

ESTUDIO SOBRE LA DETECCIÓN DE AFLATOXINA EN LA CASTAÑA (*Bertholetia Excelsa*), MEDIANTE FLUORESCENCIA BAJO LUZ ULTRAVIOLETA

Lic. Ricardo Forno¹, Lic. Alfonso Velarde²

¹*Carrera de Física—UMSA*

²*Instituto de Investigaciones Físicas—UMSA*

RESUMEN

Se analizan los espectros de emisión, bajo luz ultravioleta, de castañas con Aflatoxina y castañas sanas. Se comparan las relaciones de intensidad entre el pico de fluorescencia de $496nm$ y el pico reflejado de la fuente de $441nm$ para establecer un criterio que permita distinguir las castañas enfermas de las sanas.

1. INTRODUCCIÓN

Las aflatoxinas son metabolitos tóxicos producidos por dos tipos de hongos: *Aspergillus Flavus* y *Aspergillus Parasiticus*. Estos hongos se desarrollan en el suelo entre la vegetación en descomposición bajo condiciones de alta temperatura y humedad. Atacan a una gran variedad de granos y otros alimentos, entre ellos a la castaña [1].

En la actualidad, Bolivia es el primer exportador mundial de castaña [2], produce aproximadamente el 60% de la producción mundial. Por lo tanto, el control de calidad de la castaña que será exportada es de gran importancia económica.

El problema de la contaminación de la castaña por estos hongos y, por tanto su “infección” con Aflatoxina, es sumamente grave dado que la Aflatoxina es tóxica para el organismo humano y se ha comprobado, en pruebas con animales, que es cancerígena [3]. Existen estrictas regulaciones en el control del contenido de Aflatoxina en los productos alimenticios, especialmente de la Comunidad Europea, que ponen en serio riesgo las exportaciones de Castaña del país.

El método más directo para detectar la posible presencia de Aflatoxina es por fluorescencia bajo luz ultravioleta [4]. Este método es utilizado para separar manualmente las castañas infectadas de las sanas.

Las Aflatoxinas G son las más fluorescentes con un color verde azulado (cyan) cuando son expuestas a luz ultravioleta. Las Aflatoxinas B fluorescen con un color azul profundo. Aunque son más abundantes, son menos sensibles a la fluorescencia.

El empleo de la fluorescencia es un buen método para detectar la posible presencia de Aflatoxinas, sin embargo, no permite obtener indicadores cuantitativos del contenido de la sustancia. En efecto, aún con una buena técnica, muestras de fluorescencia brillante pueden contener menos Aflatoxina que muestras débilmente fluorescentes. De hecho, hay también sustancias en la Castaña que fluorescen bajo luz ultravioleta pero que no están asociadas con la Aflatoxina.

La fluorescencia en las muestras contaminadas no es estable y puede desaparecer en algunas semanas cuando

TABLA 1

Resultados de la calibración.

	Longitud de onda (nm)	N° de Canal
H_{α}	434,05	236
H_{β}	486,13	291
H_{γ}	656,28	459
$He - Ne$	632,80	441

éstas son expuestas continuamente a radiación visible o ultravioleta; sin embargo, la toxina no habrá desaparecido. Por lo tanto, las castañas que podrán ser analizadas mediante el método de fluorescencia deben ser frescas.

Por todo esto, es necesario aplicar otro tipo de pruebas para confirmar y cuantificar el contenido de Aflatoxina en muestras que hayan dado positivo con la prueba de la fluorescencia bajo luz ultravioleta.

El presente estudio busca caracterizar la fluorescencia de la Aflatoxina G con el propósito de poder desarrollar un método de identificación de las castañas infectadas.

2. INSTRUMENTO DE ANÁLISIS

Para realizar los diferentes análisis espectrales utilizamos el espectrofotómetro UV-VIS IIF1 [5], instrumento que fue desarrollado por el Instituto de Investigaciones Físicas de la Universidad Mayor de San Andrés. El UV-VIS IIF1 permite realizar un barrido desde los $200nm$ hasta los $850nm$ con pasos de $1nm$.

La calibración espectral del equipo se realizó empleando dos tipos de fuentes patrón de emisiones espectrales, correspondientes a un haz de rayos láser de He-Ne y una lámpara de vapor de Hidrógeno respectivamente [6].

La tabla 1 muestra las longitudes de onda y los canales correspondientes. En la figura 1 se muestra el ajuste lineal.

TABLA 2

Picos característicos de la fuente de radiación ultravioleta empleada para iluminar las muestras.

Color	Longitud de onda	Ancho a media altura
Ultravioleta	$\approx 325nm$	$\approx 10nm$
Ultravioleta—Violeta	$\approx 380nm$	$\approx 60nm$
Violeta azulado	$\approx 410nm$	$\approx 15nm$
Azul violeta	$\approx 443nm$	$\approx 10nm$
Rojo carmesí—infrarrojo	$\approx 750nm$	$\approx 50nm$
Infrarrojo	$\approx 816nm$	$\approx 4nm$

