

comisión del codex alimentarius



ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES
UNIDAS PARA LA AGRICULTURA
Y LA ALIMENTACIÓN

ORGANIZACIÓN
MUNDIAL
DE LA SALUD



S

OFICINA CONJUNTA: Viale delle Terme di Caracalla 00153 ROMA Tel: 39 06 57051 www.codexalimentarius.net Email: codex@fao.org Facsimile: 39 06 5705 4593

Tema 6 del programa

CX/CF 10/4/6
Diciembre de 2009

PROGRAMA CONJUNTO FAO/OMS SOBRE NORMAS ALIMENTARIAS

COMITÉ DEL CODEX SOBRE CONTAMINANTES DE LOS ALIMENTOS

4ª reunión

Izmir (Turquía), 26 – 30 de abril de 2010

ANTEPROYECTOS DE NIVELES MÁXIMOS PARA EL CONTENIDO TOTAL DE AFLATOXINAS EN LAS NUECES DEL BRASIL (N11-2008)

Se invita a los miembros y observadores del Codex que deseen presentar observaciones en el Trámite 3 sobre el tema anterior (**anexo I y anexo II a este documento**), incluyendo posibles consecuencias para sus intereses económicos, a que lo hagan de conformidad con el *Procedimiento uniforme para la elaboración de normas y textos afines del Codex* (Manual de Procedimiento de la Comisión del Codex Alimentarius) antes del **28 de febrero de 2010**. Las observaciones se dirigirán:

a:

Sra. Tanja Åkesson
Punto de contacto del Codex
Ministerio de Agricultura, Naturaleza y Calidad
Alimentaria
Apartado de correos 20401
2500 EK La Haya (Países Bajos)
Tel.: +31 70 378.4045
Fax.: +31 70 378.6141
Correo electrónico: t.z.j.akesson@minlnv.nl –
preferentemente-

con copia al:

Secretario, Comisión del Codex Alimentarius,
Programa Conjunto FAO/OMS sobre Normas
Alimentarias,
Viale delle Terme di Caracalla,
00153 Roma (Italia)
Fax: +39 (06) 5705 4593
Correo electrónico: codex@fao.org -
preferentemente

INFORMACIÓN GENERAL

1. En la 3ª reunión del CCCF la delegación de Brasil presentó el documento de debate que examinaba la presencia de aflatoxinas en las nueces del Brasil, teniendo en cuenta la evaluación efectuada por el JECFA en su 68ª reunión del impacto a través de la ingestión de alimentos de límites hipotéticos distintos en el contenido total de aflatoxinas (AFT) en las nueces de árbol, incluidas las nueces del Brasil, los resultados del Proyecto Conforcast (2005-2009) presentado por el Gobierno de Brasil y niveles máximos propuestos, así como un plan de muestreo. Como consecuencia de dichas consideraciones se propuso establecer cuatro categorías de productos y sus NM correspondientes: nueces del Brasil sin cáscara listas para el consumo, nueces del Brasil sin cáscara destinadas a ulterior elaboración; nueces del Brasil con cáscara listas para el consumo y nueces del Brasil con cáscara destinadas a ulterior elaboración.
2. La 3ª reunión decidió remitir el anteproyecto de documento al Trámite 2 para que fuera redactado de nuevo por la delegación de Brasil, lo distribuyera para recabar observaciones en el Trámite 3 y se sometiese a consideración en la 4ª reunión del Comité¹.
3. El presente documento ha sido preparado por Brasil con contribuciones de la Comunidad Europea,

¹ ALINORM 09/32/41, párrs. 68 - 78

Suecia, Reino Unido y Estados Unidos de América.

4. En la preparación del documento se manifestó que el NM debía establecerse en base al uso a que están destinadas las nueces (listas para el consumo o para ulterior elaboración), sin distinguir entre nueces sin cáscara o con cáscara. Brasil desea hacer hincapié en que las nueces del Brasil son un caso especial y sigue proponiendo un NM aparte para las nueces del Brasil con cáscara.

5. Además se planteó el uso de niveles de aflatoxinas en nueces podridas en el cálculo del factor de procesado (FP). Brasil mantiene que los consumidores jamás consumirán nueces podridas (son oscuras y tienen un sabor horrible), y por tanto nunca estarán expuestos a niveles muy elevados de aflatoxinas, pero algunos países opinan que la carga de seleccionar las nueces buenas no debería dejarse para el consumidor.

6. Es importante señalar las características de las nueces del Brasil. En el país se han puesto en marcha muchas iniciativas para implementar buenas prácticas de recolección. No obstante, controlar por completo la cadena de producción-recolección es imposible debido a las características del bosque del Amazonas. Por otra parte, en la actualidad no se dispone de un buen procedimiento para clasificar las nueces del Brasil con cáscara buenas y malas.

7. Se ha señalado que al mercado se lleva sólo una parte limitada de todas las nueces del Brasil recolectadas como nueces del Brasil con cáscara listas para el consumo. No obstante, ese mercado existe y su eliminación tendría un impacto económico en la población amazónica sin dar protección adicional a los consumidores. Además, el proyecto Conforcast se efectuó con lotes de nueces del Brasil con cáscara destinadas al comercio.

8. En el anexo I se presentan los anteproyectos de niveles máximos para el contenido total de aflatoxinas en las nueces del Brasil, en el anexo II los planes de muestreo asociados y en el anexo III información general de apoyo de los niveles propuestos.

ANEXO I

Se recomienda utilizar los siguientes NM de contenido total de aflatoxinas en la nuez del Brasil en el comercio internacional:

Producto nuez del Brasil	NM AFT, µg/kg
Sin cáscara, lista para el consumo	10
Sin cáscara, destinada a ulterior elaboración	15
Con cáscara	20

teniendo en cuenta:

- la existencia del mercado internacional tanto para las nueces del Brasil sin cáscara como con cáscara y la necesidad de establecer NM para ambos productos a fin de facilitar el comercio internacional;
- el estadio tecnológico actual del procesado de nueces del Brasil con cáscara que no permite la separación completa de nueces podridas;
- los datos de incidencia de aflatoxinas en las nueces del Brasil evaluados en este documento, incluidos los datos comunicados por el proyecto Conforcast para nueces del Brasil con cáscara, que mostraban el impacto de las nueces podridas en la contaminación por AFT en las nueces del Brasil con cáscara.

ANEXO II**PLAN DE MUESTREO PARA EL CONTENIDO TOTAL DE AFLATOXINAS EN LAS NUECES DEL BRASIL**

Este anexo formará parte de los PLANES DE MUESTREO PARA LA CONTAMINACIÓN POR AFLATOXINAS EN LAS NUECES DE ÁRBOL LISTAS PARA EL CONSUMO Y NUECES DE ÁRBOL DESTINADAS A ULTERIOR ELABORACIÓN: ALMENDRAS, AVELLANAS Y PISTACHOS (CODEX STAN 193-1995, lista I, anexo 2). En él se abordan los aspectos relacionados con las nueces del Brasil que son diferentes de las demás nueces.

CONSIDERACIONES SOBRE EL DISEÑO DEL PLAN DE MUESTREO

Las nueces del Brasil se pueden comercializar como “nueces del Brasil sin cáscara listas para el consumo”, “nueces del Brasil sin cáscara destinadas a ulterior elaboración” y “nueces del Brasil con cáscara”, que se definen a continuación. En consecuencia, se proponen niveles máximos y planes de muestreo para todos los tipos comerciales de nueces del Brasil.

Nueces del Brasil sin cáscara listas para el consumo: son las nueces sin cáscara (sólo el grano) aptas para comercialización directa al consumidor final.

Nueces del Brasil sin cáscara destinadas a ulterior elaboración: son las nueces sin cáscara (sólo el grano) que se van a someter a un procedimiento de selección para reducir los niveles de aflatoxinas antes de comercializarse al consumidor final.

Nueces del Brasil con cáscara: son las nueces con cáscara que se pueden comercializar directamente al consumidor final y que se van a someter a un procedimiento de clasificación y/o eliminación de la cáscara para reducir los niveles de aflatoxinas antes de comercializarlas al consumidor final.

Los lotes de nueces del Brasil con cáscara tienen siempre nueces podridas debido a la característica extractivista de las nueces en el bosque tropical y los aspectos tecnológicos de procesado. Los resultados del proyecto Conforcast indican que la separación de las nueces podridas de la muestra agregada (muestra analítica) antes del análisis podían ofrecer una estimación de la contaminación por AFT presente en las nueces buenas, tal como se discute en los párrafos 52-57.

PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS Y NIVELES MÁXIMOS PARA LAS AFLATOXINASNueces del Brasil sin cáscara destinadas a ulterior elaboración

Nivel máximo: 15 µg/kg contenido total de aflatoxinas

Número de muestras de laboratorio: 1

Tamaño de la muestra de laboratorio: 20 kg

Preparación de la muestra: las muestras (GRANOS) se muelen finamente y se mezclan mediante un procedimiento, p.ej. papilla con molino tipo turrax que se ha demostrado que da la varianza más baja en la preparación de la muestra.

Porción analítica: 100 g de porción analítica (papilla: 50 g de granos: 50 g de agua)

Regla para las decisiones: si el resultado del análisis de aflatoxinas es inferior o igual a 15 µg/kg de contenido total de aflatoxinas, el lote se acepta; de lo contrario se rechaza.

La curva de operación característica que describe el rendimiento del plan de muestreo para las nueces del Brasil sin cáscara destinadas a ulterior elaboración se presenta en el anexo II.

Nueces del Brasil sin cáscara listas para el consumo:

Nivel máximo: 10 µg/kg contenido total de aflatoxinas

Número de muestras de laboratorio: 2

Tamaño de la muestra de laboratorio: 10 kg

Preparación de la muestra: las muestras (GRANOS) se muelen finamente y se mezclan mediante un procedimiento, p.ej. papilla con molino tipo turrax que se ha demostrado que da la varianza más baja en la preparación de la muestra.

Porción analítica: 100 g de porción analítica (papilla: 50 g de granos: 50 g de agua)

Regla para las decisiones: si el resultado del análisis de aflatoxinas es inferior o igual a 10 ng/g de contenido total de aflatoxinas en ambas porciones analíticas, el lote se acepta; de lo contrario se rechaza.

La curva de operación característica que describe el rendimiento del plan de muestreo para las nueces del Brasil sin cáscara listas para el consumo se presenta en el anexo a estos planes de muestreo.

Nueces del Brasil con cáscara

Nivel máximo: 20 µg/kg contenido total de aflatoxinas

Número de muestras de laboratorio: 1

Tamaño de la muestra de laboratorio: 20 kg (nueces del Brasil con cáscara)

Preparación de la muestra: las muestras se muelen finamente y se mezclan mediante un procedimiento, p.ej. papilla con molino tipo turrax que se ha demostrado que da la varianza más baja en la preparación de la muestra.

Porción analítica: 100 g de porción analítica (papilla: 50 g de granos: 50 g de agua)

En el caso de las "nueces del Brasil con cáscara", la porción analítica puede ser la nuez entera, porque muchas veces no es practicable eliminar la parte no comestible (cáscara). El % de granos: cáscara es 0,5.

Regla para las decisiones: si el resultado del análisis es inferior o igual a 20 µg/kg de contenido total de aflatoxinas, el lote se acepta; de lo contrario se rechaza.

La curva de operación característica que describe el rendimiento del plan de muestreo para las nueces del Brasil con cáscara destinadas a ulterior elaboración se presenta en el anexo II.

Anexo

Curvas de operación características que describen el rendimiento de los proyectos de planes de muestreo para aflatoxinas en las nueces del Brasil

En cada lote la distribución observada entre los resultados de aflatoxinas (total de aflatoxinas) en las 40 muestras de nueces del Brasil sin cáscara se comparó con tres distribuciones teóricas de asimetría positiva, la distribución binomial negativa, distribución gamma compuesta y la distribución teórica lognormal. Se utilizó el método divergente de la potencia para medir la bondad de ajuste entre las distribuciones observadas y las teóricas. Se escogió la distribución binomial negativa para simular la distribución entre los resultados analíticos de las muestras para una determinada concentración en los lotes y diseño de las muestras. La distribución binomial negativa se escogió también para simular la distribución entre los resultados analíticos de las muestras para las almendras, avellanas y pistachos.

Una representación gráfica de las probabilidades de aceptación versus la concentración en el lote se denomina una curva de operación (CO) característica. La forma de la curva CO se define únicamente por el diseño del plan de muestreo. Un plan de muestreo se define por un límite de aceptación/rechazo y el procedimiento de análisis de las aflatoxinas. Un procedimiento de análisis de las aflatoxinas se define por el número y el tamaño de las muestras, el método de preparación de las muestras (tamaño de las partículas, tipo de molino y tamaño de la porción analítica) y el procedimiento analítico. La curva CO se utiliza para predecir los lotes buenos rechazados (riesgo del vendedor o del exportador) y los lotes malos aceptados (riesgo del comprador o del importador).

