson, H., Sandholm, K., Olsen, M. (1984). Metabolism of aflatoxin, ochratoxin, zearalenone, and three trichothecenes by intact rumen fluid, rumen protozoa, and rumen bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 47(5), 1070-1073.
- Krishnamachari, K.A., Nagaarajan, V., Bhat, R.V., Tilak, T.B. (1975). Hepatitis due to aflatoxicosis: an outbreak in Western India. *The Lancet*, 305, 1061-1063.

Bibliografia

- Kumar V, Bagwan NB, Koradia, VG and Padavi, RD (2010). Colour sorting - an effective tool to remove aflatoxin contaminated kernels in groundnut. *Indian Phytopathology* 63 (4): 449-451.
- Kumar, M. & Agarwal, V.K. (1997). Fungi detected from different types of seeds discoloration in maize. *Seed Research*, Vol. 25, pp 88-91
- Lamb, M. C., & Sternitzke, D. A. (2001). Cost of aflatoxin to the farmer, buying point, and sheller segments of the Southeast United States peanut industry. *Peanut Science*, 28(2), 59-63.
- Lewis, L., Onsongo, M., Njapau, H., Schurz-Rogers, H., Lubber, G., Kieszak, S., Nyamongo, J., Backer, L., Dahiye, A.M., Misore, A., Decot, K., Rubin, C. (2005). The Kenya Aflatoxicosis investigation group. Aflatoxin contamination of commercial maize products during an outbreak of acute aflatoxicosis in Eastern and Central Kenya. *Environmental Health Perspectives*, 113, 1763-1767.
- Ma R. S. Clavero, Y-C. Hung, L. R. Beuchat, and T. Nakayama (1994) Flavor, Color and Texture of Peanuts Treated with Hydrogen Peroxide¹. *Peanut Science*: January 1994, Vol. 21, No. 1, pp. 1-4.
- Mejía-Teniente, L., Chapa-Oliver, A. M., Torres-Pacheco, I., Vazquez-Cruz, M. A., & Guevara-González, R. G. (2011). *Aflatoxins Biochemistry and Molecular Biology-Biotechnological Approaches for Control in Crops*. INTECH Open Access Publisher.

Bibliografia

- Milicevic D., Skrinjar M. Baltic T. (2010). Real and perceived risks for mycotoxin contamination in foods and feeds: challenges for food safety control. *Toxins*, 2, pp. 572–592
- Miller, J.D. 1994. Conference Report: 6th International Working Conference on Stored- product. Protection. Australian Mycotoxin Newsletter 5(2), p. 1- 8.
- Minto, R.E. & Townsend, C.A. (1997). Enzymology and molecular biology of aflatoxin biosynthesis, *Chem. Rev.* 97, 2537-2556.
- Mintzlaff, H. J., Lotzsch, R. Tauchmann, F. Meyer, W. & Leistner, L. (1974). Aflatoxin residues in the liver of broiler chicken given aflatoxin-containing feed. *Fleischwirtschaft*, Vol.54, pp.774-778
- Mohamed, H. A., Clark, J. A., & Ong, C. K. (1988). Genotypic Differences in the Temperature Responses of Tropical Crops I. GERMINATION CHARACTERISTICS OF GROUNDNUT (ARACHIS HYPOGAEA L.) AND PEARL MILLET (PENNISETUM TYPHOIDES S. & H.). *Journal of Experimental Botany*, 39(8), 1121-1128.
- Molyneux, R.J.; Mahoney, N. & Campbell, B.C. (2007). Mycotoxins in edible tree nuts. *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 119, No. , pp 72-78
- Moss, M. O. (1996). Mode of formation of ochratoxin A. *Food Addit. Contam.* 13 (Suppl.): 5–9.