Calibración del Monocromador

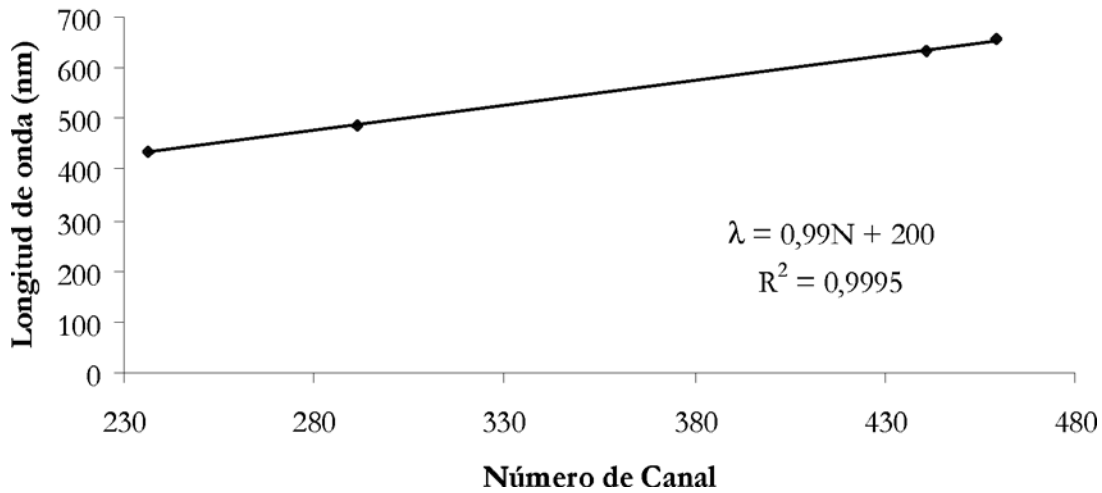


Figura 1. Ajuste lineal.

3. MÉTODO DE ANÁLISIS

Bajo la luz ultravioleta proporcionada por una lámpara, se observan dos tipos de fluorescencia en las castañas enfermas. Unas fluorescen con un color verde azulado brillante y otras, en cambio, presentan una fluorescencia de color naranja mate.

Para determinar los espectros de fluorescencia que se observan bajo luz ultravioleta en las castañas enfermas, se colocaron muestras de raspaduras de castaña con fluorescencia verde, naranja y también de castañas sanas, sobre un fondo de papel negro. Luego, se ilumina la muestra desde arriba con la lámpara de luz ultravioleta. Con la ayuda de una fibra óptica se lleva la luz de la muestra al espectrofotómetro y se obtiene, mediante un software diseñado para la captura de espectros, los datos del espectro en el computador. En la figura 2, se ilustra el dispositivo experimental.

4. ESPECTRO DE LA FUENTE DE LUZ ULTRAVIOLETA

La fuente de luz ultravioleta utilizada es la que usan productores bolivianos de castaña el momento de realizar

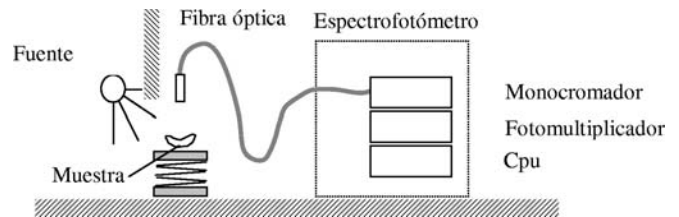


Figura 2. Esquema del equipo de medida.

la selección visual de castañas enfermas. Su espectro de emisión se muestra en la figura 3.

Realizando un análisis del espectro de emisión de la fuente UV se puede determinar un conjunto de picos característicos de la emisión de la fuente. En la tabla 2 se describen los mencionados picos y sus respectivas características.

5. ESPECTRO DEL FONDO. PAPEL NEGRO

Puesto que las muestras de castaña están soportadas en algún material y éste, a su vez, tiene sus propias ca-

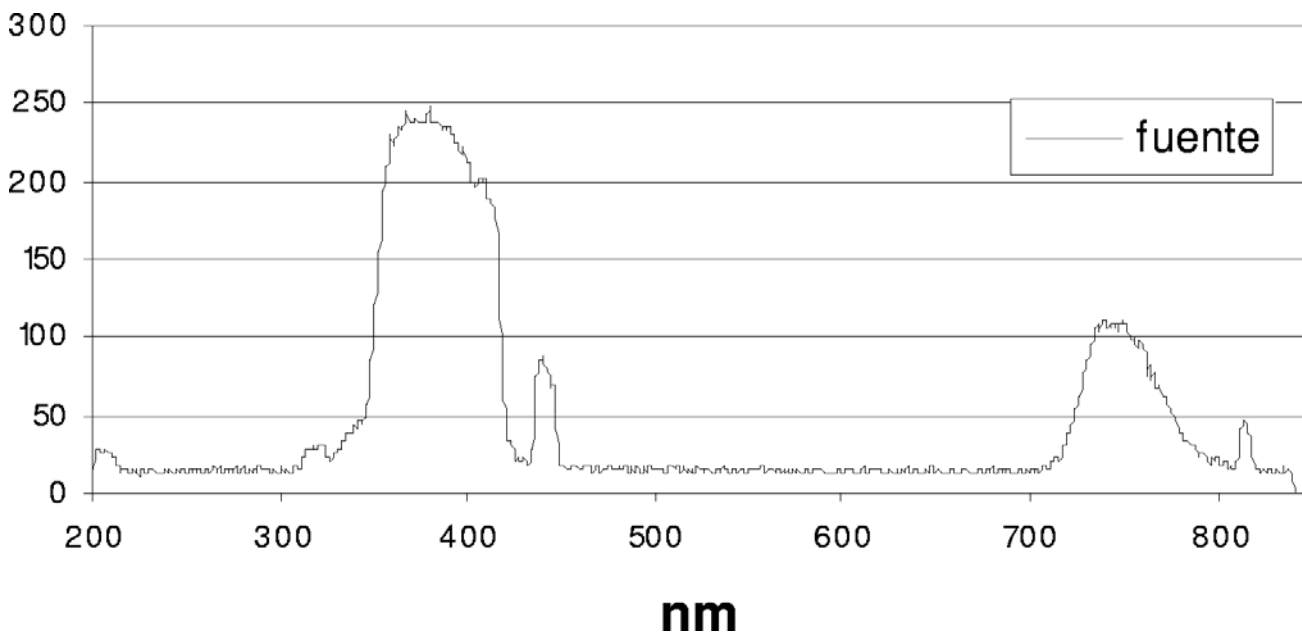


Figura 3. Espectro de emisión de la fuente ultravioleta.