Nueces del Brasil sin cáscara

En el cuadro 1 se presenta el cálculo de las varianzas asociadas a cada fase del plan de muestreo para las nueces del Brasil sin cáscara.

Cuadro 1. Varianzas asociadas con las fases del plan de muestreo para las nueces del Brasil sin cáscara

Datos utilizados para el análisis de la varianza	Varianza del muestreo	Varianza de la preparación de las muestras	Varianza analítica	Total varianzas
Nuez del Brasil sin cáscara Del estudio sin cáscara Total aflatoxinas, lotes < 0,39 omitidos, Sólo granos 15 lotes, muestra de 10 kg, 185 granos/kg	$s_s^2 = 4,8616C^{1,889}$ R=0,80	$s_{ss}^2 = 0,0306C^{0,632}$ R = 0,24	Experimental $s_a^2 = 0,0164C^{1,117}$ R = 0,43 FAPAS $s_a^2 = 0,0484C^{2,0}$	$s_t^2 = 5,464C^{1,850}$ R = 0,73

Nueces del Brasil sin cáscara destinadas a ulterior elaboración

En el gráfico 1 se presenta la curva de operación característica que describe el rendimiento del plan de muestreo de las aflatoxinas en las nueces del Brasil sin cáscara destinadas a ulterior elaboración, utilizando una sola muestra de laboratorio de 20 kg y un nivel máximo de 15 μ /kg de contenido total de aflatoxinas. Las curvas de operación características reflejan la incertidumbre asociada a una muestra de laboratorio de 20 kg de nueces sin cáscara, molino tipo turrax, porción analítica de 100 g (papilla: 50 g de granos: 50 g de agua), y cuantificación de las aflatoxinas en la porción analítica mediante HPLC - FL con derivatización post-columna con Kobra Cell.

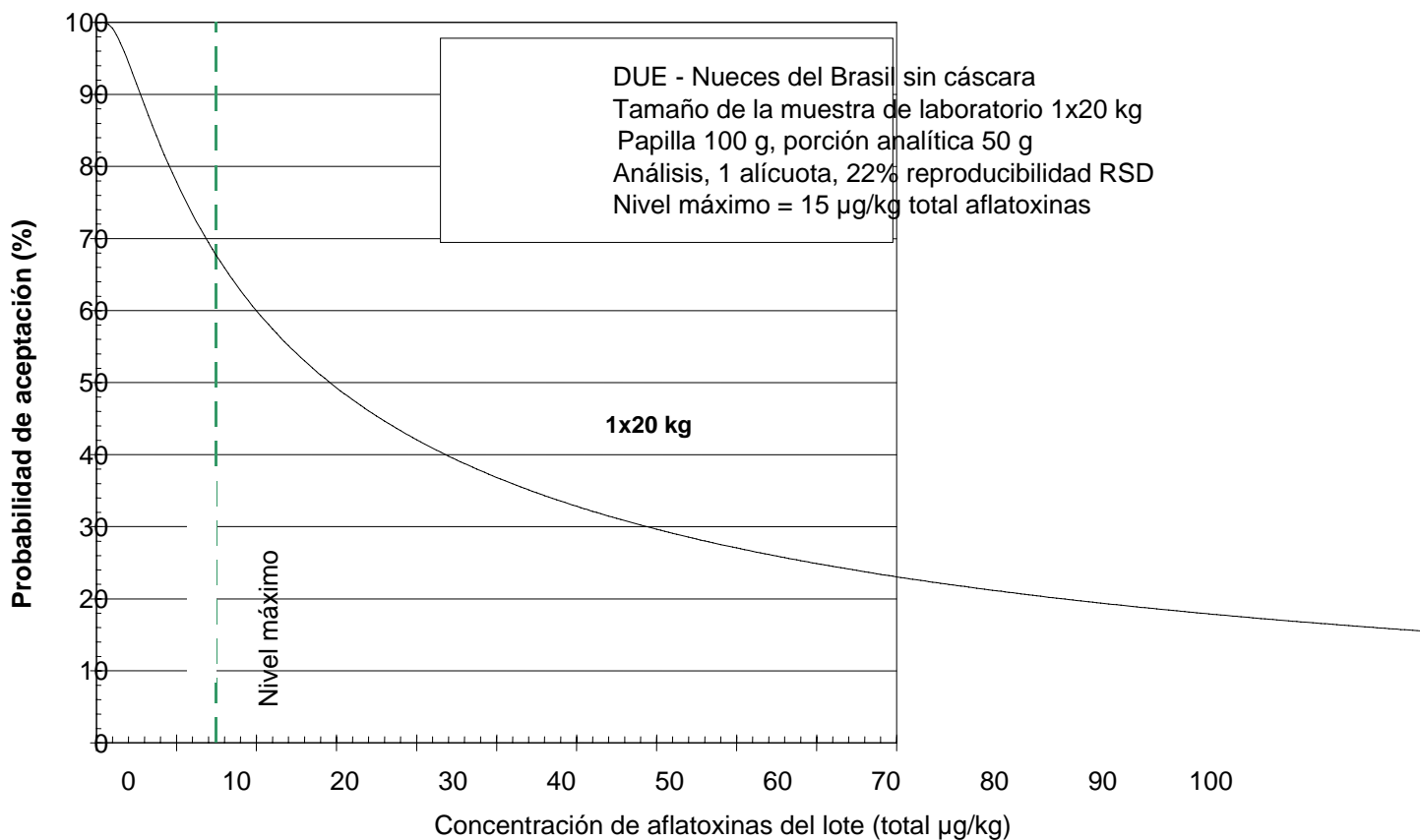


Gráfico 1. Curva de operación de nueces del Brasil sin cáscara destinadas a ulterior elaboración (DUE) con un nivel máximo de 15 µg/kg

En el gráfico 2 se presentan las curvas de operación características que describen el rendimiento del plan de muestreo de las aflatoxinas para las nueces del Brasil sin cáscara listas para el consumo, utilizando dos muestras de laboratorio de 10 kg cada una y un nivel máximo de 10 µg/kg de contenido total de aflatoxinas, molino tipo turrax, porción analítica de 100 g (papilla: 50 g de granos: 50 g de agua), y cuantificación de las aflatoxinas en la porción analítica mediante HPLC - FL con derivatización post-columna con Kobra Cell.

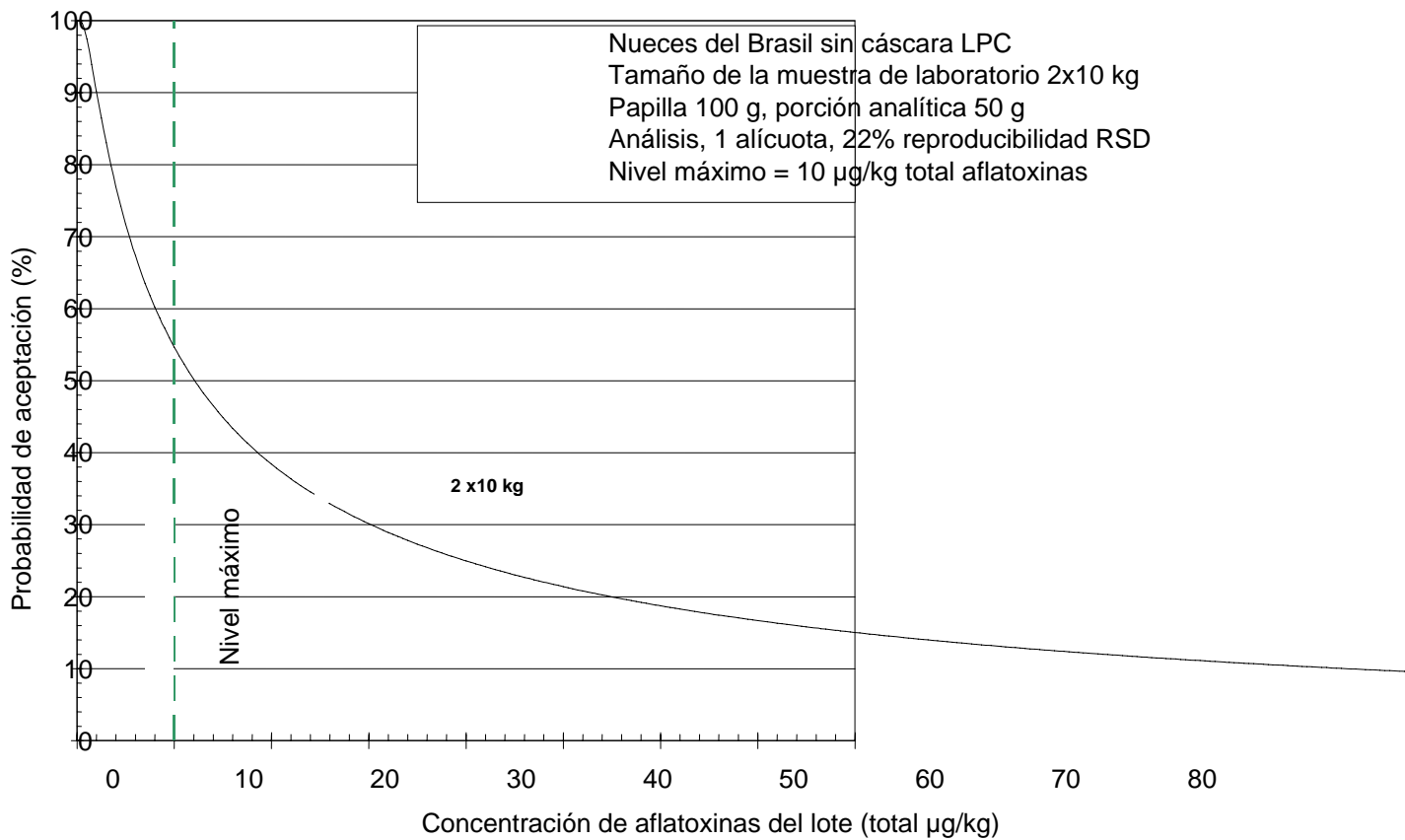


Gráfico 2. Curva de operación de nueces del Brasil sin cáscara listas para el consumo (LPC) con un nivel máximo de 10 µg/kg

Nueces del Brasil con cáscara

En el cuadro 2 se presenta el cálculo de las varianzas asociadas a cada fase del plan de muestreo para las nueces del Brasil con cáscara

Cuadro 2. Varianzas asociadas con las fases del plan de muestreo para las nueces del Brasil con cáscara

Datos utilizados para el análisis de la varianza	Varianza del muestreo	Varianza de la preparación de las muestras	Varianza analítica	Total de las varianzas
Nuez del Brasil con cáscara (masa de la cáscara corregida) Del estudio con cáscara Total de aflatoxinas Todos los granos (buenos y podridos) 10 kg de granos (20 kg de nueces del Brasil con cáscara)	$s_s^2 = 0,797C^{1,898}$ *calculado desde el total	$s_{ss}^2 = 0,0306C^{0,632}$ R = 0,24	experimental $s_a^2 = 0,0164C^{1,117}$ R = 0,43 FAPAS $s_a^2 = 0,0484C^{2,0}$	$s_t^2 = 0,8219C^{1,8913}$ R = 0,88

Curva de operación característica de las nueces del Brasil con cáscara

En el gráfico 3 se muestra la curva de operación característica que describe el rendimiento del plan de muestro de aflatoxinas para las nueces del Brasil en cáscara destinadas a ulterior elaboración, utilizando una sola muestra de laboratorio de 20 kg y un nivel máximo de 20 µ/g de contenido total de aflatoxinas. Las curvas de operación características reflejan la incertidumbre asociada a una muestra de laboratorio de 20 kg de nueces con cáscara, molino tipo turrax, porción analítica de 100 g (papilla: 50 g de granos: 50 g de agua), y la cuantificación de las aflatoxinas en la porción analítica mediante HPLC - FL con derivatización post-columna con Kobra Cell.