Bibliografía

- Moss, M. O. (2002). Mycotoxin review-1. *Aspergillus* and *Penicillium*. *Mycologist*, 16(03), 116-119.
- Nesbitt, B.; O'Kelly, K.; Sargeant, K. & Sheridan, A. (1962). Toxic metabolites of *Aspergillus flavus*. *Nature*, Vol.195, pp.1062-1063
- Nesbitt, B.; O'Kelly, K.; Sargeant, K. & Sheridan, A. (1962). Toxic metabolites of *Aspergillus flavus*. *Nature*, Vol.195, pp.1062-1063
- Nilüfer, D., & Boyacioglu, D. (2002). Comparative study of three different methods for the determination of aflatoxins in tahini. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(12), 3375-3379.
- Oliva, L. L., Terzariol, L., Nepote, V., & Grosso, N. R. (2011). ESTABILIDAD QUÍMICA Y SENSORIAL DE MANÍ COMÚN Y ALTO OLEICO ALMACENADO EN CAJA DURANTE 12 MESES. *Jornada Nacional de Maní. 26. 2011 09 15, 15 de septiembre de 2011. General Cabrera, Córdoba. AR.*
- Panda, P., & Mehta, A. (2013). Aflatoxin Detoxification Potential of *Ocimum tenuiflorum*. *Journal of Food Safety*, 33(3), 265-272.
- Patte, H. E. y Stalker, H. T. (1995). *Advances in peanut science.*
- Patterson, D.S.P. & Roberts. B.A. (1972). Aflatoxin metabolism in duck-liver homogenates: The relative importance of reversible cyclopentenone reduction and hemiacetal formation. *Food and Cosmetics Toxicology*, Vol.10, No.4, (July 1972), pp. 501-512, ISSN 0278-6915

Bibliografía

- Paulsen M.R., Brusewitz G.H., Clary B.L. (1976). Aflatoxin content and skin removal of spanish peanuts as affected by treatments with chemicals, water spray, heated air, and liquid nitrogen. *Journal of Food Science*. Volume 41, Issue 3, pages 667–671.
- Pedelini, R. 2008. Maní. Guía práctica para su cultivo. Publicaciones Regionales Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. ISSN 1851-4081.
- Pedelini, R., Casini, C., & Giandana, E. (1996). Manual del maní. *INTA EEA Manfredi, Córdoba, Argentina*.
- Pelletier, M. J.; Spetz, W. L. and Aultz, T. R. (1991). Fluorescence sorting instrument for the removal of aflatoxin from large numbers of peanuts. *Review of Scientific Instruments* , Vol.62, No.8, pp1926-1931
- Pettit, R.E., Azaizeh, H.A., Taber, R.A., Szerszen, J.B., and Smith, O . D . (1989). Screening groundnut cultivars for resistance to *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, and aflatoxin contamination. Pages 291-303 in *Aflatoxin contamination of groundnut: proceedings of the International Workshop, 6 - 9 Oct 1987, ICRISAT Center, India* (McDonald, D., and Mehan, V.K., eds.). Patancheru 502 324, Andhra Pradesh, India: International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics.
- Pildain, M. B., Cabral, D., & Vaamonde, G. (2005). Poblaciones de *Aspergillus flavus* en maní cultivado en diferentes zonas

Bibliografía

- agroecológicas de la Argentina, caracterización morfológica y toxigénica. *Rev Invest Agropec*, 34, 3-19.
- Pitt, J. I., & Hocking, A. D. (2003). Biocontrol of aflatoxins in peanuts. *Microbiology Australia*, 24(3), 18-19.
- Pitt, J. I., & Hocking, A. D. (2006). Mycotoxins in Australia: biocontrol of aflatoxin in peanuts. *Mycopathologia*, 162(3), 233-243.
- Pitt, J.I., Dyer, S. K. and McCammon, S. (1991), Systemic invasion of developing peanut plants by *Aspergillus flavus*. *Letters in Applied Microbiology*, 13: 16–20. doi: 10.1111/j.1472-765X.1991.tb00558.x
- Pomenranz, Y. (1992). Biochemical, functional, and nutritive changes during storage. In: *Storage of Cereal Grains and Their Products*, Sauer, D.B. (Ed.), 55-141, 4th ed., American Association of Cereal Chemists, St. Paul, Minesota, USA
- Robin, Y; Chiou, Y; Wu, P.Y. & Yen, Y.H. (1995). Color sorting of lightly roasted and deskinneD peanut kernels to diminish aflatoxin and retain the processing potency. *Developments in Food Science*, Vol. 37, pp 1533-1546
- Rocha, M. D. D., Maia, P. P., Rodrigues, M. A. C., & Martins, I. (2008). Incidência de aflatoxinas em amostras de amendoim e paçoca comercializadas na cidade de Alfenas-MG, Brasil. *Rev Bras Toxicol*, 21(1), 15-9.