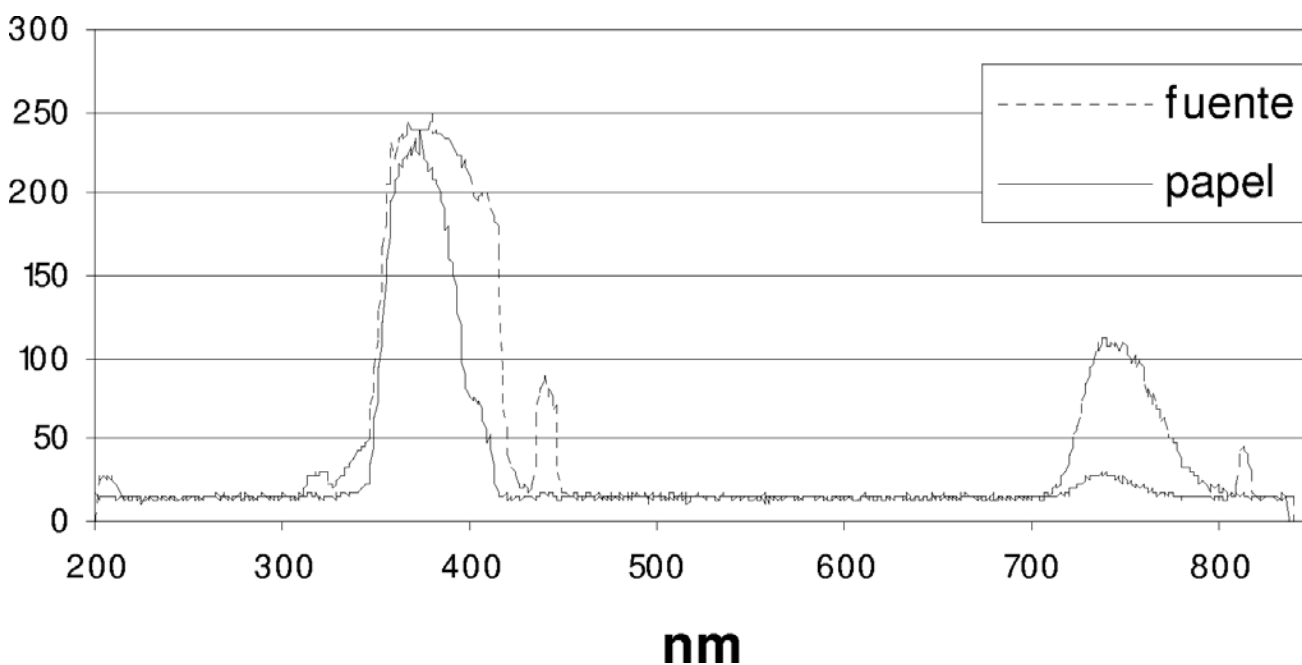


Figura 4. Espectro del papel negro bajo luz ultravioleta.

racterísticas espectrales de reflexión, es necesario realizar un análisis espectral de reflectancia del material con el cual se soporta las muestras (fondo). En la figura 3 se muestra, en línea continua, el espectro mencionado para nuestro soporte, que en nuestro caso se trataba de papel negro utilizado en los sobres para proteger placas de rayos X; adicionalmente y para fines de comparación, en la figura 4 se muestra el espectro de la fuente ultravioleta (línea punteada). Hay que aclarar que las intensidades no son directamente comparables. No se hizo ninguna calibración en intensidad para poder comparar la emisión

directa de la fuente con la reflexión del papel negro.

Como se puede observar, el papel negro absorbe todo el espectro visible pero refleja el ultravioleta ($\lambda < 410\text{nm}$), en particular se puede apreciar un pico centrado en $\approx 375\text{nm}$ y con un ancho a media altura de aproximadamente $\approx 40\text{nm}$ (sería conveniente buscar otro material negro de fondo que no tenga tanta reflectancia en el ultravioleta como muestra el papel negro que se utilizó).

En la región infrarroja se ve que el pico de la fuente es absorbido casi en su totalidad.

TABLA 3

Picos espectrales correspondientes a la fluorescencia verde de la castaña.