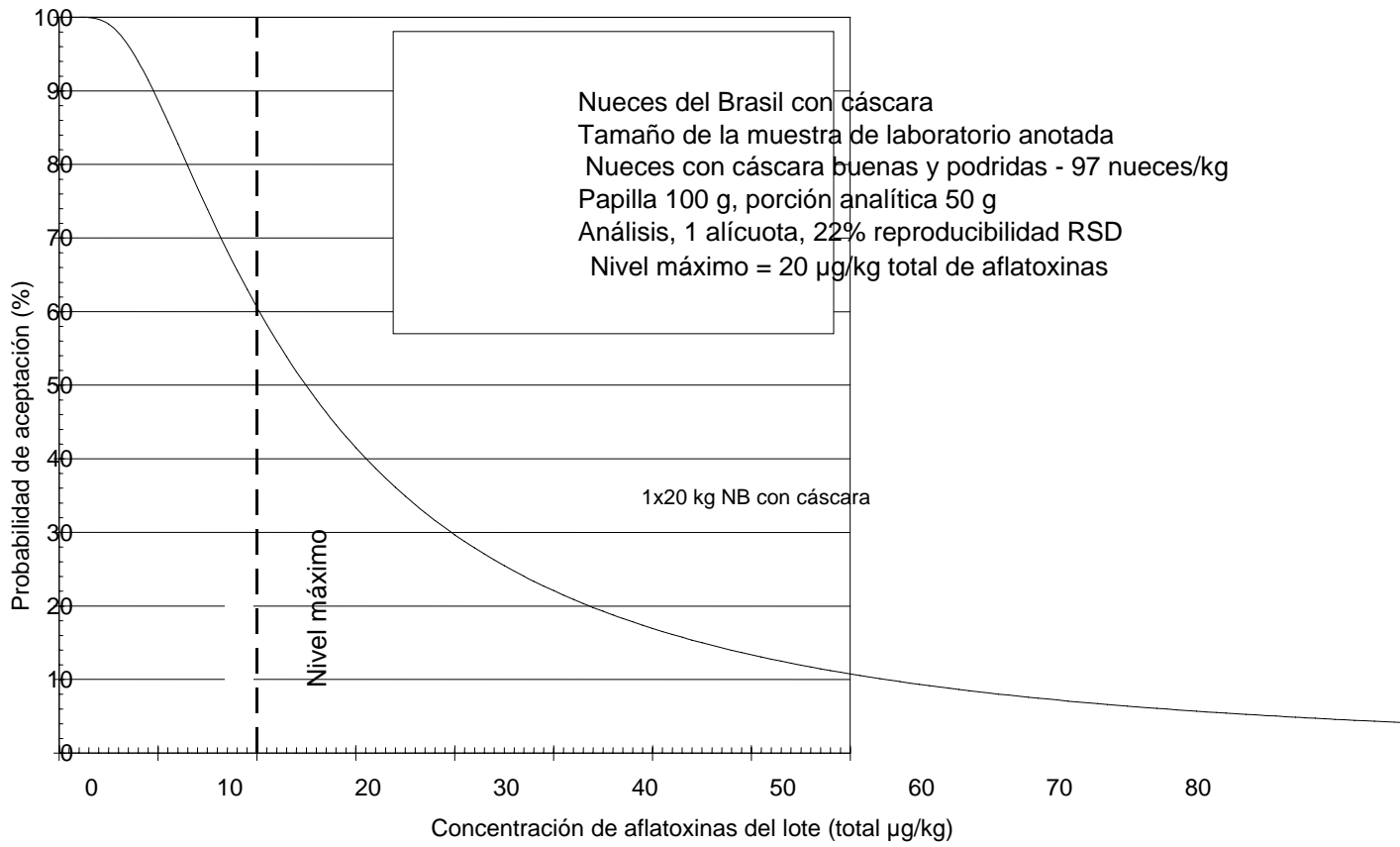


Gráfico 3. Curva de operación de nueces del Brasil con cáscara con un nivel máximo de 20 µg/kg

ANEXO III

Información general

INTRODUCCIÓN

1. La contaminación por aflatoxinas puede ser un problema en las nueces de árbol y otros productos como el maíz, cacahuets (maní), semillas oleaginosas, productos de cacao, frutos secos y especias. El presente documento solamente es aplicable a las nueces del Brasil, que es el único cultivo entre las nueces de árbol que más se comercializan en que se utiliza la actividad extractiva. El extractivismo puede definirse como un procedimiento de recolección y tratamiento primario de los productos forestales destinados al comercio nacional o internacional (CAC/RCP 59-2005).
2. Las nueces del Brasil son semillas de *Bertholletia excelsa* Humb. & Bompl., árboles que crecen de forma silvestre en el bosque del Amazonas. Pueden alcanzar hasta 60 metros de altura, empiezan a producir frutos a los 12 años y viven casi 500 años. Los árboles crecen en grupos de 50 a 100 árboles y estos grupos están separados entre sí por distancias de hasta 1 kilómetro; la polinización es realizada por abejas silvestres grandes, especialmente abejas *Euglossinae* (Wadt et al., 2005).
3. El bosque del Amazonas tiene numerosos ecosistemas y una gran diversidad. Desempeña un importante papel en el equilibrio climático mundial y ofrece refugio y sustento a numerosos grupos étnicos. El clima ecuatorial es cálido y húmedo, con una temperatura media de 26° C y humedad relativa entre 80 % y 95 %.
4. La actividad extractiva de nueces del Brasil constituye una importante actividad para la población autóctona en los países en que crecen los árboles, y estimula un uso sostenible de los recursos naturales renovables, conciliando el desarrollo social con la conservación. Es una actividad que no destruye el bosque ni representa una amenaza para el equilibrio ecológico y el medio ambiente. Por otra parte, los árboles de *Bertholletia Excelsa* son esenciales en el bosque tropical porque ayudan a mantener el equilibrio en la relación entre la flora y la fauna.
5. El número de recolectores y procesadores que participa en la industria de la nuez del Brasil es de aproximadamente 1,2 millones en Brasil, 600 000 en Bolivia y 200 000 en Perú. En 2006 la producción mundial total fue de 20 100 toneladas métricas, siendo un 64 % de Bolivia, un 24 % de Brasil y un 12 % de Perú (INC, 2007).
6. En su 28° período de sesiones (CAC, 2001), la CAC adoptó un Código de prácticas para la prevención y reducción de la contaminación por aflatoxinas en las nueces de árbol; la CAC adoptó un apéndice específico para las nueces del Brasil en su 29ª período de sesiones. Ese apéndice se está revisando teniendo en cuenta los resultados del proyecto SAFENUT (STDF, 2009). En información proporcionada por la Fundación Internacional de Frutas Desecadas y Nueces (INC) se señala que en los últimos 15 años las industrias y productores han realizado grandes esfuerzos para minimizar el desarrollo de hongos y producción de aflatoxinas en las nueces del Brasil. En el caso de las nueces del Brasil en especial, las condiciones en el entorno del Amazonas y las características de la actividad extractiva (recolección y tratamiento primario) no se pueden controlar y ello tiene efectos directos o indirectos sobre el desarrollo de hongos toxígenos y producción de aflatoxinas.
7. El procesado/tratamiento que ha demostrado que reduce los niveles de aflatoxinas en las nueces del Brasil comprende el pelado, la clasificación por tamaño, la gravedad específica, y el color o defectos visuales. Las nueces del Brasil listas para el consumo (LPC) son nueces que no se someten a un tratamiento/procesado adicional antes de llegar al consumidor final; las destinadas a ulterior elaboración (DUE) son sometidas a ese procedimiento. Las nueces del Brasil se pueden comercializar sin cáscara, tanto listas para el consumo (LPC) como destinadas a ulterior elaboración (DUE), y con cáscara. Cada uno de estos productos se define del modo siguiente:

Nueces del Brasil sin cáscara listas para el consumo: son las nueces sin cáscara (sólo el grano) aptas para comercialización directa al consumidor final.

Nueces del Brasil sin cáscara destinadas a ulterior elaboración: son las nueces sin cáscara (sólo el grano) que se van a someter a un procedimiento de selección para reducir los niveles de aflatoxinas antes de comercializarse al consumidor final.

Nueces del Brasil con cáscara: son las nueces con cáscara que se pueden comercializar directamente

al consumidor final o que se van someter a un procedimiento de clasificación y/o eliminación de la cáscara para reducir los niveles de aflatoxinas antes de comercializarlas al consumidor final

8. Las condiciones de producción de las nueces del Brasil no se pueden controlar como en el caso de las demás nueces, por tanto es necesario someter a ulterior consideración la distinción entre nueces con cáscara y sin cáscara.

9. En este documento se examinan muchos aspectos relacionados con el contenido de aflatoxinas en las nueces del Brasil, incluida la presencia, estimación de la ingestión a través de los alimentos y los niveles máximos. Adicionalmente a la información proporcionada con anterioridad, esta versión revisada incluye información del Proyecto SAFENUT (STDF, 2009) e información adicional del proyecto CONFORCAST. En el anexo I y II se propone un plan de muestreo del contenido total de aflatoxinas en las nueces del Brasil.

EVALUACIÓN TOXICOLÓGICA

10. En su 49ª reunión, el JECFA (FAO/OMS, 1998) examinó el poder cancerígeno de las aflatoxinas y los posibles riesgos asociados a su ingestión. El JECFA analizó una amplia variedad de estudios realizados con animales y con personas que proporcionaron información cualitativa y cuantitativa sobre la hepatocarcinogenia de las aflatoxinas. No se propuso una ingestión diaria tolerable porque estos compuestos son cancerígenos genotóxicos. Los cálculos potenciales de cáncer hepático en el hombre debido a la exposición a la aflatoxina B₁ se obtuvieron en estudios epidemiológicos y toxicológicos.

11. La capacidad cancerígena de la aflatoxina B₁ es considerablemente mayor en portadores del virus de la hepatitis B (alrededor de 0,3 casos de cáncer al año por cada 100 000 personas por ng de aflatoxinas B₁ por kg de peso corporal al día), según determinado por la presencia en el suero del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (personas HBsAg⁺), en comparación con las personas HBsAg⁻ (alrededor de 0,01 casos de cáncer al año por cada 100 000 personas por ng de aflatoxinas B₁ por kg de peso corporal al día). El JECFA señaló además que la vacunación contra el virus de la hepatitis B reduciría el número de portadores del virus, y por tanto la potencia de las aflatoxinas en las poblaciones vacunadas disminuiría, traducándose en una reducción del riesgo de cáncer hepático (FAO/OMS, 1998).

MÉTODOS ANALÍTICOS

12. Para determinar el contenido de aflatoxinas en las nueces existe una serie de métodos analíticos. En general, los métodos incluyen las fases de preparación de la muestra, extracción, limpieza y cuantificación. Tras una homogeneización efectiva de la muestra, se aplica una fase de extracción con disolvente utilizando una mezcla de acetonitrilo o metanol y agua. La limpieza de la muestra utiliza la partición líquido-líquido o bien extracción en fase sólida (SPE) con adsorbentes como sílice, florisil, C18, óxido de aluminio e inmunoabsorbentes como columna de inmunoafinidad (Gilbert y Vargas, 2003). Los métodos de identificación y cuantificación que se emplean normalmente son cromatografía en capa fina (TLC o HPTLC) o cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), con detección de fluorescencia. Para analizar el contenido de aflatoxinas en las nueces del Brasil fueron validados dos métodos mediante estudios de colaboración utilizando limpieza SPE (AOAC 994.08) y columna de inmunoafinidad (Stroka et al., 2000), seguido de HPLC-FL (Gilbert y Vargas, 2003).

13. Se han desarrollado métodos de cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem con ionización por electrospray o ionización química por presión atmosférica (LC-MS/MS) para determinar y confirmar la contaminación por aflatoxinas en distintos alimentos (Bacaloni et al., 2008; Spanjer et al., 2008). Spanjer et al. (2008) desarrollaron un método con inyección directa en un LC-MS/MS tras extracción con acetonitrilo: agua para 33 micotoxinas, incluyendo aflatoxinas BG. El límite de detección (LOD) o el límite de cuantificación (LOQ) para cada aflatoxina dependen de la matriz, el procedimiento de limpieza y el método de detección, y normalmente oscilan entre 0,1 y 1 µg/kg (Marklinder et al., 2005; Sobolev, 2007).

14. Los equipos de ensayo basados en anticuerpos para analizar el contenido de aflatoxinas se utilizan principalmente con fines de selección. En el sitio Web de AOAC Internacional (AOAC, 2009) hay una lista de distintos tipos de equipos para el análisis de aflatoxinas B₁ y el contenido total de aflatoxinas, que utilizan crisoles revestidos de anticuerpos, láminas para ELISA, columnas, tarjetas y tubos. Sin embargo, se han validado pocos equipos mediante un estudio de colaboración entre laboratorios (Gilbert y Vargas, 2003).

15. El CCFAC estableció un criterio de rendimiento para los métodos de análisis para la detección del contenido total de aflatoxinas en los alimentos (CX/CF 07/1/6). Tanto el Comité Europeo de Normalización (CEN 1999) como la Unión Europea (CE, 2006) han establecido también características de rendimiento del

método general para las aflatoxinas, y han aprobado los últimos documentos del Codex para cacahuetes (maní) y nueces de árbol (almendras, avellanas y pistachos).

16. En su 36ª reunión el CCFAC señaló que no era necesario elaborar más métodos de análisis para la detección de aflatoxinas en las nueces de árbol. En el futuro, el Comité del Codex sobre Métodos de Análisis y Toma de Muestras (CCMAS) podría examinar, si se solicita, métodos adicionales.

FACTORES QUE REPERCUTEN EN LA PRESENCIA DE AFLATOXINAS EN LAS NUECES DEL BRASIL

17. Diversos factores medioambientales influyen en el desarrollo de hongos y la producción de aflatoxinas, pero los factores que se consideran decisivos son la temperatura y la humedad relativa. Otros factores son la composición del sustrato, las condiciones de almacenamiento y los daños producidos por insectos (Arrus et al., 2005a).