Bibliografía

- Rodricks, J.V., Stoloff, L. (1977). Mycotoxins in human and animal health. Pathotox publishers, park forest, south, 1L, pp.67-69
- Rodríguez, H. W. M. (2010). Micotoxinas y Aflatoxina B1, un problema en salud animal. *Teoría y praxis investigativa*, 5(2), 71-78.
- Rubio Martínez, R. (2011). Incidencia de aflatoxinas en leche de oveja y derivados en Castilla-La Mancha.
- Sanders, T. H., & Mixon, A. C. (1979). Effect of peanut tannins on percent seed colonization and in vitro growth by *Aspergillus parasiticus*. *Mycopathologia*, 66(3), 169-173.
- Sanders, T. H., Adelsberg, G. D., Hendrix, K. W., & McMichael Jr, R. W. (1999). Effect of Blanching on Peanut Shelf-Life 1. *Peanut Science*, 26(1), 8-13.
- Sanders, T. H., Blankenship, P. D., Cole, R. J., & Hill, R. A. (1984). Effect of soil temperature and drought on peanut pod and stem temperatures relative to *Aspergillus flavus* invasion and aflatoxin contamination. *Mycopathologia*, 86(1), 51-54.
- Sargeant, K.; Sheridan, J.; O'Kelly, J. & Carnaghan, R. B. A. (1961). Toxicity associated with certain samples of groundnuts. *Nature*, Vol.192, pp.1096-1097
- SENASA, Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (2010). Reporte Comparativo del Comercio Exterior de Productos, Subproductos y Derivados de Origen Vegetal. Cereales, Oleaginosas y Subproductos. 2009 / 2010 - Oficina de Estadísticas

Bibliografía

de Comercio Exterior, SENASA, Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria. Buenos Aires pág. 3.

Sforza, S., Dall'Asta, C., Marchelli, R. (2005). Recent advances in mycotoxin determination in food and feed by hyphenated chromatographic techniques/mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, 25, 54-76.

Shephard, G.S. (2009). Aflatoxin analysis at the beginning of the twenty-first century. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 395, 1215-1224.

Silva M.P., Martinez M.J., Casini C., and Grosso N.R. 2010. Tocopherol content, peroxide value and sensory attributes in roasted peanuts during storage. *International Journal of Food Science and Technology* 45: 1499-1504.

Singh, A. K., Mehan, V. K., Mengesha, M. H., & Jambunathan, R. (1992). Imbibition rates, leachates and fungal colonization of seeds of selected groundnut germplasm lines with different seed testa colours. *Oléagineux*, 47(10), 579-582.

Soriano del Castillo, J.M. et al. (2007). *Micotoxinas en Alimentos*. Ediciones Díaz de Santos (Ed.), España, 396 pp.

Sreenivasamurthy, V., & Parpia, H. A. B. Srikanta, & Shankar, M. 1967. Detoxification of aflatoxin in peanut meal by hydrogen peroxide. *J. Assoc. Offic. Anal. Chem*, 50, 350-354.

Bibliografia

- Stone, R. (2001). Down to the wire on bioweapons talks. *Science*, 293, 414-416.
- Stroka, J., & Anklam, E. (2002). New strategies for the screening and determination of aflatoxins and the detection of aflatoxin-producing moulds in food and feed. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 21(2), 90-95.
- Taub, I. A., & Singh, R. P. (Eds.). (1997). *Food storage stability*. CRC Press.
- Torres A.M., Barros G:G., Palacios S.A., Chulze S.N., Battilani P. (2014). Review on pre- and post-harvest management of peanuts to minimize aflatoxin contamination. *Food Research International*. 62: 11 – 19
- Tripathi, S., Mishra, H.N. (2009). A rapid FT-NIR method for estimation of aflatoxin B1 in red chili powder. *Food Control*, 20, 840-846.
- Turner, N.W., Subrahmanyam, S., Piletsky, S.A. (2009). Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. *Analytica Chimica Acta*, 632, 168-180.
- Vaamonde, G., Patriarca, A., Pinto, V. F., Comerio, R., & Degrossi, C. (2003). Variability of aflatoxin and cyclopiazonic acid production by *Aspergillus* section Flavi from different substrates in Argentina. *International journal of food microbiology*, 88(1), 79-84.