	Color	Longitud de onda	Ancho a media altura
1	Ultravioleta	$\approx 354nm$	$\approx 20nm$
2	Violeta	$\approx 410nm$	$\approx 30nm$
3	Azul ultramar	$\approx 443nm$	$\approx 20nm$
4	Verde azulado (cyan)	$\approx 500nm$	$\approx 40nm$
5	Rojo carmín	$\approx 744nm$	$\approx 30nm$

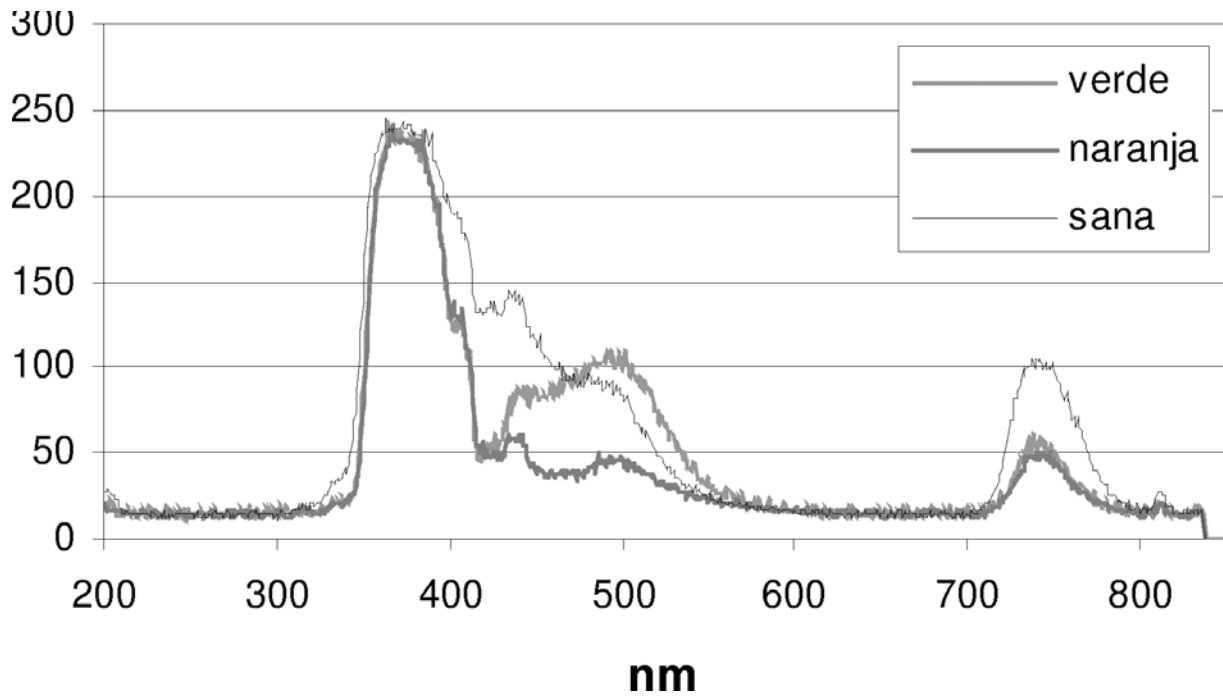


Figura 5. Espectros de castañas infectadas con fluorescencia verde, naranja y sana.

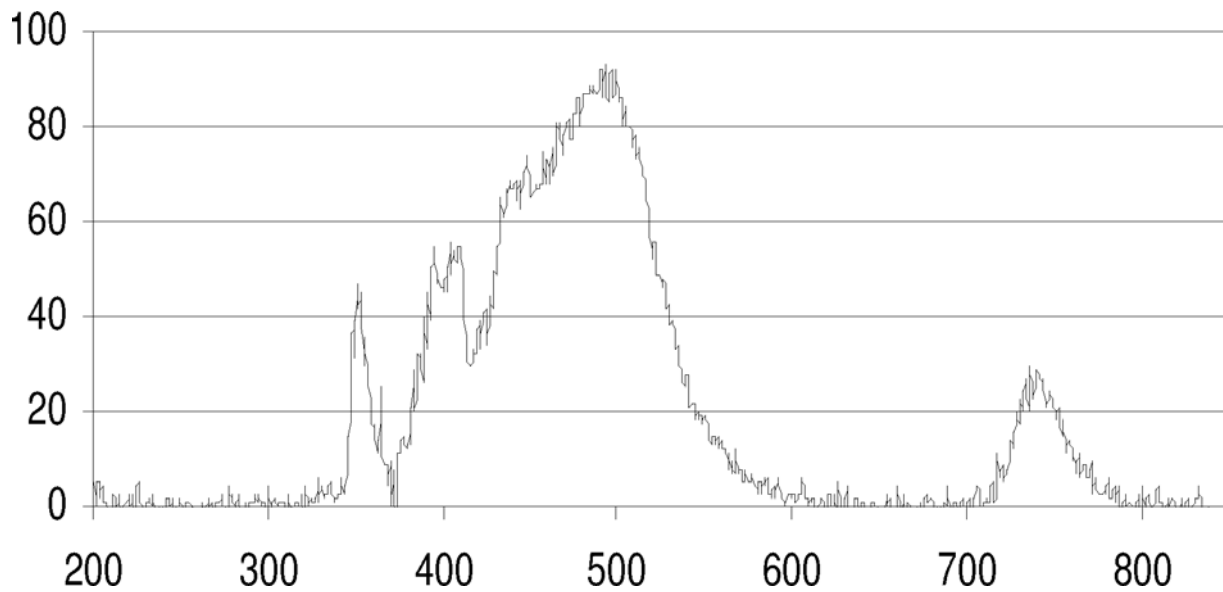


Figura 6. Espectro de castaña infectada con fluorescencia verde menos espectro del fondo.