18. El desarrollo de hongos toxígenos y la formación de aflatoxinas puede producirse en las fases (de recolección) antes y después de la cosecha. Según Johnson et al. (2008), la infección preliminar de las nueces del Brasil con hongos productores de aflatoxinas puede producirse en un estadio muy temprano puesto que del exterior de vainas asépticas unidas todavía al árbol se aisló *A. flavus*. La probabilidad y proporción de desarrollo de hongos y formación de toxinas guardaba relación en gran medida con la actividad acuosa (a_w), que es una medición del agua no ligada en el cultivo/alimento. Baymam et al. (2002) han demostrado que los efectos de la esterilización de superficie en las nueces del Brasil son mínimos: únicamente disminuyó de manera importante *A. nidulans*. A diferencia de las demás nueces, en las nueces del Brasil la mayor parte de inóculo (incluida la mayor parte de *A. flavus*) era interna.

19. En nueces del Brasil recogidas hasta 60 días después de haber caído las vainas del árbol (Cartaxo et al., 2003) y durante el procesado (Souza et al., 2003) se detectó la presencia de *Aspergillus flavus* y *A. niger*. Además de esas especies, se detectó también la presencia de *Aspergillus parasiticus* en nueces del Brasil defectuosas (Brasil, 2003; datos sin publicar). Recientemente se ha detectado *Aspergillus nomius* en lotes de nueces del Brasil y éste puede ser uno de los productores más importantes de aflatoxinas en estas nueces (Olsen et al, 2008).

20. Arrus et al (2005b) realizaron un estudio a fin de entender mejor el origen de las aflatoxinas en las nueces del Brasil. Se recogieron asépticamente cinco vainas de nueces del Brasil de árboles ubicados en cada uno de los campos del bosque del Amazonas en Perú. Las partes exteriores de las vainas de la nuez no contenían *A. parasiticus* y solamente las vainas de un campo dieron cepas de *A. flavus*. Todas las cepas analizadas eran aflatoxígenas (630 µg/kg a 915 µg/kg del contenido total de aflatoxinas). Las nueces enteras, con cáscara obtenidas tras abrir las vainas, no dieron *A. flavus* ni *A. parasiticus*. En ninguna de las nueces se detectaron aflatoxinas (LOD de 1,75 µg/kg). Las nueces con cáscara y sin cáscara sometidas a varias operaciones de procesado dieron todas positivo para *A. flavus* pero negativo para *E. coli* y salmonelas.

21. Los efectos de la humedad relativa (HR) y la temperatura sobre la producción de aflatoxinas se evaluaron en nueces del Brasil con cáscara y sin cáscara (enteras y en mitades) inoculadas con el género aflatoxígeno *Aspergillus* (Arrus et al., 2005a). En nueces conservadas a 25° C y 30° C, y 97% de HR se detectó la producción máxima de aflatoxinas. En las mitades se observó el nivel más alto de aflatoxinas B₁ (4 483 µg/kg) y del contenido total de aflatoxinas (6 817 µg/kg) mientras que las nueces con cáscara contenían los niveles más bajos de aflatoxinas B₁ y contenido total de aflatoxinas (49 µg/kg y 93 µg/kg, respectivamente). A 10° C (97% de HR) y 30° C (75% de HR) no se produjeron aflatoxinas. Esto indica que después de la cosecha el desarrollo de hongos se puede evitar secando la nuez lo antes posible hasta que tenga un nivel de humedad o actividad acuosa inocuo. Adicionalmente, una importante estrategia para prevenir la producción de aflatoxinas en las nueces del Brasil es controlar adecuadamente la temperatura y la HR durante la conservación.

22. Según Arrus et al. (2005a), el límite del contenido de humedad y la actividad acuosa (a_w) necesario para controlar la producción de aflatoxinas (<4 µg/kg) a 30° C hasta 60 días de almacenamiento es de 4,57 % (0,70 de a_w) en las nueces con cáscara, y 4,50 % (0,68 de a_w) y 5,05 % (0,75 de a_w) en las nueces sin cáscara (enteras y en mitades, respectivamente). Por encima de estos valores la producción de aflatoxinas puede aumentar considerablemente. La mejor forma de expresar la disponibilidad de agua necesaria para permitir el desarrollo de hongos es como a_w .

23. El proyecto SAFENUT, llevado a cabo en los Estados brasileños de Para y Acre, señaló que los hongos que producen aflatoxinas infectan pronto las nueces del Brasil en el bosque, nada más las vainas caen del árbol (STDF, 2009). El punto crítico de control en la producción de la nuez es la fase de secado realizada en la comunidad extractivista, que no siempre es efectiva en llevar las nueces a un nivel de humedad inocuo (correspondiente a una actividad acuosa inferior a 0,70). El contenido de humedad puede alcanzar el grado óptimo para la producción de aflatoxinas traduciéndose en un incremento del contenido de aflatoxinas durante el almacenamiento. Por tanto, las nueces del Brasil llegan a las plantas de producción contaminadas con aflatoxinas y los procedimientos de clasificación aplicados en esa fase no son efectivos en la eliminación de nueces con cáscara contaminadas. Una clasificación efectiva solamente se obtiene descascarando las nueces.

24. Según Johnsson et al (2008), el crecimiento aflatoxigénico de los hongos y la producción de aflatoxinas aumenta rápidamente a los 40-90 días después de la recolección de las nueces y antes de que lleguen a la planta de producción para el secado final. En 2009, cuando el proyecto SafeNut se terminó² y se recopilaron muchos más datos, se demostró que las prácticas implementadas actualmente en la cadena de producción de nueces del Brasil, que están basadas en las recomendaciones de las directrices existentes sobre buenas prácticas, no eran efectivas para reducir las aflatoxinas. Se concluyó que dentro de 10 días de la recolección, las nueces del Brasil sin cáscara deben haberse secado para que tengan un nivel de humedad inocuo (actividad del agua de las nueces inferior a 0,7) en las comunidades extractivistas o transportarse y secarse en las industrias de procesado. A los 40 días hay un 20% de probabilidad de que el contenido total de aflatoxinas exceda 10 µg/kg y un 15% de que exceda 20 µg/kg (Olsen et al, 2009).

PRESENCIA DE AFLATOXINAS EN LAS NUECES DEL BRASIL

25. Varios países han estudiado la presencia de aflatoxinas en las nueces del Brasil. De 176 muestras analizadas en Estados Unidos, el 11 % estaban contaminadas con aflatoxinas a niveles que varían desde trazas hasta 20 µg/kg, y el 6 % tenía niveles superiores a 20 µg/kg. El nivel máximo detectado fue de 619 µg/kg (Pohland, 1993). En Japón, de las 74 muestras de nueces del Brasil analizadas solamente estaban contaminadas 4 muestras y el contenido de aflatoxinas de 2 muestras era superior a 10 µg/kg (hasta 123 µg/kg) (FAO/OMS, 1998).

26. Entre noviembre de 2003 y marzo de 2004 la Agencia de Normas Alimentarias del Reino Unido realizó un estudio en una variedad de nueces y productos de nueces. Cuatro de las 21 muestras analizadas de nueces del Brasil contenían niveles superiores a los límites normativos de entonces en la CE de 4 µg/kg de contenido total de aflatoxinas (Food Standards Agency, 2004).

27. En un estudio llevado a cabo en Brasil de 1998 a 2004 se analizaron 500 muestras de nueces del Brasil (302 sin cáscara y 198 con cáscara). En el 71,8 % de las nueces sin cáscara y el 41,4 % de las nueces con cáscara analizadas no se detectó la presencia de aflatoxinas (<0,6 µg/kg). Los niveles de aflatoxinas B₁ eran <2 µg/kg en el 69,4% y <10 µg/kg en el 80 % de las muestras (sin cáscara y con cáscara). Aproximadamente el 70 % y 80 % de todas las muestras tenían niveles <4 µg/kg y <20 µg/kg, respectivamente. Las concentraciones medianas del contenido total de aflatoxinas fueron de 1,85 µg/kg y 0,8 µg/kg en las nueces del Brasil con cáscara y sin cáscara, respectivamente (CAC, 2005a).

28. El Ministerio de Agricultura del Brasil presentó datos relativos a la presencia de aflatoxinas en las muestras de nueces del Brasil tomadas de lotes destinados a la exportación y lotes rechazados por los países importadores durante los años 2005 y 2006. En todos los casos se analizó solamente la parte comestible (los granos). Aproximadamente el 85 % de las 294 muestras (lotes) analizadas no presentaban niveles detectables de aflatoxina B₁ (< 0,6µg/kg ó 1µg/kg). Los niveles del contenido total de aflatoxinas en las muestras positivas (concentración más baja) oscilaban entre 0,4 µg/kg y 242 µg/kg, y 13 muestras (el 4,4 %) tenían niveles > 20 µg/kg (Brazil, 2006; sin publicar).

29. En Suecia se llevó a cabo un estudio para evaluar la habilidad del consumidor para distinguir las nueces del Brasil con cáscara contaminadas por aflatoxinas (Marklinder *et al.*, 2005). El nivel mediano y el percentil 95° de aflatoxinas en la parte comestible de 132 muestras tomadas antes de la selección por el grupo fueron de 1,4 µg/kg y 557 µg/kg, respectivamente. Después de la selección, estos niveles fueron de 0,4 µg/kg y 56 µg/kg, respectivamente. El estudio concluyó que las nueces del Brasil pueden ser una de las

² http://www.standardsfacility.org/files/Project_documents/Project_Grants/STDF_114_Final_report_Website.pdf

pocas nueces en que los consumidores pueden seleccionar visualmente la parte comestible de la parte contaminada no comestible durante el proceso de pelado antes de consumirla y, de esta forma, protegerse de la exposición a niveles elevados de aflatoxinas.

30. En su evaluación de la ingestión a través de los alimentos en su 68ª reunión, el JECFA utilizó datos sobre la contaminación por aflatoxinas de países productores. La concentración mediana del contenido total de aflatoxinas en las nueces del Brasil (sin cáscara) era de 20 µg/kg (FAO/OMS, 2008).

31. De Mello & Scussel (2007) estudiaron las características externas de las nueces del Brasil con cáscara (dimensiones, peso, cromaticidad, y espesor de la cáscara), contenido de humedad y contaminación por aflatoxinas (analizado por LC-MS/MS). Según su longitud, las nueces del Brasil se clasificaron en tres tamaños: grande, mediano y pequeño (para cada grupo se seleccionaron 200 nueces de un lote de 65 kg recolectadas en una factoría de nueces del Brasil en el Estado del Amazonas en Brasil). Las muestras de nueces de tamaño pequeño presentaron un nivel medio de aflatoxinas B₁ de 5,62 µg/kg. En las muestras de los otros dos grupos no se detectaron aflatoxinas. Los autores concluyeron que las características externas de las nueces del Brasil pueden ayudar a distinguir entre las nueces sanas/inocuas y deterioradas, y podrían ser de utilidad para clasificar las nueces y desarrollar máquinas.

32. Pacheco & Scussel (2009) analizaron por LC-MS/MS nueces del Brasil con cáscara y sin cáscara de las temporadas 2006 y 2007 destinadas a la exportación. Las muestras se tomaron de sacos grandes (nueces con cáscara) y mesas de clasificación tras ser clasificadas por tamaño (nueces sin cáscara) inmediatamente después del procesado en una fábrica de Manaus, Estado del Amazonas. De las 171 muestras analizadas, el 8,7% de las nueces (11 con cáscara y 3 sin cáscara) tenían niveles del contenido total de aflatoxinas >4 µg/kg; la mayoría de las nueces con cáscara (9 muestras) era de la temporada de 2006. Marklinder et al (2005) han demostrado que en la mayoría de los casos, los niveles del contenido total de aflatoxinas eran inferiores en la cáscara que en el grano de la misma muestra.

33. Olsen et al. (2008) demostraron que en la mayoría de las muestras de 199 lotes de nueces del Brasil con cáscara importadas a Europa la relación entre la aflatoxina B₁ y G₁ era de aproximadamente 50/50, indicando que el principal hongo responsable de la producción de aflatoxinas no puede ser *Aspergillus flavus*, porque produce únicamente aflatoxinas B. Además, aislaron e identificaron *A. nomius*, que es un productor de aflatoxinas B y G, y señalaron que esta especie podía ser un importante productor de aflatoxinas en las nueces del Brasil.

34. Datos recopilados durante los últimos 5 años por miembros de la industria de INC (Pino Calcagni, comunicación personal) demuestran que el promedio pesado de la proporción de aflatoxinas B₁ en el contenido total de aflatoxinas es del 66,3%, variando desde un 25% hasta un máximo del 96,4%.

35. Muestras de nueces del Brasil recogidas en el marco del proyecto STDF (*datos no publicados*) tenían una relación porcentual similar de AFB₁/AFT. Si se consideran solamente las muestras positivas (el 75 % de las 569 muestras analizadas), AFB₁ representaban más del 55% de los niveles de AFT en aproximadamente el 52 % de las muestras.