Bibliografia

- Van Egmond, H.P., Schothorst, R.C., Jonker, M.A. (2007). Regulations relating to mycotoxins in food. Perspectives in a global and European context. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 389, 147-157.
- Vekiru E., Hametner C., Mitterbauer R., Rechthaler J., Adam G., Schatzmayr G., Krska R., Schuhmacher R. (2010) Cleavage of zearalenone by *Trichosporon* mycotoxinivorans to a novel nonestrogenic metabolite. *Appl Environ Microbiol.* 76(7): 2353–2359.
- Verma, R.J. (2004). Aflatoxin causes DNA damage. *International Journal of Human Genetics* 4(4): 231-236.
- Wacowicz, E. (1991). 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.), 259-280, Elsevier, Amsterdam, Netherlands
- Wangikar, P.B., Dwivedi, P., Sinha, N., Sharma, A. K., Telang, A.G. (2005). Effects of aflatoxin B1 on embryo fetal development in rabbits. *Food and Chemical Toxicology*, 43, 607-615.
- Whitaker, T. B. (1997). Efficiency of the Blanching and Electronic Color Sorting Process for Reducing Aflatoxin in Raw Shelled Peanuts 1. *Peanut Science*, 24(1), 62-66.
- Whitaker, T. B. (2003). Standardization of mycotoxin sampling procedures: an urgent necessity. *Food Control*, 14(4), 233-237.

Bibliografia

- Whitaker, T. B., & Dickens, J. W. (1989). Simulation of aflatoxin testing plans for shelled peanuts in the United States and in the export market. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists International*, 72, 644-648.
- Whitaker, T.B.; Hagler, W.M.Jr.; Giesbrech, F.G.; Domer, J.W.; Dowell, F.E. & Cole, R.F. (1998). Estimating Aflatoxin in Farmers' Stock Peanut Lots by Measuring Aflatoxin in Various Peanut-Grade Components. *Journal of AOAC International*, Vol 81, No. 1, pp 61-67
- Whitaker, T.B.; Slate, A.; Adams, T.B.J.; Jacobs, M. & Gray, G. (2010). Correlation Between Aflatoxin Contamination and Various USDA Grade Categories of Shelled Almonds. *Journal of AOAC International*, Vol 93, No. 3, pp 943
- Williams, J., Phillips, D.T., Jolly, P.E., Stiles, J.K., Jolly, C.M., Aggaewal, D. (2004). Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. *American Journal of Clinical Nutrition*, 80, 1106-1122.
- Wilson, D. M. (1995). Management of mycotoxins in peanut. *Peanut Health Management. HA Melouk and FM Shokes, eds. American Phytopathological Society, St. Paul, MN*, 87-92.
- Wogan, G.N. (1999). Aflatoxins as a human carcinogen. *Hepatology*, 3, 573-575.

Bibliografia

- Wogan, N. (1966). Chemical nature and biological effects of the Aflatoxins. *Bacteriological Review*, Vol.30, No.2, pp.460-470
- Woodroof, J. G. (1983). Peanuts: production, processing products. Peanuts: production, processing products. 3^o ed. AVI Publ. Co., Westport, CT, pp. 232-238.
- Young, C.T., Shadel W.E. (1993) Comparison of drought-induced and mechanically-induced physical damage of tissue on the other surface of resting peanut seed using light and scanning electron microscopy. *Oléagineux*. 48(1): 35-39
- Zambettakis, C., F. Waliyar, A. Bockelee-Morvan and. O. de Pins (1976). Recherches sur la structure de tegument seminal de la graine d'arachide et son influence sur la pénétration de l'*Aspergillus flavus*. *Oléagineux*. 31(5): 219-228
- Zambettakis, C.H. (1975) Etude de la contamination de quelques variétés d'arachide par. *Aspergillus flavus*. *Oleagineux*, Paris, v.30, p.161-167
- Zheng, Z.M., Richard, J.L., Binder, J. (2006). A review of rapid methods for the analysis of mycotoxins. *Mycopathologia*, 161(5), 261-273.