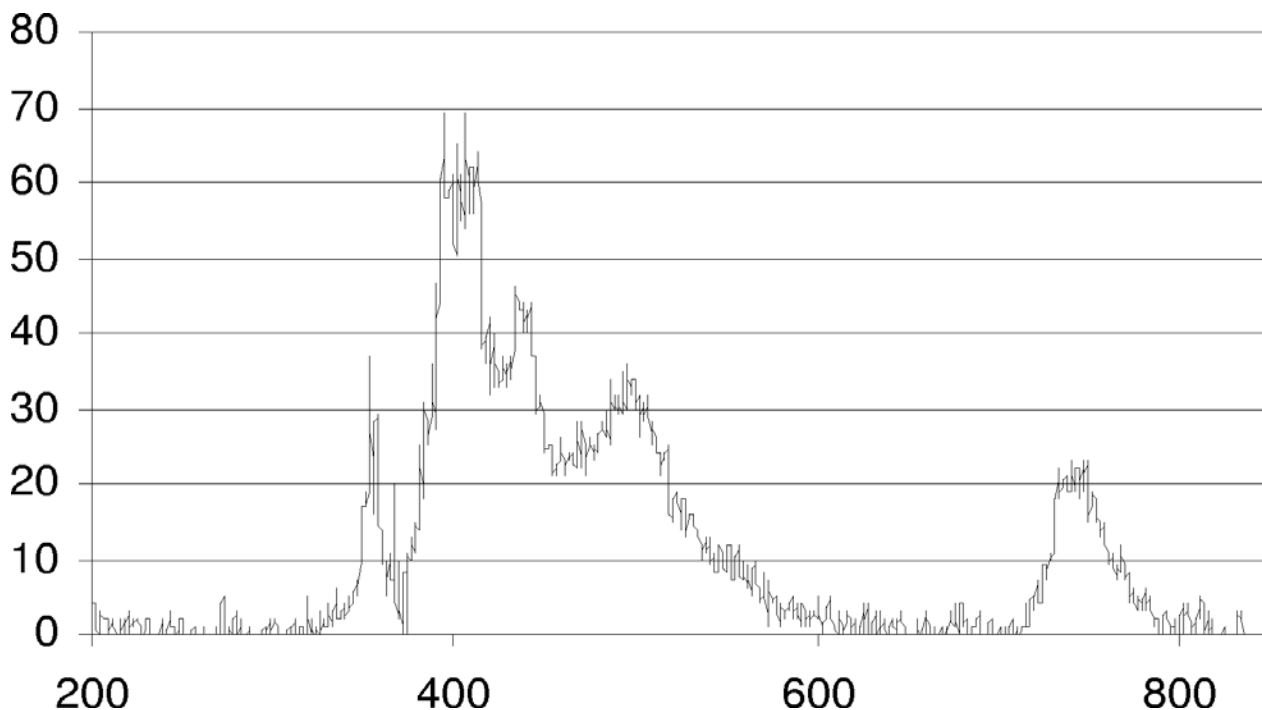


Figura 7. Espectro de castaña infectada con fluorescencia naranja menos espectro del fondo.

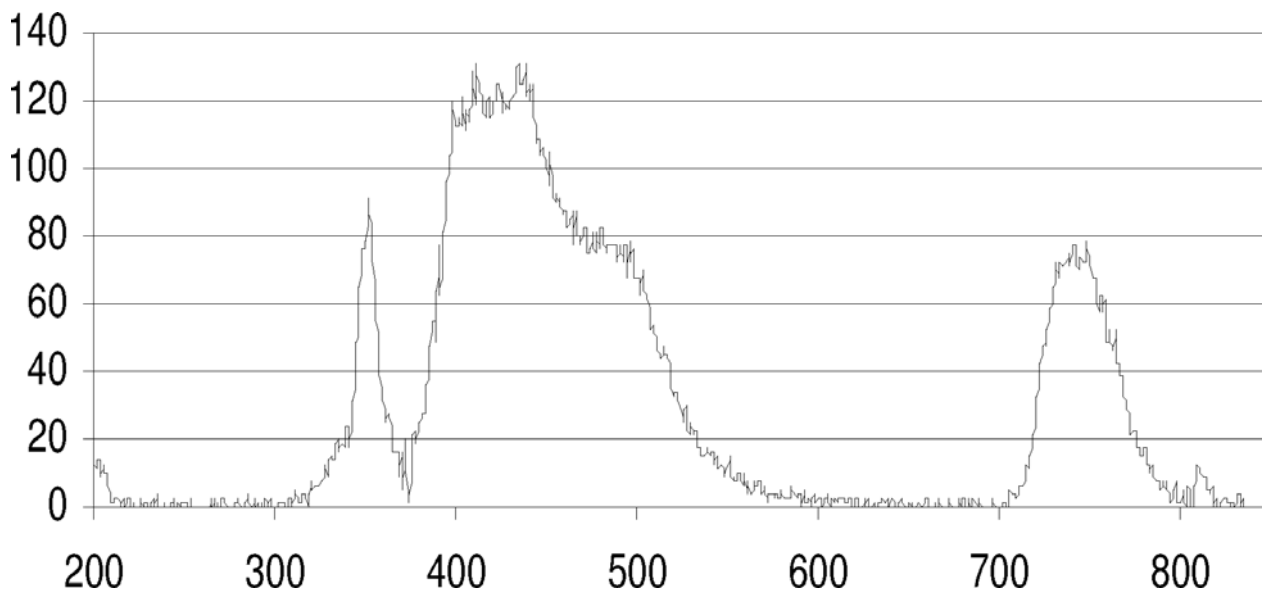


Figura 8. Espectro de castaña sana menos espectro del fondo.