36. El Grupo Científico de EFSA evaluó los datos sobre la presencia de aflatoxinas en las nueces de árbol y otros productos de 2000 a 2006 presentados por 22 países miembros de la UE. Las muestras guardaban relación con la importación, el mercado o el control de la compañía y no se especificaba qué muestras eran listas para el consumo o para ulterior elaboración. De las 622 muestras de nueces del Brasil analizadas, el 56,4% tenían niveles del contenido total de aflatoxinas inferiores al LOD (0,1 µg/kg – 0,2 µg/kg), el 22% entre el LOD y 4 µg/kg, el 2,4 % entre 4 µg/kg y 10 µg/kg, y el 19,1 % superiores a 10 µg/kg (EFSA, 2007). En el informe no estaba claro si las muestras analizadas eran nueces del Brasil sin cáscara o con cáscara o incluían ambos tipos de muestras.

37. El Gobierno del Brasil – Ministerio de Agricultura – presentó los resultados del Proyecto Conforcast en un taller celebrado en Belém, Pará (Brasil), del 10 al 12 de noviembre de 2008. Los principales objetivos de este proyecto eran diseñar planes de muestreo para las nueces del Brasil sin cáscara y con cáscara, y evaluar qué categorías de nueces del Brasil (el grano y con cáscara) se podían asociar más con la contaminación por aflatoxinas. También se obtuvo información sobre la presencia de aflatoxinas en lotes de nueces del Brasil listos para comercializar (sin cáscara y con cáscara). Las muestras fueron tomadas durante los años 2006 y 2008 en plantas de procesado de los Estados de Pará y Acre. En los estudios de muestreo se sometieron a muestreo 25 lotes de nueces del Brasil sin cáscara y 13 lotes de nueces del Brasil con cáscara (4 a 8 toneladas) según diseños de muestreo no equilibrados.

38. Todas las muestras del proyecto Conforcast (con cáscara y los granos) fueron analizadas para el contenido de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ por HPLC-FL con derivatización post-columna utilizando una célula electroquímica, con criterios de rendimiento según la Norma de la Comisión Europea 401/2006.

39. El anexo I (gráfico 1) muestra el diseño jerarquizado experimental desequilibrado para las nueces del Brasil; de cada uno de los 25 lotes sometidos al muestreo se tomaron 25 muestras de 200 kg. De cada muestra se tomaron 20 submuestras de 10 kg para analizarlas.

40. En el Cuadro 2 aparece el resumen de los resultados obtenidos en las 500 submuestras en que se ha analizado el contenido total de aflatoxinas en el marco del Proyecto Conforcast (del gráfico 1). En la mayoría de submuestras (el 67,8 %), los niveles de aflatoxinas encontrados eran inferiores a 0,39 µg/kg del contenido total de aflatoxinas y el 4 % de ellas tenía niveles superiores a 10 µg/kg. Los niveles medios y medianos eran 2,07 µg/kg y 0,17 µg/kg, respectivamente, siendo el nivel más alto 100,9 µg/kg.

Cuadro 2. Distribución (%) de las 500 submuestras de nueces del Brasil sin cáscara de los 25 lotes clasificados por distintitos grados de contaminación total de aflatoxinas.

	Gama de la concentración del contenido total de aflatoxinas (AFT)*, µg/kg									
	≤0,39	> 0,39≤1,0	> 1≤2,0	> 2≤4	>4≤10	>10≤15	>15≤20	>20≤30	>30≤50	>50
% de submuestras analizadas	67,8	14,0	5,8	3,4	5,0	0,8	1,0	0,4	1,0	0,8
	96					4				

*LOD = 0,11 µg/kg (MAPA, 2008)

41. El anexo I (gráfico 2) muestra el diagrama del protocolo de diseño del muestreo para las nueces del Brasil con cáscara. Se sometieron a muestreo trece (13) lotes y se tomaron cuatrocientos (400) kg de cada lote. De cada uno de los 13 lotes se tomaron 10 submuestras de 40 kg, las nueces se pelaron y tras ser inspeccionadas visualmente por personal preparado, se separaron en grupos de granos buenos y las cáscaras correspondientes (con residuos en los granos y sin residuos en los granos) y granos podridos y las cáscaras. Los granos podridos dañados se separaron como si pudieran ser identificados fácilmente por el consumidor. En este proceso en 5 lotes se obtuvieron 20 submuestras de granos buenos (~10kg), 10 submuestras de las cáscaras correspondientes (~20kg), 10 submuestras de granos podridos y dañados, y 10 submuestras de las cáscaras correspondientes de masa variable, (posteriormente tres submuestras se excluyeron debido a problemas técnicos). En cada uno de los 7 lotes restantes se obtuvieron 20 submuestras de granos buenos (~10kg) y 1 submuestra de las cáscaras correspondientes (~20kg) (con residuos en los granos y sin residuos en los granos), 10 submuestras de granos podridos dañados de masa de muestra variable y 10 submuestras de las cáscaras correspondientes de masa variable (proyecto Conforcast).

42. La proporción media de cáscara: la proporción de grano (kg/kg) de las nueces del Brasil se calculó pelando y pesando los granos individuales y las cáscaras de 100 nueces tomadas de 13 lotes sometidos a muestreo en el marco del Proyecto Conforcast. Por término medio, grano y cáscara contribuían un 50% cada uno al peso de la nuez del Brasil, confirmando los estudios realizados desde 1999 por el laboratorio del Ministerio de Agricultura.

43. El Cuadro 3 muestra la masa de nuez (kg) y el contenido total de aflatoxinas obtenido en las 54 submuestras, según el modelo descrito en el gráfico 2. Pese a que la masa total (kg) de las nueces buenas (cáscaras y granos buenos) era casi 25 veces la de las nueces podridas (cáscaras y granos podridos), la contribución al contenido total de aflatoxinas en las nueces podridas a la masa total de aflatoxinas (76,6%) era tres veces superior a la de las nueces buenas (23,4%). Todas las categorías de cáscaras y granos contribuían cada una un 50% aproximadamente de la masa total de nuez (kg) (como se había comprobado con anterioridad) y la masa total de aflatoxinas (µg).

44. La concentración media del total de aflatoxinas en las nueces podridas (302,3 µg/kg) era 77 veces superior a la encontrada en las nueces buenas (3,92 µg/kg) (Cuadro 3). Todos los defectos, que incluían granos podridos y todas las cáscaras (55,3% de masa total, kg), contribuían aproximadamente un 92,2 % de la masa del contenido total de aflatoxinas (µg). Resultados similares fueron señalados por Whitaker et al. (1998) que detectaron que una masa pequeña de defectos (el 18%) contribuía al 93% de la masa de aflatoxinas en el cacahuete (maní).

45. Los datos presentados en el Cuadro 3 muestran claramente que las aflatoxinas se encuentran tanto en las partes de la cáscara como del grano de las nueces del Brasil. Los niveles detectados en granos buenos representan aproximadamente el 57 % de los detectados en las cáscaras de nueces buenas.

Cuadro 3. Masa de la muestra (kg), masa de aflatoxinas (μg) y concentración de aflatoxinas ($\mu\text{g}/\text{kg}$) en todas las muestras de nueces del Brasil por categoría – 54 muestras analizadas.

Condición categoría	Masa (kg)	Masa (% del total)	Masa de AFT (μg)	Masa de AFT (% del total)	Concentración de AFT ¹ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Nueces buenas (granos y cáscaras)	1.987,15	95,94	7.787,86	23,44	3,92
Nueces buenas	926,37	44,72	2.582,11	7,77	2,79
Cáscaras de nueces buenas ²	1.060,78	51,21	5.205,75	15,67	4,91
Nueces podridas (granos y cáscaras)	84,13	4,06	25.433,79	76,56	302,32
Granos podridos	40,35	1,95	14.322,39	43,11	354,95
Cáscaras de nueces podridas	43,78	2,11	11.111,40	33,45	253,80
Todos los defectos (granos podridos y todas las cáscaras)	1.144,91	55,28	30.639,55	92,23	26,76
Todos los granos (buenos y podridos)	966,72	46,67	16.904,50	50,88	17,49
Todas las cáscaras (buenas y podridas)	1.104,56	53,33	16.317,15	49,12	14,77
Todas las categorías³	2.071,28	100,00	33.221,66	100,00	16,04

¹ las muestras que contienen niveles del contenido total de aflatoxinas inferiores al LOD ($0,11 \mu\text{g}/\text{kg}$) se consideraron que estaban en $0 \mu\text{g}/\text{kg}$;

² suma de lo que se detectó en las cáscaras con y sin residuos en el grano (anexo 1, figura 2); para la concentración total de aflatoxinas se tomó la mediana. ³ todas las fracciones de nueces (cáscaras y granos)

46. El Cuadro 4 muestra la distribución de los niveles del contenido total de aflatoxinas encontrados en las 54 submuestras de nueces del Brasil con cáscara. Si se tienen en cuenta todas las nueces (granos buenos y podridos y las cáscaras correspondientes), el 79,7 % y el 42,7 % de las submuestras tenían contenidos totales de aflatoxinas superiores a $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ y $15 \mu\text{g}/\text{kg}$, respectivamente, implicando que un gran porcentaje de nueces del Brasil no cumpliría los niveles si esos niveles se aplicaran a las nueces con cáscara. Si se aplica un nivel de $20 \mu\text{g}/\text{kg}$ y $30 \mu\text{g}/\text{kg}$, el 22,3% y el 5,6% de las muestras no cumplirían el nivel. La eliminación de las nueces podridas reduce drásticamente el porcentaje de muestras que no cumple el nivel a 1,9%, 3,8% y 5,7% para niveles de $20 \mu\text{g}/\text{kg}$, $15 \mu\text{g}/\text{kg}$ y $10 \mu\text{g}/\text{kg}$, respectivamente. Si solamente se tienen en cuenta las nueces buenas (granos y sus cáscaras correspondientes), los porcentajes de muestras que no cumplen el nivel serían 5,6% y 1,9% respectivamente para niveles de $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ y $15 \mu\text{g}/\text{kg}$. Solamente el 4% de las submuestras de los granos buenos tenían niveles de aflatoxinas superiores a $15 \mu\text{g}/\text{kg}$. Las contaminaciones media y mediana del contenido total de aflatoxinas determinado en todas las nueces eran $15,3 \mu\text{g}/\text{kg}$ y $11,7 \mu\text{g}/\text{kg}$, respectivamente siendo la contaminación más elevada $102,6 \mu\text{g}/\text{kg}$. La distribución encontrada de todas las nueces es más parecida a las señaladas por EFSA (2007, 2009).

Cuadro 4. Distribución (%)¹ de 54 submuestras de nueces* del Brasil con cáscara clasificadas por grados distintos de contaminación

Distribución AFT (%) en categorías	Grados de concentración del total de aflatoxinas**, µg/kg						
	≤5	>5 ≤10	> 10 ≤15	> 15 ≤20	> 20 ≤30	> 30 ≤50	>50
Todas las nueces (%)	1,9	18,5	37,0	20,4	16,7	3,7	1,9
Distribución acumulativa (%)	≥ 10				79,7		
		≥ 15				42,7	
			≥ 20				22,3
				≥ 30			5,6
Sólo nueces buenas (%)	85,2	9,3	3,7	0,0	0,0	1,9	0,0
Distribución acumulativa (%)	≥ 10				5,6		
		≥ 15				1,9	
			≥ 20				1,9
				≥ 30			1,9
Sólo nueces buenas (%)	90,7	3,7	1,9	1,9	0,0	0,0	1,9
Distribución acumulativa (%)	≥ 10				5,7		
		≥ 15				3,8	
			≥ 20				1,9
				≥ 30			1,9
Todas las nueces*** (%)	0,0	20,4	31,5	22,2	13,0	11,1	1,9
Distribución acumulativa (%)	≥ 10				79,7		
		≥ 15				48,2	
			≥ 20				26,0
				≥ 30			13,0

¹ Proyecto Conforcast; *nueces = granos buenos y/o podridos y cáscaras correspondientes. **LOD = 0,11 µg/kg (MAPA, 2008); *** de nueces buenas y podridas

47. En el proyecto CONFORCAST se investigó también la posibilidad de predecir la concentración de aflatoxinas en las nueces del Brasil con cáscara de un lote sometido a muestreo. La mejor correlación se encontró entre la concentración de aflatoxinas en las nueces del Brasil con cáscara y la concentración de aflatoxinas en nueces con todos los defectos ($R^2=0,93$; ecuación de regresión: $C=0,5188M + 0,9591$ donde C es la concentración de aflatoxinas en las nueces del Brasil con cáscara y M la concentración de aflatoxinas en nueces con todos los defectos). La correlación entre la concentración total de aflatoxinas y la masa de aflatoxinas encontrada en todas las nueces con defectos y podridas era también elevada ($R^2=0,90$ y $0,88$, respectivamente) (Cuadro 5). Estas correlaciones demuestran que los niveles del contenido total de aflatoxinas en las nueces del Brasil están muy relacionados con la presencia de granos y cáscaras podridos.

Cuadro 5. Correlación de una regresión entre la concentración del contenido total de aflatoxinas en una muestra de nueces del Brasil con cáscara de un lote ($\mu\text{g}/\text{kg}$) y varios parámetros, donde C es la concentración de aflatoxinas en las nueces del Brasil con cáscara y M es el parámetro que se indica a continuación (eje x).

Parámetro	Ecuación de regresión	R²	R
Masa de aflatoxinas, nueces podridas (μg)	$C = 0,0287M + 2,9245$	0,88	0,94
Concentración de aflatoxinas, todos los defectos ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	$C = 0,5188M + 0,9591$	0,93	0,96
Masa de aflatoxinas, todos los defectos (μg)	$C = 0,0296M - 0,3059$	0,90	0,95
Masa de aflatoxinas, granos podridos (μg)	$C = 0,0314M + 6,6494$	0,51	0,7
Concentración de aflatoxinas, nueces podridas ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	$C = 0,024M + 7,9767$	0,35	0,59
Concentración de aflatoxinas, granos podridos ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	$C = 0,0227M + 6,8246$	0,32	0,57
Masa de nuez podrida (% total de masa)	$C = 1,4754M + 8,5754$	0,17	0,41
Masa de granos podridos (% total de masa)	$C = 3,0948M + 8,5362$	0,17	0,41
Masa de todos los defectos (% total de masa)	$C = -0,3648M + 24,753$	0,01	0,12
Masa de nuez podrida (% total de masa)	$C = -0,0523M + 3,7695$	0,002	0,04

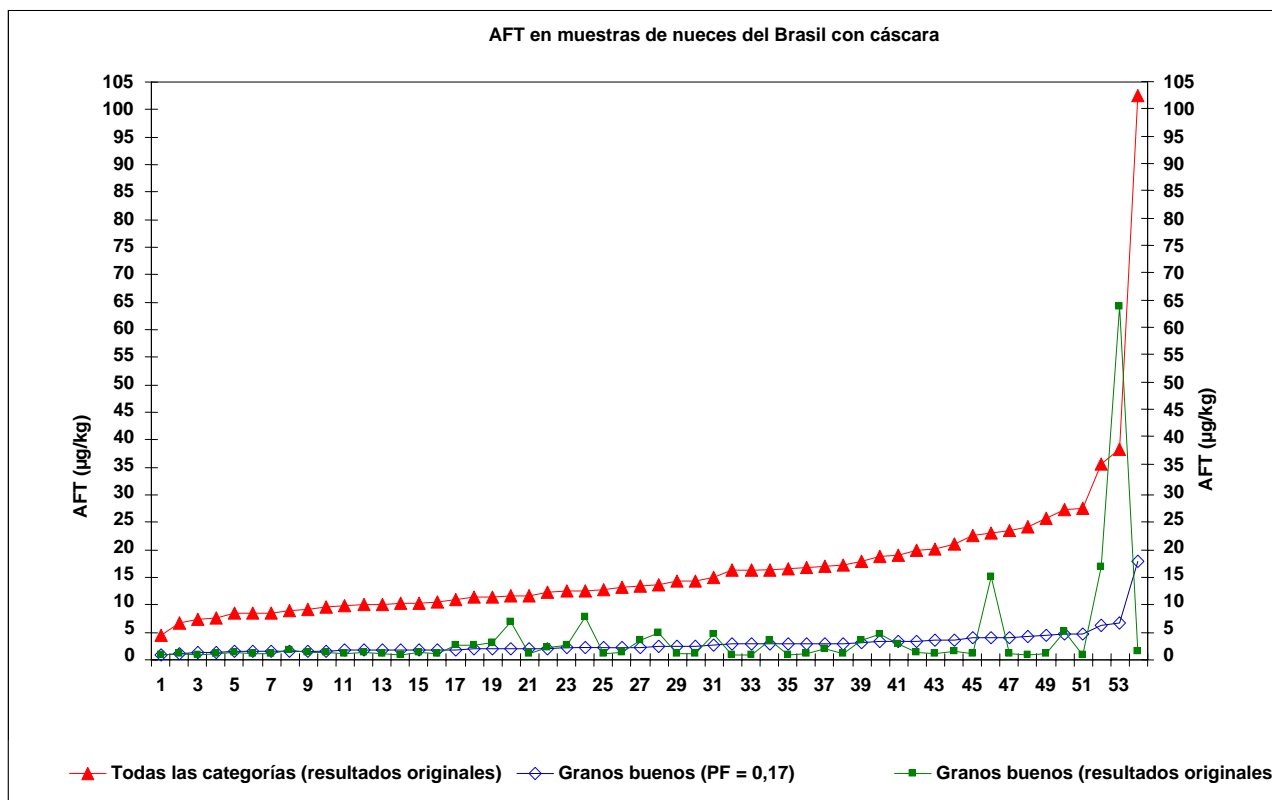
48. En muchos países, cuando entra en el mercado un lote de nueces del Brasil con cáscara, se toman muestras de las nueces y se analizan como tales, sin ningún tipo de procesado. Los resultados del Proyecto Conforcast muestran que los niveles encontrados en las nueces con cáscara no pueden utilizarse para apreciar la exposición del hombre a las aflatoxinas por el consumo de nueces del Brasil, porque las cáscaras y las nueces podridas, que no se consumen, pueden estar muy contaminadas. En el laboratorio, las nueces del Brasil con cáscara buenas se pueden separar de las nueces podridas por inspección visual tras cortar la nuez por la mitad. Los exportadores realizan este procedimiento de forma rutinaria cuando evalúan las nueces que llegan de los productores y cuando clasifican un lote para exportarlo como listo para el consumo.

49. Un enfoque para calcular el nivel de una sustancia, como un contaminante, presente en la porción comestible del alimento (pertinente para la evaluación de la exposición) de resultados obtenidos de alimentos no procesados (producto sin elaborar que contiene la porción no comestible) es calcular el factor de procesado (FP), un procedimiento habitual aceptado por la JMPR/CCPR (CX/PR/07/39/8). Para un solo procedimiento de contaminante/alimento/procesado, los FP pueden variar ampliamente, y se recomienda que se utilice el valor mejor calculado entre los datos disponibles. Esa variabilidad encontrada en los FP es especialmente cierta en el caso de las aflatoxinas en las nueces del Brasil, puesto que las condiciones medioambientales desde la cosecha hasta el mercado influyen mucho en los niveles de contaminación por hongos y de aflatoxinas en el grano y la cáscara. En el caso de las nueces del Brasil, los procedimientos de procesado de interés son el pelado y la clasificación. La clasificación visual tras el pelado se puede efectuar en la planta de procesado o por los consumidores.

50. Un factor de procesado de aflatoxinas en las nueces del Brasil se puede calcular dividiendo la concentración de aflatoxinas encontradas en granos buenos (fracción comestible, ya que el consumidor no ingiere las cáscaras o granos podridos) por el nivel encontrado en las nueces del Brasil con cáscara. Utilizando los datos indicados en el Cuadro 3, el FP calculado era 0,17 ($2,79 \mu\text{g}/\text{kg}/16,04 \mu\text{g}/\text{kg}$). Resultados individuales de 54 submuestras de nueces del Brasil con cáscara dieron FP entre 0,0 y 0,62, con una mediana de 0,03. Este factor de procesado se puede utilizar para evaluar la inocuidad de los niveles normativos del contenido de aflatoxinas en las nueces del Brasil con cáscara. Se ha reconocido que el FP calculado refleja la situación encontrada en el marco del proyecto Conforcast, en que los lotes de nueces del Brasil contenían por término medio un 4 % de nueces podridas en masa. En lotes con un porcentaje más elevado o más bajo de nueces podridas, el FP será más bajo o más elevado, respectivamente.

51. El gráfico 1 muestra el impacto del FP en los niveles del contenido total de aflatoxinas en cada una de las 54 submuestras analizadas en el marco del Proyecto Conforcast.

Gráfico 1. Impacto del uso del factor de procesado FP en la contaminación de AFT en muestras de nueces del Brasil con cáscara.



52. El concepto de objetivo de inocuidad de los alimentos (FSO) del Codex Alimentarius es la frecuencia máxima o concentración de un peligro en un alimento en el momento de consumo, que proporciona o contribuye al nivel de protección apropiado (ALOP). Este concepto respalda el enfoque del FP para calcular la concentración de aflatoxinas en la porción comestible de las nueces del Brasil en el momento de consumo. Por tanto, el consumidor puede alcanzar el ALOP al pelar y clasificar las nueces del Brasil.

INGESTIÓN ALIMENTARIA

53. Los productos con mayor contaminación de aflatoxinas son los cereales (principalmente el maíz), el cacahuete (maní), las semillas oleaginosas, las nueces de árbol, los frutos secos, las especias y la copra. La principal fuente de exposición alimentaria a las aflatoxinas es a través del maíz, el cacahuete (maní) y sus productos que son una parte esencial de la alimentación en algunos países (CAC, 2005b).

54. En su 49ª reunión, el JECFA evaluó el posible impacto de dos cantidades hipotéticas en la contaminación de aflatoxinas en el cacahuete (maní) (10 µg/kg ó 20 µg/kg de aflatoxinas B1) en poblaciones utilizadas como muestra y su riesgo general. Se concluyó que reduciendo el nivel máximo (NM) permitido del contenido total de aflatoxinas en el cacahuete (maní) de 20 µg/kg de aflatoxinas B1 a 10 µg/kg de aflatoxinas B1 no se obtendría ninguna diferencia observable en los porcentajes de cáncer hepático (FAO/OMS, 1998).

55. Se calculó que la ingestión alimentaria de aflatoxinas por la población de Suecia era de 0,6 ng/kg y 0,7 ng/kg de peso corporal, para los consumidores de cantidades medias y altas (percentil 95°), respectivamente (Thuvander, 2001). El consumo de nueces del Brasil calculado es de 0,3 g por día, tanto para los consumidores de cantidades medias como para los del percentil 95°. No se informó de los pesos corporales de las dos poblaciones. En otro estudio realizado en Suecia, suponiendo un consumidor de 70 kg de peso corporal y un consumo de nueces del Brasil de 0,3 kg durante Navidades, la ingestión media de aflatoxinas era de 0,73 ng/kg de peso corporal y el percentil 95° de 110 ng/kg de peso corporal. Repartiendo el consumo durante todo un año, las cifras serían 0,002 ng/kg y 0,3 ng/kg de peso corporal (Marklinder et al., 2005).

56. En su 68ª reunión, el JECFA evaluó el impacto para la salud humana de la exposición alimentaria a las aflatoxinas a través del consumo de las partes comestibles de nueces de árbol (listas para el consumo) y de higos secos (FAO/OMS, 2008). Utilizando los 13 grupos de dietas de consumo de SIMUVIMA/Alimentos (OMS, 2006) y suponiendo un peso corporal de 60 kg, el Comité evaluó el impacto en la exposición alimentaria a las aflatoxinas de establecer niveles máximos hipotéticos de 4 µg/kg, 8 µg/kg, 10 µg/kg, 15µg/kg ó 20 µg/kg para el contenido total de aflatoxinas en las almendras, las nueces del Brasil, las avellanas, los pistachos y los higos secos.

57. Según los datos de SIMUVIMA/Alimentos, el consumo de nueces del Brasil es distinto a cero únicamente en los grupos de dietas E, K y M (0,1 g por persona al día), que comprenden países europeos, latinoamericanos y norteamericanos, respectivamente. El consumo de otras nueces es mucho más elevado, y puede ser de alrededor de 2 g por persona al día de avellanas o almendras en el grupo B, que comprende los países mediterráneos. Datos de INC indican que el consumo medio de nueces del Brasil de los países de mayor consumo es de 0,082 g por persona al día, que corresponde al 2,2 % de las cuatro nueces de árbol juntas.

58. El JECFA decidió basar la evaluación en información proporcionada por países productores, señalando que dicha información representa mejor los productos en el comercio y se obtiene una estimación sensata de la exposición alimentaria al contenido total de aflatoxinas a través de las nueces de árbol. El Comité señaló que la mayoría de la información utilizada en la estimación de la exposición al contenido total de aflatoxinas de alimentos diferentes a las nueces de árbol y los higos secos procedía de la Unión Europea y que dicha información no reflejaba los valores medios reales en otras regiones del mundo. Probablemente esto se traduce en una estimación más baja de la exposición alimentaria al contenido total de aflatoxinas y una estimación más elevada de la contribución relativa de la exposición alimentaria al contenido total de aflatoxinas a través de nueces de árbol.

59. En el peor de los casos, cuando no se utiliza ningún nivel máximo, la ingestión del contenido total de aflatoxinas por el consumo de nueces de árbol e higos secos fue de más del 5% de la exposición alimentaria al contenido total de aflatoxinas solamente para los grupos de dietas B, C, D, E y M de SIMUVIMA/Alimentos (24,6 %, 20 %, 45 %, 16,8 % y 9,3 %, respectivamente).