6. ESPECTROS DE FLUORESCENCIA DE MUESTRAS INFECTADAS Y SANAS

Como se mencionó, se observaron, bajo las condiciones experimentales descritas, dos tipos de fluorescencia, la correspondiente a un color verde azulado (cyan) y la correspondiente a un anaranjado. En la figura 5 se muestran tanto los espectros característicos de muestras enfermas como el correspondiente a una muestra de castaña sana. Las diferencias de los espectros mencionados son evidentes, sin embargo, es importante notar que la tarea de discriminar una fluorescencia de la otra o, simplemente

discriminar fluorescencia debida a la una muestra sana de una enferma, no parece ser fácil.

Para realizar un análisis más profundo de los espectros, restamos el espectro correspondiente a la reflexión del fondo, obteniendo los espectros de las figuras 6, 7 y 8.

6.1. Espectro de fluorescencia verde

Al eliminar la contribución del fondo en el espectro correspondiente a una muestra enferma, que presenta fluorescencia verde, se obtiene el espectro mostrado en

TABLA 4
Resultados del ajuste.

	Longitud de onda [nm]	Desviación estándar [nm]	Ancho a media altura [nm]
Pico reflejado	441	4	7
Pico de fluorescencia	496	21	35

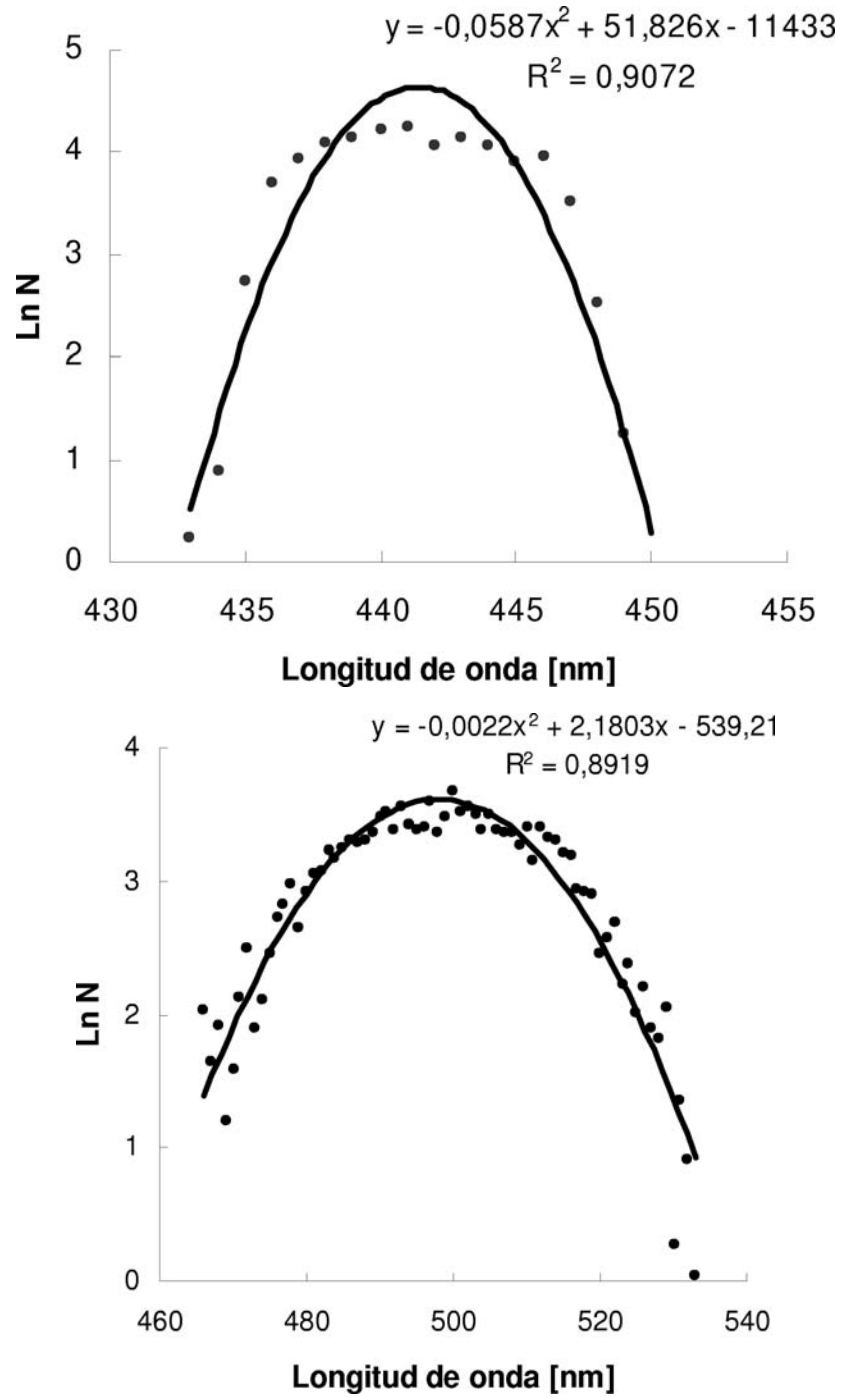


Figura 9. Ajuste al pico de 443nm (arriba) y al de 500nm (abajo).

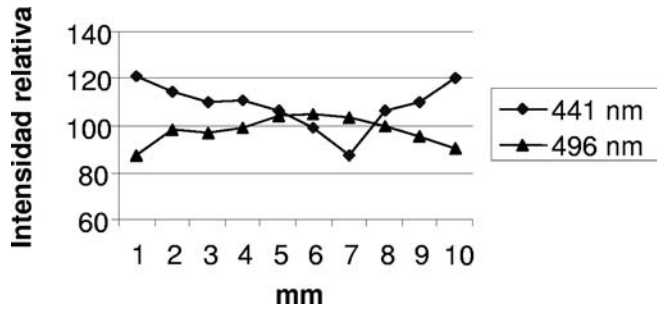


Figura 10. Rastreo sobre una mancha fluorescente verde.