60. Si en las almendras, nueces del Brasil, avellanas, pistachos e higos secos se aplicara realmente un NM de 20 µg/kg tendría un impacto en la contribución relativa a la exposición alimentaria del contenido total de aflatoxinas en esos grupos solamente, incluidos los consumidores de grandes cantidades de nueces de árbol. Esto se debe únicamente al elevado contenido del total de aflatoxinas en los pistachos. Para las nueces de árbol distintas a los pistachos, la presencia de un nivel máximo no tiene efecto sobre la exposición al contenido total de aflatoxinas a través de la alimentación.

61. El JECFA calculó que un NM aplicado de 20 µg/kg, 15 µg/kg, 10 µg/kg, 8 µg/kg ó 4 µg/kg da lugar a exposiciones al contenido total de aflatoxinas a través de la alimentación entre 0,12 ng/kg, 0,10 ng/kg, 0,08 ng/kg, 0,07 ng/kg y 0,06 ng/kg de peso corporal por día en el grupo de exposición más alta (D) y 0,03 ng/kg, 0,02 ng/kg, 0,02 ng/kg y 0,01 ng/kg de peso corporal por día en el grupo con la exposición más baja (M).

62. El JECFA señaló que las estimaciones para los grupos europeos B, E y F, con NM de 4 µg/kg a 20 µg/kg para las nueces de árbol eran del alcance de las comunicadas en el dictamen de EFSA con NM de 4 µg/kg a 10 µg/kg para las nueces de árbol, incluidos los consumidores de grandes cantidades.

63. El JECFA concluyó que aplicar un NM de 15 µg/kg, 10 µg/kg, 8 µg/kg ó 4 µg/kg en comparación con establecer un NM de 20 µg/kg tendría poco impacto sobre la exposición general al contenido total de aflatoxinas a través de la alimentación en los cinco grupos de población con exposición más elevada. Cuando se evaluó el impacto de la aplicación teórica completa del NM para el contenido total de aflatoxinas, la proporción de muestras rechazadas por establecer un NM de 20 µg/kg para las nueces del Brasil fue del 11 %. Este valor se incrementó al 17 % para un NM de 4 µg/kg. Sin embargo, de acuerdo con el proyecto Conforcast la aplicación de un NM de 20µg/kg para las nueces del Brasil con cáscara implicaría excluir del mercado internacional el 22,3% de la producción brasileña.

64. Al Grupo científico sobre contaminantes en la cadena de alimentos (CONTAM) de la Autoridad Europea para la Seguridad Alimentaria se le pidió que aconsejara sobre el posible incremento de los riesgos para la salud de los consumidores asociado con un incremento en los niveles máximos vigentes en la UE para las almendras, los pistachos y avellanas, teniendo en cuenta los modelos de consumo de estas nueces en

la UE. En su dictamen N° EFSA-Q-2006-174 el Grupo concluyó que el cambio de los niveles máximos para el contenido total de aflatoxinas de 4 µg/kg a 8 µg/kg ó 10 µg/kg del contenido total de aflatoxinas tendría efectos menores sobre las estimaciones de la exposición a través de los alimentos y el riesgo de cáncer. En un documento más reciente, el Grupo Científico concluyó que la salud pública no se vería afectada adversamente si los niveles del contenido total de aflatoxinas se aumentan de 4 µg/kg a 10 µg/kg para todas las nueces de árbol (EFSA-Q-2009-00675)

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES:

65. El presente documento sobre las aflatoxinas en las nueces del Brasil lleva a las siguientes conclusiones y recomendaciones, para que se examinen en la 3ª reunión del CCCF:

I) La producción de nueces del Brasil representa una importante actividad económica para la población amazónica, contribuyendo a la conservación de la selva tropical.

II) El consumo de nueces del Brasil en el mundo es más bajo que el de otras nueces de árbol. A diferencia de las otras nueces de árbol, las características extractivistas de las nueces del Brasil limitan un alto incremento en la producción y el consumo, incluso si se produce un aumento de la demanda en el mercado.

III) El JECFA concluyó que la aplicación de un NM de 15 µg/kg, 10 µg/kg, 8 µg/kg ó 4 µg/kg en comparación con establecer un NM de 20 µg/kg tendría poco impacto en la exposición general al contenido total de aflatoxinas a través del consumo de almendras, nueces del Brasil, avellanas y pistachos en los cinco grupos de la población con exposición más elevada. Además, en las nueces de árbol distintas a los pistachos, la presencia de un NM no tiene ningún efecto sobre la exposición al contenido total de aflatoxinas a través de la alimentación.

IV) Los niveles de aflatoxinas en nueces del Brasil sin cáscara buenas (comestibles) de plantas brasileñas en lotes destinados a la exportación como listas para el consumo son normalmente muy bajos y el 96% de las muestras contienen un nivel hasta 10µg/kg.

V) Resultados del proyecto Conforcast han demostrado que los niveles del contenido total de aflatoxinas en las nueces del Brasil con cáscara listas para la exportación eran superiores a 20 µg/kg, 15 µg/kg y 10 µg/kg en el 22,3 %, el 42,7 % y el 79,7 % de las submuestras analizadas, respectivamente. Esto significa que un elevado porcentaje de nueces del Brasil con cáscara quedarían fuera del mercado si alguno de dichos niveles se aplicara a las nueces del Brasil con cáscara y tendría un gran impacto económico y social en la población amazónica que sobrevive de la actividad extractivista de las nueces del Brasil.

VI. El Proyecto Conforcast ha demostrado que la eliminación de nueces podridas reduce de forma drástica el porcentaje de muestras fuera del mercado a 1,9%, 3,8% y 5,7% para niveles de 20 µg/kg, 15 µg/kg y 10 µg/kg , respectivamente.

VII. El factor de procesado de 0,17 determinado en este documento (párrafo 63) puede aplicarse para calcular el impacto de la recomendación del NM para las nueces del Brasil con cáscara en la ingestión de aflatoxinas a través de los alimentos por el consumo de la parte comestible de la nuez del Brasil con cáscara. A un NM de 20 µg/kg y 30 µg/kg, los consumidores serían expuestos a un nivel total de aflatoxinas de 3,5 µg/kg y 5,2 µg/kg en los granos buenos, respectivamente. Según la evaluación del JECFA, no es probable que a esos NM la exposición al total de aflatoxinas por los alimentos sea afectada (especialmente teniendo en cuenta el nivel de aflatoxinas en la parte comestible).

VIII) En estudios se ha demostrado que los consumidores pueden separar visualmente la parte comestible de la no comestible (altamente contaminada) de las nueces del Brasil tras el procedimiento de pelado y por tanto autoprotgerse de la exposición a altos niveles de aflatoxinas. Los granos podridos (no comestibles, muy contaminados) tienen un color amarillento a oscuro.

IX) Las prácticas para la prevención y reducción de aflatoxinas en las nueces del Brasil son esenciales para que el nivel de aflatoxinas sea lo más bajo posible. A tal fin en el tema 7 del programa (CX/CF 10/4/4) se está actualizando el Código de Prácticas para las Nueces del Brasil.

X) En el anexo II se han incorporado planes de muestreo de apoyo de los límites recomendados.

REFERENCIAS

1. AOAC International. Available in: <http://www.aoac.org/testkits/testedmethods.html>. Access at: February 2009.
2. AOAC Official methods 994.08. Aflatoxins in corn, almonds, Brazil nuts, peanuts and pistachio nuts. AOAC – Official Methods of Analysis (2000), 17th Ed., Vol. II, AOAC International, Gaithersburg, MD, USA, Chapter 49, 26-27.
3. Arrus, K.; Blank, G.; Clear, R.; Holley, R.A.; Abramson, D. Microbiological and aflatoxin evaluation of Brazil nut pods and the effects of unit processing operations. *Journal of Food Protection* 68, 1060-65, 2005b.
4. Arrus, K.; Blank, G.; Abramson, D.; Clear, R.; Holley, R.A. Aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in Brazil nuts. *Journal of Stored Products Research*, 41: 513-527. 2005a.
5. Bacaloni, A., Cavaliere, C., Cucci, F. Foglia, P. Samperi, R., Laganà, A., Determination of aflatoxins in hazelnuts by various sample preparation methods and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1179 182–189, 2008.
6. Bayman, P.; James, L.; Mahoney, N. E. *Aspergillus* on tree nuts: incidence and associations. *Mycopathologia*, 155:161-169. 2002.
7. BRAZIL. Ministry of Agriculture, Data on Brazil nuts. 2006 (unpublished data).
8. CAC - Codex Alimentarius Commission. 24th Session of Codex Commission. ALINORM 01/41, paragraph 138. 2001.
9. CAC - Codex Alimentarius Commission, Codex Committee on Food Additives and Contaminants, 37th Session of the Codex Committee on Food Additives and Contaminants CRD 17, Data on the occurrence of aflatoxins in Brazil nuts, in Brazil, from 1998-2004, 2005a.
10. CAC - Codex Alimentarius Commission, Codex Committee on Food Additives and Contaminants, 37th Session. Discussion Paper on aflatoxins in Brazil nuts. CX/FAC 05/37/24, December 2004, The Hague, the Netherlands, 25-29, April, 2005b.
11. CAC - Codex Alimentarius Commission, Codex Committee on Food Additives and Contaminants, 37th Session of the Codex Committee on Food Additives and Contaminants, ALINORM 05/28/12, 2005c.
12. Cartaxo, C. B. C.; Souza, J. M. L.; Corrêa, T. B.; Costa, P.; Freitas-Silva, O. Occurrence of aflatoxin and filamentous fungi contamination in brazil-nuts left inside the forest. In: IV Congresso Latinoamericano de Micotoxicología. Anais eletrônicos. Havana, Centro Nacional de Sanidad Agropecuária, 2003.
13. CONFORCAST. Ferramentas Analíticas para Capacitação do Brasil na Garantia da Conformidade da Castanha-Do-Brasil (*Bertholletia Excelsa*) quanto ao Perigo aflatoxina. Projeto nº 1.265/05, Aprovado pela FINEP na Chamada Pública, “Ação Transversal - TIB - 06/2005 - Linha 1”. MAPA. Ministério da Agricultura, pecuária e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária - DAS, Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Vegetal – DIPOV. Coordenação-Geral de Apoio Laboratorial – CGAL, Laboratório Nacional Agropecuário – LANAGRO/MG, United States Department of Agriculture (Thomas Whitaker and Andy Slate).
14. EC. European Commission. European Regulation (EC) No 401/2006 of 23 February 2006. Methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs. *Official Journal of the European Union*, 2006.
15. EFSA- The European Food safety Authority. Statement of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the European Commission on the effects on public health of an increase of the levels for aflatoxin total from 4µg/kg to 10µg/kg for tree nuts other than almonds, hazelnuts and pistachios. *The EFSA Journal* (2009) 1168, 1-11.
16. EFSA, Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a Request from the Commission Related to the Potential Increase Of Consumer Health Risk By A Possible Increase of the Existing Maximum Levels for Aflatoxins in Almonds, Hazelnuts and Pistachios and Derived Products - Question N° EFSA-Q-2006-174. *The EFSA Journal* 446, 1 – 127. 2007

17. FAO/WHO. Safety evaluation of certain food additives and contaminants. WHO Food Additive Series, No. 40, 1998.
18. FAO/WHO. Safety evaluation of certain food additives and contaminants (Sixty-eighth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives). WHO Food Additives Series: 59, p.305. 2008. Available at http://whqlibdoc.who.int/publications/2008/9789241660594_eng.pdf. Accessed on January 2009.
19. Food Standard Agency, 2004. Analysis of Aflatoxin B₁ and total aflatoxins in edible nuts and nut products. Summary available at: <http://www.food.gov.uk/multimedia/pdfs/summarynuts.pdf>
20. Frisvad, J. C., Thrane, U., Samson, R. A. and Pitt, J.I. (2006) Important mycotoxins and the fungi which produce them. In: Hocking. A. C., Pitt, J.I., Samson, R. A. and Thrane, U. (Eds) *Advances in Food Mycology*. Springer, New York, pp.3-31.
21. Gilbert, J. and Vargas, E.A. Advances in Sampling and Analysis for Aflatoxins in Food and Animal Feed. *Toxin Reviews* (formerly Journal of Toxicology: Toxin Reviews), 22(2&3): 381-422. 2003.
22. INC. International Nut and Dried Fruit Council Foundation. Document prepared for the Electronic Working Group "Discussion Paper on Maximum Levels for Total Aflatoxins in Ready-to-eat Almonds, Hazelnuts and Pistachios" led by the European Community, 2007.
23. Ioannou-Kakouri E, Aletrari M, Christou E, Hadjioannou-Ralli A, Koliou A, Akkelidou D. Surveillance and Control of Aflatoxins B₁, B₂, G₁, G₂ and M₁ in Foodstuffs in the Republic of Cyprus: 1992-1996. *J. of AOAC International*, 82(4): 883 – 892. 1999.
24. Ito, Y.; Peterson, S.; Wicklow, D.T.; Goto, T. *Aspergillus pseudotamarii*, a new aflatoxin producing species in *Aspergillus* section flav. *Mycological Research*, 105(2): 233-239. 2001.
25. Johnsson, P, Lindblad, M., Thim, A.M., Jonsson, N., Vargas, E.A., Medeiros, N.L., Brabet, C., Quaresma de Araújo, M., and Olsen, M. Growth of aflatoxigenic moulds and Aflatoxin formation in Brazil nuts. *World Mycotoxin Journal*, 1(2):127-137, 2008.
26. MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária, Abastecimento. LACQSA/LANAGRO-MG. POP 055, Determinação de aflatoxinas por cromatografia líquida de alta eficiencia e em camada delgada, revisão 02, 25 de fevereiro de 2008.
27. Marklinder, I.; Lindblad, M.; Gidlund, A.; Olsen, M. Consumers' ability to discriminate aflatoxincontaminated Brazil nuts. *Food Add. Cont.* 22 (1): 56-64. 2005.
28. Mello F. R. and Scussel V. M. 2007. Characteristic of in-shell Brazil nuts and their relationship to aflatoxin contamination: criteria for sorting. *J. of Agric. and Food Chemistry*, 55, 9305-9310.
29. Olsen M, Johnsson P, Möller T, Paladino R and Lindblad M. *Aspergillus nomius*, an important aflatoxin producer in Brazil nuts? *World Mycotoxin Journal* 1 (2), 123-126, 2008.
30. Olsen M., Jonsson P., Brabet C, Vargas E., Nogueira Leite F. M., Leite de Souza J. M., Quaresma de Araujo M. , Limeira Medeiros N., Thim A.-M. and Lindblad M.: Development of a predictive model for aflatoxin production and fungal growth in the Brazil nut production chain. *ISM conference 2009, Tulln, Austria, 9-11 September 2009* (<http://www.ism2009.at/>)
31. Ozay, G., Seyhan, F., Yilmaz, A., Whitaker, T. B., Slate, A. B., Giesbrecht, F. G. Sampling Hazelnuts for Aflatoxin: Effect of Sample Size and Accept/Reject Limit on Reducing the Risk of Misclassifying Lots: *Food Chemical Contaminants Journal of AOAC International*, 90, 1028-1035, 2007
32. Ozay, G., Seyhan, F., Yilmaz, A., Whitaker, T. B., Slate, A. B., Giesbrecht, F. G. Sampling Hazelnuts for Aflatoxin: Uncertainty Associated with Sampling, Sample Preparation, and Analysis : *Food chemical contaminants - Journal of AOAC international* vol. 89 No. 4, 2006.
33. Pacheco A., Robert F.; Scussel V. Detecção de aflatoxinas em castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K) na safra de 2005. *Analytica*, 22: 64-65. 2006.
34. Pacheco A; Scussel V. Selenium and aflatoxin levels in raw Brazil nuts from the Amazon basin. *J. Agric. Food Chem.* 55:11087-92, 2007.
35. Pacheco, A.M.; Scussel. V.M. Aflatoxins Evaluation on *In-shell* and *Shelled* Dry Brazil Nuts for Export Analyzed by LC MS/MS - 2006 and 2007 Harvests. *World Mycotoxin Journal*. 2: 295-304, 2009.

36. Pohland A. E. Mycotoxins in review. *Food Add. Cont.*, 10: 17-28. 1993.
37. Salunkhe D. K.; Adsule R. N.; Padule D. N. Aflatoxins in foods and feeds, Metropolitan, Book Co.Pvt. Ltd., New Delhi, India, p. 18. 1987.
38. Sobolev VS. Simple, rapid, and inexpensive cleanup method for quantitation of aflatoxins in important agricultural products by HPLC. *J Agric Food Chem.* 55:2136-41, 2007
39. Souza, J. M. L.; Cartaxo, C. B. C.; Leite, F. M. N.; Reis, F. S. Avaliação microbiológica de castanha do brasil em usinas de beneficiamento no Acre. In: XLIX Reunião Anual da Sociedade Interamericana de Horticultura Tropical. Anais. Fortaleza, p. 201 (Embrapa Agroindústria Tropical. Documentos, 67). 2003.
40. Spanjer M, C., Rensen, P., M.; Scholten, J.M., LC-MS/MS multi-method for mycotoxins after single extraction, with validation data for peanut, pistachio, wheat, maize cornflakes, raisins and figs. *Food additives and contaminants*, 25(4): 472-489, April 2008.
41. STDF Project 114 - "Validation and transfer to the key stakeholders of a sustainable and effective aflatoxin management system in the Brazil nut production chain for recovering and consolidating export markets, particularly in Europe. FINAL REPORT Covering Period from 1 June 2006 to 30 November 2008. Project coordinators: Catherine BRABET, CIRAD, France - General Coordinator, Monica OLSEN, NFA, Sweden - Scientific Coordinator. Last version: May 2009
42. Stroka, J., Anklam, E., Jorissen, U., Gilbert, J. Immunoaffinity column cleanup with liquid chromatography using post-column bromination for determination of aflatoxins in peanut butter, pistachio paste, fig paste and paprika powder: collaborative study. *J. AOAC*, 83, 2, 320-340, 2000.
43. Thuvander, A.; Möller, T.; Enghardt Barbieri, H.; Jansson, A.; Salomonsson, A.-C.; Olsen, M. Dietary intake of some important mycotoxins by the Swedish population. *Food Add. Cont.* 18 (8): 696-706. 2001.
44. Wadt., L. H. O.; Kainer, K. A.; Gomes-Silva, D. A. P. Population structure and nut yield of a *Bertholetia excelsa* stand in southwestern Amazonia. *Forest Ecology and Management*. 211: 371-384. 2005.
45. Whitaker, T.B., Hagler, W.M., Giesbrecht, F.G., Dorner, J.W., Dowell, F.E., and Cole, R.J. Estimating aflatoxins in farmers' stock peanut lots by measuring aflatoxins in various peanut-grade components. *Journal of AOAC International* Vol 81(1):61-67, 1998.
46. Whitaker, T.B., Slate, A.B., Hurley, J.M., Giesbrecht, F. G. Sampling Almonds for Aflatoxin, Part II: estimating Risks Associated with various Sampling Plan Designs: *Food chemical contaminants - Journal of AOAC International* 90, 778-785, 2007.
47. WHO – World Health Organization. GEMS/Food Custers Diet (Global Environment Monitoring System/ Food Contamination Monitoring and Assessment Program). 2006. Available at <http://www.who.int/foodsafety/chem/gems/en/index1.htm>.

ANEXO
 Protocolos de diseño de muestreo

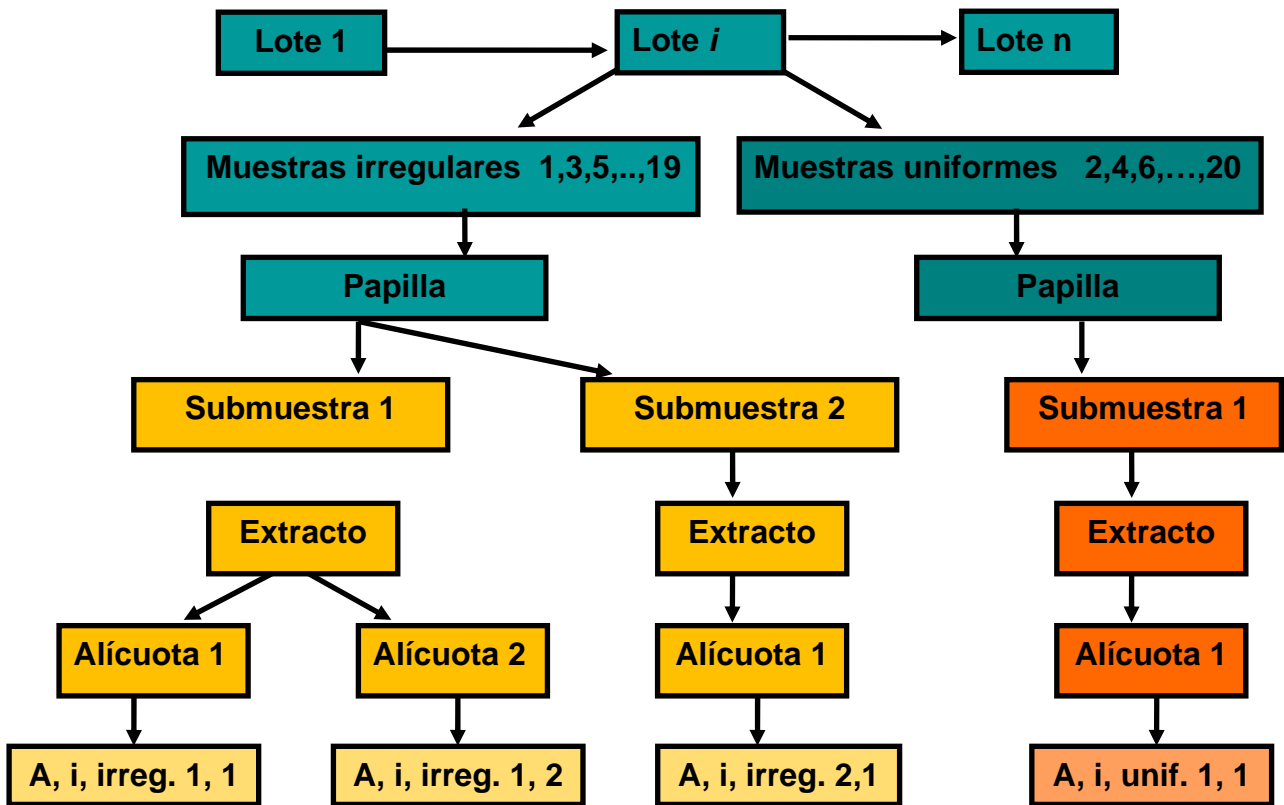


Gráfico 1: Diseño jerarquizado experimental desequilibrado para las nueces del Brasil sin cáscara; i = número de lote = 1, 2, 3, ...25; j = número de muestra = 1, 2, 3, ...20; k = número de la submuestra = 1 ó 2; l = número alícuota = 1 ó 2; $A_{i,j,k,l}$ = concentración de aflatoxinas para el lote i , la muestra j , la submuestra k y la alícuota l .

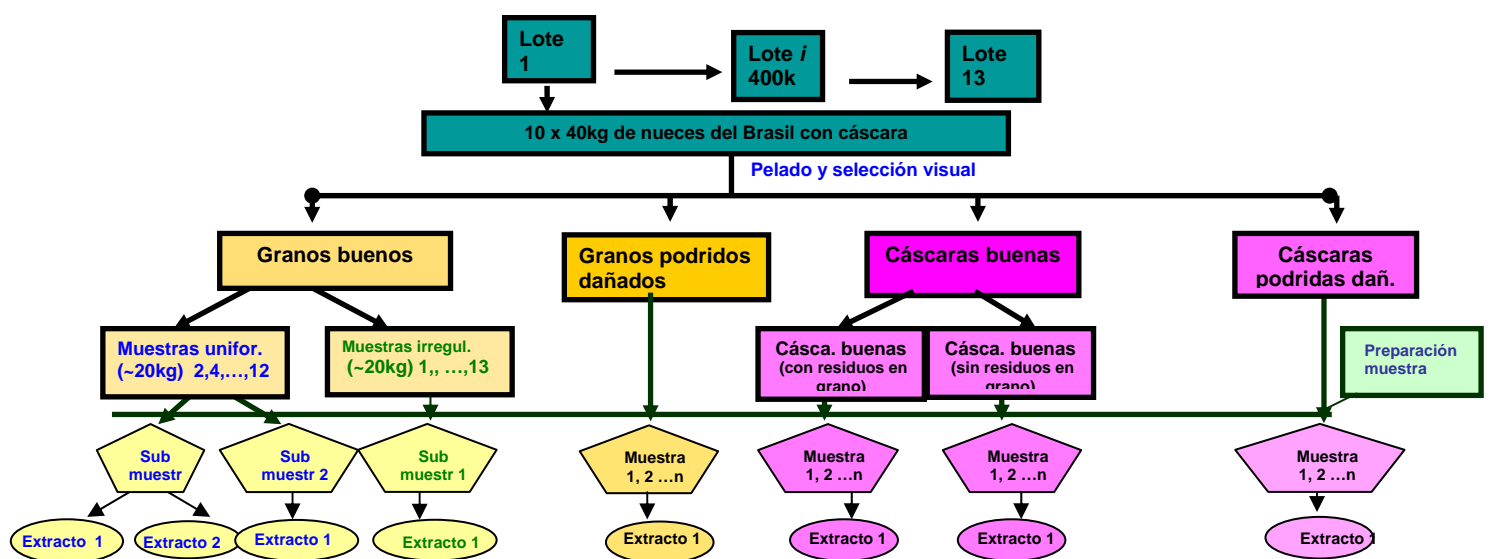


Gráfico 2. Protocolo de diseño del muestreo para las nueces del Brasil con cáscara