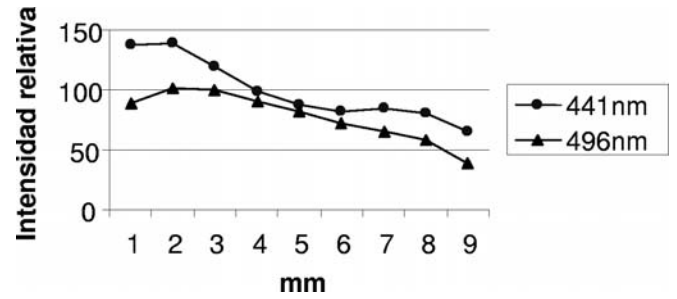


Figura 11. Rastreo sobre una mancha fluorescente naranja.

la figura 6.

Un análisis del espectro mostrado en la figura 6 nos permite encontrar particularidades espectrales de la fluorescencia verde. En la tabla 3 se observan un listado de los picos de interés (designadas por 1, 2, 3, 4 y 5).

Los picos 1, 2, 3 y 5 corresponden a reflejos de la fuente sobre la muestra. Sin embargo, el pico que no existe en la fuente y que aquí aparece, por tanto la fluorescencia, es la línea 4 de color verde azulado (cyan).

6.2. Espectro de fluorescencia naranja

Repitiendo el análisis para el caso de la fluorescencia naranja se observan exactamente los mismos picos, sólo que ahora, la línea 4 que corresponde a la fluorescencia, es mucho menos intensa al compararla con el caso anterior y es más pequeña respecto a los otros picos. La fluorescencia anaranjada no existe, se ve así en virtud de la combinación de las líneas 4 (cyan) y 5 (Carmín), cuyas intensidades son ahora comparables y que combinadas dan el color naranja.

Por lo tanto, el fenómeno de la fluorescencia que se observa en las castañas presumiblemente enfermas, bajo luz ultravioleta, corresponde a un verde azulado o cyan de $\approx 500nm$ (figura 7).

6.3. Espectro de castañas sanas

Nuevamente se repite el análisis, en este caso para castañas sanas, pudiendo observar que el pico correspondiente a los $\approx 500nm$ también existe, aunque no tan diferenciado, dentro del espectro, como en los casos anteriores (figura 8).

7. AJUSTE A LOS PICOS DE INTERÉS

Como se puede ver en la figura 5, la relación entre los picos correspondientes a la fluorescencia ($\approx 500nm$) y $\approx 443nm$, es diferente tanto para la fluorescencia verde, como para la naranja y como para las castañas sanas.

Hemos de concentrar nuestra atención en estos picos haciendo el ajuste de una función normal a los mismos para estimar mejor sus longitudes de onda.

En la figura 9 se muestran estos ajustes.

De acuerdo al ajuste, nuestros resultados son mostrados en la tabla 4.

De los resultados del ajuste se obtiene que:

Pico de fluorescencia: $(496 \pm 9)nm$

Pico reflejado: $(441 \pm 1)nm$

8. ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS INTENSIDADES RELATIVAS DE LA FLUORESCENCIA DE 496nm RESPECTO A LA LÍNEA DE 441nm PROVENIENTE DE LA FUENTE

En el caso de la fluorescencia verde, el pico de 496nm es notoriamente mayor que el de 441nm. En la figura 10 se muestra un rastreo, milímetro a milímetro, realizado sobre una castaña infectada monitoreando las longitudes de onda de interés. Como se puede apreciar, al pasar sobre la mancha fluorescente, el pico de 496nm es mayor que el de 441nm, al contrario de lo que ocurre cuando no se enfoca la mancha fluorescente, es decir, cuando se está observando la parte sana de la castaña.

Haciendo el mismo rastreo, pero para el caso de la fluorescencia naranja, ambos picos son aproximadamente iguales como se muestra en la figura 11.

En la figura 12 se muestra el resultado de graficar la integral del pico centrado en 496nm vs. la integral del pico de 441nm para varias castañas sanas y para varias enfermas con fluorescencia verde.

Vemos que haciendo un ajuste lineal sobre las castañas sanas, se obtiene una regresión razonablemente buena con un coeficiente de regresión lineal $R = 0,883$ y que las castañas infectadas con fluorescencia verde quedan bien separadas, todas sobre una desviación estándar por encima del ajuste lineal.

En la figura 13 se muestra el mismo análisis pero comparando castañas sanas con enfermas con fluorescencia naranja.

En este caso, algunas de las infectadas con fluorescencia naranja quedan sobre la misma recta de regresión de las sanas, sin embargo, debido a que tanto la amplitud de la línea de 496nm como la de 441nm son ambas relativamente pequeñas, como se ve en el espectro de a figura 4, se ubican en la parte baja de la recta de regresión.

La línea vertical que se muestra marca el límite de la media de las medidas de 441nm menos dos desviaciones estándar.

9. CONCLUSIONES

Mediante la comparación de los espectros de emisión de las castañas infectadas, tanto las que fluorescen verde o las que lo hacen en naranja, con el de las sanas,

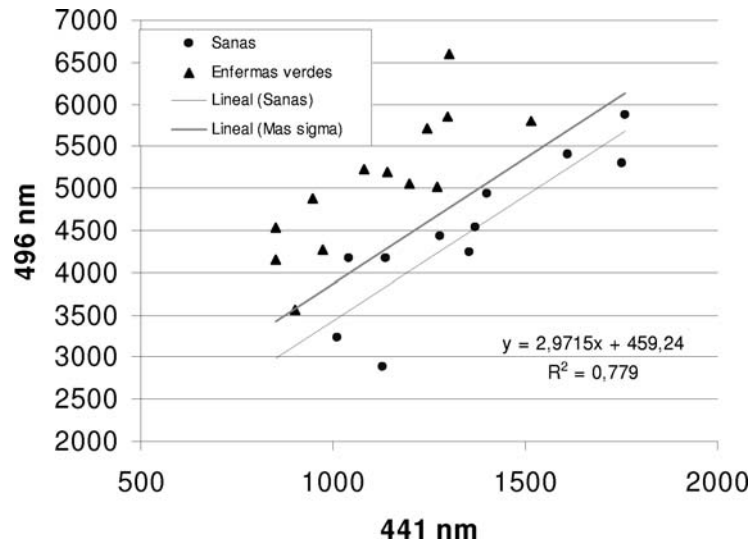


Figura 12. Comparación de la relación entre las integrales de los picos de 496nm (fluorescencia) y 441nm (reflejo de la fuente) para castañas infectadas con fluorescencia verde y castañas sanas.

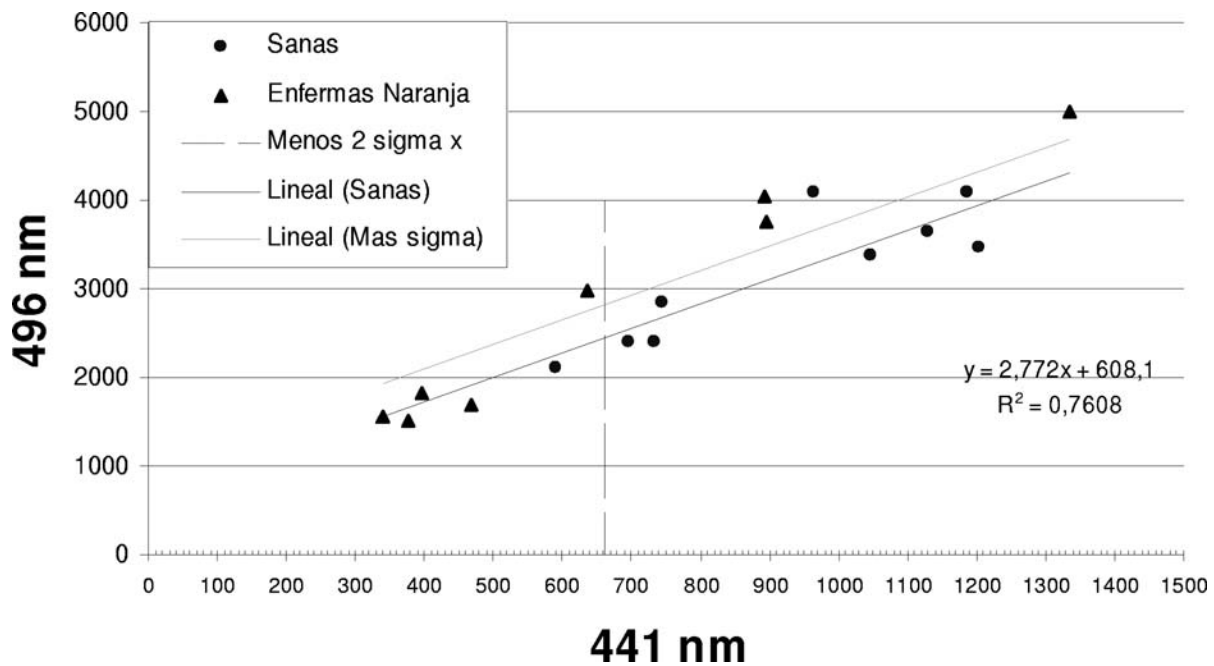


Figura 13. Comparación entre las relaciones de las integrales de los picos de 500nm (fluorescencia) y 443nm (reflejo de la fuente) para castañas infectadas con fluorescencia naranja y castañas sanas.

concluimos que es posible discriminar las enfermas de las sanas estableciendo que todas aquellas cuya relación entre la línea de 441nm y la de 496nm quede fuera del límite marcado por una desviación estándar por encima de la recta de regresión lineal o por debajo de dos desviaciones estándar respecto a la media de las intensidades de la línea de 441nm, pueden considerarse infectadas.

REFERENCIAS

- [1] Ref: www.micotoxinas.com.br/aflatoxina.htm
 [2] PROGRAMA DE NACIONES UNIDAS PARA EL

DESARROLLO (PNUD) Bolivia, Informes; 2004.

Ref: <http://PNUD.bo/Informes/InfRegionales/NorteAmazónico/PANDO-4.PDF>.

- [3] *Determinación de Aflatoxinas en Alimentos de Consumo Infantil*, Santa Cruz Sánchez et.al. Ref: <http://www.ciad.mx/boletin/mar-abr-03/resumen3.pdf>.
 [4] Ref: <http://www.plantpathology.tamu.edu/aflatoxin/detection.htm>
 [5] *Detección de Luz Ultravioleta*, Pedro Miranda et.al., Revista Boliviana de Física No.3, Septiembre 1997.
 [6] *Reporte calibración monocromador*, A. Pecka., No publicado.